



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Desarrollo y estandarización de una técnica inmunoenzimática utilizando como antígeno el Hapteno Nativo de *Brucella abortus* para el diagnóstico de brucelosis bovina

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:  
ANA DELIA GUADALUPE RODRÍGUEZ GARCÍA

ASESOR:  
DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
EXAMEN de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo y estandarización de una técnica inmunoenzimática utilizando como antígeno el Hapteno Nativo de brucella abortus para el diagnóstico de brucelosis bovina

Que presenta la pasante: ANA DELIA GUADALUPE RODRÍGUEZ GARCÍA

Con número de cuenta: 30410976-4 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de enero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en E. Susana Elvira García Vázquez	
<b>VOCAL</b>	Dr. José Francisco Morales Álvarez	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M.V.Z. Alma Noemí Montes De Oca Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## Dedicatorias

A mi madre:

Yolita sin duda eres la mejor mujer que conozco, gracias por darme la vida, por apoyarme y guiar mis pasos como lo has hecho hasta hoy, gracias por confiar siempre en mí y porque aunque muchas veces nuestro camino fue duro nunca te diste por vencida, gracias por aquellas regañones, risas, momentos tristes y aquellas ocasiones de reflexión juntas. Gracias por inculcarnos a mi hermana y a mí que una mujer debe de prepararse cada día más para salir adelante en la vida, porque con cada aprendizaje que nos diste nos impulsaste a ser mejores, gracias por inculcar en nosotros valores como honestidad, ética, moral y amor, por hacerme saber que siempre podía contar contigo. Gracias por las noches de desvelo, por madrugar para que no nos faltara nada, gracias por esos días de apoyo en el hospital. Hoy te dedico esta tesis a ti que sin duda fuiste y sigues siendo parte fundamental para terminarla, recíbela como un pequeño detalle a cambio de todo el amor y apoyo incondicional que siempre me has brindado, te amo mamá.

A mi hermana

Susana simplemente gracias por estar ahí, aun cuando existieron momentos de enojo o indiferencia que en ocasiones parecieron no terminar, por ser un pilar más en mi vida y por preocuparte aun cuando parecía que no lo hacías, gracias por tu apoyo en todos estos años juntas, creo que sabes perfectamente lo que significa vivir con una estudiante de veterinaria, por todas esas veces en que llegaba con mis muestras o material biológico extraño a casa y tenía que guardarlas en el refrigerador, por todas esas ocasiones en que llegaba tarde o no llegaba a casa y siempre estuviste pendiente, por esos secretos y momentos vividos durante toda la carrera, te quiero.

A mi abuelita

Por cuidarme siempre, gracias porque sin importar que sea un mal día o estés cansada tus nietos siempre somos lo más importante y siempre estás ahí con una sonrisa. Gracias por cuidarme, por hacer de mí una mejor persona, por tu apoyo incondicional, por esos años que no se repondrán en los que estuviste siempre ahí.

A mi padre, gracias por darme la vida y por estar esos años que vivimos juntos.

A mi familia,

Por acompañarme y estar siempre en los momentos importantes, a mis tíos: Micaela, Dolores, Cristina, Andrés, gracias por las palabras de aliento y el apoyo que cada uno a su modo supo darme a lo largo de mi vida y de esta etapa que hoy finalizo.

A mis primos

Luis gracias por demostrarme que en la vida no se puede estar quieto, hay que salir, moverse y nunca, nunca dejar que nada nos detenga, nunca olvidaré los años y los momentos que vivimos juntos, las peleas, las sonrisas, aquel último día que pudimos compartir, sigues siendo y siempre serás alguien muy importante en mi vida, nunca te olvidare! Gracias Daniel, Mely, Ángel, Omar, Marco, David.

Dr. José Francisco Morales Álvarez, Gracias por todos los conocimientos que en este tiempo que llevo de conocerlo me ha brindado, primero como profesor en su querida clase de Patología sistémica donde tuve la oportunidad de conocerlo, posteriormente en el laboratorio, en el servicio social, en la tesis y en todo este tiempo en el que sin duda se ha convertido en algo más que un simple profesor para mí. Gracias por todas las ocasiones en las que me brindó un consejo, una sonrisa, un regaño y un abrazo amigo, por las charlas camino a la escuela, por aquellos momentos en que quedábamos roncos de tanto cantar, sin duda una de las mejores decisiones que he tomado en la vida fue haber entrado a su clase, porque así pude conocerlo y llegar hasta donde me encuentro el día de hoy. Gracias por todo el apoyo profesional, pero sobre todo, por el apoyo personal que me ha brindado, por preocuparse de cómo iba en la escuela, por estar al pendiente y por la confianza que poco a poco ha ido depositando en mí, gracias por asignarme este proyecto. Alguna vez alguien me pregunto que si mi asesor me brindaba el apoyo suficiente para poder realizar y terminar la investigación, sin duda dije que sí, que afortunadamente me había tocado uno de los mejores asesores del mundo, hoy puedo decir que no me equivoque, porque aparte de ser un gran patólogo es alguien que siempre está al pendiente de sus alumnos y tesisas, por eso y más le dedico mi tesis, nuestra tesis!!!

A la traviesa y tragona de Rose, al mal humorado de Azul, a Maurito que nos regaló 7 magníficos años, a Canelita, al travieso de Bruno y a todos aquellos peludos que han formado parte de mi vida y personal y profesional.

Desde que tengo uso de razón siempre quise ser Médica Veterinaria y hoy después de años y de un largo camino recorrido por fin puedo decir que estoy a unas palabras de lograrlo, mami, daré mi mejor esfuerzo y saldré de esa sala como MVZ.

Ana

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me abrió las puertas desde la preparatoria y que hasta el día de hoy me ha acogido como parte de su gran historia, gracias a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segundo hogar durante el transcurso de mi carrera profesional, por permitirme conocer a gente grandiosa, por todo lo que aquí viví, porque aquí encontré el amor, grandes amistades y también grandes profesores, aquí lloré, reí, me divertí, disfruté y sobre todo aprendí y crecí profesional y personalmente.

Amigos de escuela, amigos del laboratorio, amigos de vida y personas lindas que formaron y aun forman parte importante de mi vida: Mario Reséndiz (amigo eres de las personas más importantes y especiales en mi vida, me has enseñado que aunque pase el tiempo y no podamos estar juntos físicamente, siempre lo estamos de corazón, volvamos a ir a otro concierto juntos, prometo no accidentarme de nuevo, sigamos juntos como lo hemos hecho hasta ahora, te amo), Ángel Ramírez (aun a la distancia siempre estarás presente en mi corazón, gracias por las palabras de ánimo cuando las necesite, por todos los consejos, los momentos y todos aquellos instantes que hemos compartido), Amanda Romero (volvamos a sonreír al vernos, sin duda eres una parte importante de esta etapa que estoy a punto de concluir, te quiero y no olvido las sonrisas que hemos compartido.), Lina Ciriaco (gracias por tu apoyo en este tiempo, sin duda hiciste muy amena y feliz la carrera, principalmente los últimos semestres en donde todo parecía estar en contra, gracias por las pláticas, los consejos, la confianza y todos aquellos momentos y detalles que hemos vivido), Marlene Cruz, Elías Caudillo, Ángel Palacios, Manuel Rodríguez, Pablo Tapia (me hubiera gustado haber terminado la carrera juntos, tener tus sonrisas y palabras de aliento hasta hoy, pero lamentablemente la vida no lo permitió, aun así me alegra saber que pudimos despedirnos y que en el último momento en que nos vimos supimos que seríamos amigos por siempre), Sara Baeza (gracias por tu amistad, por esas palabras de aliento cuando te mandaba mensaje y te decía que quería mandar todo al carajo, por escucharme y por las risas compartidas, gracias por siempre estar ahí cuando necesito un consejo, una sonrisa amiga o una palabra de aliento.), Karina Hernández (gracias por las lágrimas compartidas, por la confianza que has depositado en mí, por aquellas palabras que me brindaste en ciertos momentos, veras que lograremos nuestras metas, miraremos atrás, recordaremos y sonreiremos), Manu Manuel, Guadalupe Martínez, Israel Carrera, Héctor Gómez, Samantha, Josué, Diana, Jorge, Silvia, Laura, Paty.

Gracias a todos mis profesores porque sin duda son una parte importante de mi carrera, gracias por sus enseñanzas, por las palabras de aliento, gracias por entregar un pedacito de su vida a la docencia.

A los miembros de mi jurado evaluador, M en C. Susana Elvira García Vázquez, Dr. Marco Muñoz Guzmán, Dra. María del Carmen Espejel Del Moran y MVZ Alma Noemi Montes De Oca Chávez, gracias por su tiempo, paciencia y dedicación brindada en la elaboración de este proyecto.

Agradezco al Laboratorio de Biotecnología Animal México (LBA México) por las facilidades ofrecidas para la obtención de los sueros provenientes de la Unidad de producción considerada como infectada.

## ÍNDICE

1. Resumen .....	1
2. Introducción.....	3
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis .....	19
5. Objetivo general .....	19
6. Objetivo particular.....	19
7. Material y métodos.....	20
7.1 Muestras.....	20
7.2 Estandarización de antígeno Hapteno Nativo.....	21
7.2.1 Estandarización de la técnica de ELISA-HN.....	22
7.2.2 Obtención del HN para el desarrollo de la técnica de ELISA.....	22
7.2.3 Desarrollo de la técnica de ELISA-HN.....	24
7.3 Análisis estadístico.....	25
8. Resultados .....	26
8.1 Estandarización de antígeno HN.....	26
8.2 Grupos procedentes del Laboratorio de Diagnóstico CENID Microbiología Animal-INIFAP.....	28
8.3 Grupos procedentes de Torreón Coahuila.....	30
9. Discusión.....	32
10. Conclusiones.....	38
11 Bibliografía.....	39
12 Anexo.....	44

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

LPS	Lipopolisacarido
HN	Hapteno Nativo
IDR	Inmunodifusión radial
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
FC	Fijación del complemento
CENID	Centro de Estudios e Investigaciones para el Desarrollo Docente
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Características de las muestras de cada grupo.....	20
Cuadro 2. Distribución de las diluciones de sueros positivos y negativos en placas antigenadas con HN de <i>Brucella abortus</i> .....	22
Cuadro 3. Valoración el coeficiente Kappa.....	25
Cuadro 4. Resultados de ELISA para controles negativos y positivos, promedios y desviaciones estándar.....	26
Cuadro 5. Concordancia de resultados para prueba de Tarjeta 8%- ELISA (HN), grupo único.....	29
Cuadro 6. Concordancia de resultados para prueba de Tarjeta 8%-IDR, grupo único.....	29
Cuadro 7. Concordancia de resultados para prueba de Tarjeta IDR-HN, grupo único.....	29
Cuadro 8. Concordancia de resultados para prueba de tarjeta 8% INIFAP vs Torreón, grupo positivos y negativos.....	30
Cuadro 9. Concordancia de resultados para prueba de ELISA (HN) grupo positivos y negativos.....	30
Cuadro 10. Porcentaje de igualdad de resultados para prueba de Tarjeta 8% negativos.....	31
Cuadro 11. Porcentaje de igualdad de resultados para prueba de ELISA (HN) negativos.....	31
Cuadro 12. Reactivos para elaborar CaBi (solución amortiguadora Carbonato-Bicarbonato).....	46
Cuadro 13. Reactivos para elaborar Tween-20.....	46
Cuadro 14. Grupo único, Tarjeta 8% positivos-IDR positivos.....	47
Cuadro 15. Grupo único, Tarjeta 8% positivo, IDR negativo.....	49

Cuadro 16. Grupo único, Tarjeta 8% negativo, IDR negativo.....	51
Cuadro 17. Sueros provenientes de Torreón, grupo Positivos y Negativos: Tarjeta 8% positivos y negativos, ELISA HN positivos y negativos.....	53
Cuadro 18. Sueros provenientes de Torreón, grupo Negativos: Tarjeta 8% negativos, ELISA HN negativos.....	56
Figura 1. Desviación estándar de controles positivos y negativos.....	27
Figura 2. Desviación estándar de dilución 1:80 de controles positivos y negativos..	27

## 1.-RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella* que afectan a las principales especies domésticas. La enfermedad es de alto impacto económico derivado de los problemas reproductivos que induce en el ganado caracterizado principalmente por el aborto y la disminución en la producción láctea. La estrategia fundamental de la campaña se basa en el diagnóstico, eliminación de animales positivos y la vacunación. Los métodos de diagnóstico serológicos más utilizados son tarjeta y rivanol, que han sido rebasados en sus alcances por malas prácticas en el control de la brucelosis. Por este motivo, se han desarrollado pruebas alternativas con antígenos diferentes al LPS. Uno de los más importantes es el Hapteno Nativo (HN), que tiene características poco antigénicas. La aparición de anticuerpos en los animales contra HN depende de la intensidad de la estimulación, por lo que la detección de anticuerpos contra el HN es más específica para detectar animales realmente infectados. En el presente trabajo se estandarizó una prueba inmunoenzimática (ELISA) que utilizó como antígeno el HN de *Brucella abortus*. Se utilizaron sueros controles positivos y negativos, para establecer la dilución óptima del antígeno, se obtuvo el punto de corte basado en el promedio y desviación estándar de los sueros controles. Se formaron cinco grupos con las siguientes características: Grupo uno Tarjeta positivo-IDR positivo; Grupo dos Tarjeta positivo-IDR negativo; Grupo tres Tarjeta negativo-IDR negativo; Grupo cuatro Tarjeta positivo y negativo-ELISAHN positivo y negativo, provenientes de un hato infectado, donde conviven animales infectados y sanos; Grupo cinco Tarjeta negativos-ELISAHN negativos procedentes de un hato libre. A los tres primeros grupos se les corrió la técnica de ELISA-HN obteniendo los siguientes resultados: Grupo uno 95.12% de resultados positivos y 4.8% negativos; grupo dos 67.5% de sueros positivos y 32.5% negativos; grupo tres 84.9% de sueros negativos y un 15.08% de sueros positivos. Posteriormente los tres primeros grupos se unificaron en un solo grupo y se calculó el índice Kappa obteniendo los siguientes resultados: **Tarjeta-ELISAHN** 0.64, concordancia considerable; **Tarjeta-IDR** 0.44 concordancia moderada; **IDR-ELISAHN** 0.46 concordancia moderada. Para el grupo cuatro, donde se comparó la misma prueba (ELISA-HN) realizada por dos

laboratorios distintos, el índice Kappa en las pruebas **HN INIFAP-ELISAHN Torreón** se obtuvo una concordancia de 0.24, lo cual se considera baja pero aceptable. La discordancia observada fue de un 42%; en el Grupo cinco se obtuvo un 95% de igualdad en resultados de **HN INIFAP-ELISAHN Torreón**. Los resultados obtenidos indican que ELISA-HN tiene una alta especificidad y sensibilidad relativa, lo cual se demuestra comparándose con técnicas rutinarias de diagnóstico, en las cuales existe la presencia de falsos positivos, como puede ocurrir en la prueba de Tarjeta e IDR, ya que al ser pruebas cualitativas dependen del factor humano para su interpretación. La prueba de ELISA-HN desarrollada y estandarizada en este trabajo, demuestra ser una alternativa para el diagnóstico de la brucelosis bovina, con la característica de tener una alta sensibilidad y especificidad relativa, por lo que se puede utilizar como prueba confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis bovina.

## 2.-INTRODUCCIÓN.

La brucelosis afecta varias especies las cuales se han diferenciado con base en sus características antigénicas y su hospedador animal preferencial: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (ovejas, cabras) *B. ovis* (carneros), *B. suis* (porcinos), *B. canis* (caninos) (1).

Las sinonimias de la enfermedad son enfermedad de Bang (en bovinos), aborto infeccioso, aborto epizootico (en animales), Fiebre de Malta, Fiebre del mediterráneo, Fiebre ondulante (en el hombre) (13).

La brucelosis bovina, es una enfermedad infecto contagiosa zoonotica de origen bacteriano caracterizada por provocar en el ganado aborto en el último tercio de gestación por lo cual representa grandes pérdidas al sector ganadero, así mismo en salud pública provoca periodos febriles entre otras manifestaciones, es una enfermedad de notificación obligatoria para los médicos veterinarios (26), siendo medio de contagio el contacto directo con productos del aborto de animales infectados, a través de piel erosionada o contacto con mucosas, principalmente la conjuntiva. La enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella* que cuenta con una distribución mundial y es endémica en varias regiones del mundo, incluido México (10).

Para controlar la enfermedad en nuestro país, está vigente la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, regida por la Norma: NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis de los Animales; publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de agosto de 1996 y su Aclaración el 20 enero de 1997 (26).

Las estrategias de la campaña están dirigidas, según la posibilidad de la zona, de entrar en las categorías de control o erradicación de la enfermedad:

- Muestreo serológico, diagnóstico para la posterior segregación y eliminación de los animales reactores positivos.
- Muestreo serológico y diagnóstico, vacunación de hembras jóvenes y adultas, programas de manejo de hato infectado.
- Vacunación masiva de hembras.

- Caracterización de la distribución de la enfermedad y prevalencia, usando el muestreo serológico y diagnóstico a gran escala, tanto de bovinos, ovinos y caprinos.
- Amplia cobertura de vacunación en áreas de alto riesgo, incluyendo las zonas endémicas de brucelosis humana.
- Establecimiento de un programa de certificación de hato libre (26).

**Etiología.**-La *Brucella*, es un bacilo o cocabacilo gram negativo, con tamaño entre 0.5 a 1.2µm de largo por 0.5 a 0.7 µm de ancho, aerobio, inmóvil, de crecimiento lento, intracelular facultativo (1, 2,19).

La membrana citoplásmica consiste en una bicapa de fosfolípidos y proteínas de diversos tipos, es una estructura muy vulnerable a los cambios osmóticos y ambiente. Entre la membrana citoplásmica y la membrana externa se encuentra el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano. La composición de la membrana externa de *Brucella* es semejante a la de *E. coli*. La región apolar (hidrofóbica) de la membrana con un grosor de 4.5 nm, forma una barrera estructural y funcional entre el periplasma y el exterior de la célula. El peptidoglicano se encuentra fuertemente asociado a la membrana externa a través de moléculas de lipoproteína unidas por ligadura covalente, esto le proporciona una mayor estabilidad. Las proteínas llamadas porinas funcionan como canales transmembranales, que permiten la difusión de compuestos entre ciertos límites de peso molecular (1).

En la pared celular de la bacteria está el peptidoglicano que se asocia con las proteínas de membrana externa de la bacteria y actúa como factor de virulencia al interferir con la capacidad bactericida del suero y permitir a la bacteria resistir a los mecanismos de lisis ejercidos por los anticuerpos y el complemento (18).

El lipopolisacárido contiene el antígeno O y la endotoxina de las bacterias Gram negativas como *Brucella* y está localizado en la membrana externa, juega un papel muy importante en la patogénesis de la infección bacteriana, así como en la interacción con el sistema de defensa del hospedero. Básicamente el LPS se compone de una porción lipídica muy conservada entre las especies, denominada lípido A, inmersa en la cara externa de la membrana externa de la bacteria y una

porción hidrofílica compuesta por azúcares que presenta una gran variabilidad estructural. El lípido A es responsable de las propiedades patofisiológicas de las endotoxinas. El polisacárido O, que es la porción más externa, le confiere su especificidad serológica. La porción de polisacárido que protruye de la membrana externa ha sido dividida en dos regiones principales: una región interna o central (núcleo o core) y una porción externa denominada cadena O (antígeno O ó Polisacárido O). La región del núcleo ha sido a su vez subdividida en una región interna y una región externa. La cadena O constituye la porción inmunodominante de la molécula y los determinantes estructurales de esta región proveen la base de la clasificación serológica. El oligosacárido nuclear o core une el polisacárido O al lípido A. En general, los genes responsables de la síntesis del LPS están organizados ya sea en grupos de genes contiguos como la síntesis del núcleo y el polisacárido O, o bien, dispersos alrededor del cromosoma bacteriano como en el caso del lípido A (14).

Dentro de las actividades biológicas más relevantes del LPS está la potente activación de macrófagos y la producción de gran cantidad de citoquinas y otros mediadores con múltiples efectos en diferentes órganos, es importante mencionar que cuando una especie de *Brucella* es capaz de sintetizar moléculas de lipopolisacárido completas se denominan especies lisas, por su morfología colonial, ya que precisamente forman colonias lisas al crecer en medios sólidos. Estos organismos reaccionan con sus anticuerpos específicos contra sus cadenas O, y usualmente forman colonias de apariencia lisa cuando crecen en medios sólidos. En contraste, las especies de *Brucella* incapaces de sintetizar polisacárido O son llamadas rugosas (14), que bajo el microscopio se observan amarillentas y granulosas (19).

La estructura mínima de lipopolisacárido necesaria para el crecimiento de *Brucella* consiste de lípido A y dos unidades de ácido 3-desoximanooctulosónico (kdo) (14). En *Brucella* la cadena O es un homopolímero de un solo amino azúcar llamado perosamina (15). El Hapteno Nativo (HN) es un antígeno de tipo intracelular, y de naturaleza no proteica localizado en el espacio periplásmico, por lo que solamente una exposición prolongada al sistema inmune, como es el caso de una infección

produce anticuerpos contra este antígeno, es aislado de cepas en fase lisa, se deriva del rompimiento hidrolítico del S-LPS, por lo que es estructuralmente indistinguible del polisacárido O (6,1).

**Patogenia.**-*Brucella abortus* tiene predilección por útero grávido, testículos, glándulas sexuales accesorias, ubre, linfonodos y en menor escala, cápsulas articulares y bolsas sinoviales.

*Brucella* ha desarrollado estrategias para modificar el medio intracelular, de tal manera que sea más apropiado para sobrevivir (18). Posteriormente de la entrada que puede ser por la mucosa conjuntival, nasofaríngea, genital o por piel (1) la bacteria llega vía sanguínea a linfonodos regionales y es fagocitada por macrófagos y polimorfonucleares que forman parte de la inmunidad innata, donde se replica dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares (16). El período de incubación varía de cincuenta y tres días a doscientos cincuenta (20) ya que dentro de sus propiedades patogénicas se encuentra la propiedad de evadir el sistema inmune replicándose en estas células, que corresponden a células altamente especializadas e inhibiendo la unión fago-lisosoma(1, 2) asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes y a la producción de GMP (guanosina 5' monofosfato) y adenina, así mismo la supervivencia de la bacteria está dado por la degranulación, la activación del sistema mieloperoxidasa/haluro y la producción del TNF- $\alpha$ (16), lo que permite tener una infección crónica en una gran variedad de mamíferos, incluyendo el hombre (1, 2).

Las proteínas de choque térmico también juegan un papel importante en la colonización del macrófago. La acumulación de este tipo de proteínas permiten la adaptación de la bacteria al aumento de la temperatura, al pH bajo y a otros factores de estrés microambientales, e incluso conserva las funciones de la célula bacteriana y es esencial para la multiplicación de la misma (18).

En el organismo *Brucella abortus* llega al sistema reproductor, donde las células de la placenta son ricas en receptores de manosa (17) y en un factor de crecimiento conocido como eritritol, presente en tejidos placentarios animales (18).

La bacteria penetra en las células epiteliales del corion y se replica causando

placentitis, también produce endometritis con ulceraciones en la capa epitelial que reviste al útero, produciendo una respuesta inflamatoria en las membranas fetales, este proceso obstruye la circulación fetal y produce cierto grado de necrosis en los cotiledones, lo que provoca el aborto.

**Lesiones y signos clínicos.**-Las lesiones en el feto incluyen congestión pulmonar, acompañadas de hemorragias en el epicardio y cápsula esplénica (1), fetos edematosos con líquido torácico y abdominal, hepatitis necrótica focal o multifocal y/o hepatitis granulomatosa, bronconeumonía supurativa acompañada de arteritis. Lesiones en machos orquitis, granulomas espermáticos generalmente unilateral, presentando las lesiones principalmente en cola del epidídimo.

En el hombre hay infertilidad dado que la inflamación provoca la formación de quistes intraepiteliales asociados a la movilidad de los espermatozoides ya que debido a las lesiones causadas estos llegan a lugares donde son atacados por el sistema inmune provocando granulomas espermáticos. De igual forma hay estados febriles presentes en la etapa de bacteriemia que se da cuando la bacteria sale del macrófago.

**Vacunación y otras medidas de control.**- La brucelosis es una importante enfermedad zoonótica que produce cuantiosas pérdidas económicas en la industria animal, siendo sus efectos particularmente apreciables en los países en vías de desarrollo. En la inmensa mayoría de las situaciones epidemiológicas de estos países, los rumiantes domésticos (bovinos, cabras, ovinos) son las principales especies afectadas y las que intervienen mayoritariamente en el ciclo epidemiológico humano. Por lo tanto, la aplicación de un programa de profilaxis vacunal en los rumiantes resulta imprescindible para controlar la difusión de la enfermedad en la inmensa mayoría de los países afectados. Sin embargo, estos programas de vacunación, por muy eficientemente que se ejecuten, nunca pueden por sí solos lograr la erradicación de la brucelosis. En consecuencia, para conseguir la erradicación de la enfermedad en la mayor parte de las situaciones epidemiológicas será preciso implementar un programa de diagnóstico y sacrificio.

La complementación de ambos programas ha sido y continúa siendo uno de los principales problemas en el control colectivo de la brucelosis (19).

En la actualidad en México, tanto las vacunas RB51 como la cepa 19, son consideradas en la norma para su uso en bovinos; y para ovinos y caprinos se utiliza la cepa Rev1 de *B. melitensis*. Sin embargo, el uso de vacunas solamente no es suficiente para el control de la enfermedad, sobretodo en explotaciones con alta prevalencia de brucelosis (26).

De la vacuna cepa 19 existen dos dosis, una llamada dosis clásica utilizada para prevenir la enfermedad en becerras de 3 a 6 meses de edad, y otra llamada dosis reducida para hembras mayores de 6 meses, incluso gestantes, ambas dosis están probadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural para la vacunación del ganado bovino en la campaña nacional contra la brucelosis en los animales. La dosis reducida puede aplicarse en hembras a partir de los 18 meses en el caso de que hayan sido vacunadas con la dosis clásica a la edad de 3 a 6 meses. También puede aplicarse en hembras mayores de 6 meses que no recibieron la vacuna con dosis clásica (4).

La vacuna clásica para becerras de 3 a 6 meses de edad debe contener por lo menos  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Brucella* por cada mililitro de vacuna reconstituida. Las becerras de 3 a 6 meses de edad, deben ser vacunadas con 5 ml de vacuna cepa 19 en dosis clásica, lo cual representa un mínimo de  $5 \times 10^{10}$  UFC de *Brucella*. La vacuna cepa 19 en dosis clásica no debe utilizarse en hembras mayores de 6 meses, ni menores de 3 meses de edad (4).

La vacuna cepa 19 en dosis reducida, debe contener un título de  $3 \times 10^8$  a  $3 \times 10^9$  UFC de *Brucella* por cada dosis, equivalente a 2 ml, esta cepa en dosis reducida se debe aplicar a hembras mayores de 6 meses de edad, aun gestantes. Bajo ninguna circunstancia se debe diluir la vacuna en presentación de dosis clásica, para obtener dosis reducidas. La vacunación oficial para ganado bovino deberá ser realizada y/o supervisada por Médicos Veterinarios oficiales o aprobados (4).

La cepa viva RB51 es una mutante rugosa derivada de la cepa lisa virulenta *Brucella abortus* 2308 mediante pases sucesivos por medios de cultivo conteniendo antibióticos (rinfampicina y penicilina), que carece del O/PS de la *Brucella* en fase

lisa y es estable después de múltiples pases in vitro e in vivo en varias especies animales. Esta cepa, ha demostrado inducir inmunidad frente a *Brucella abortus* en ganado bovino sin producir ninguna interferencia en las pruebas clásicas de diagnóstico serológico al no inducir anticuerpos frente al O/PS en los animales vacunados (19). Por otra parte estudios realizados han demostrado su escasa capacidad para inducir placentitis, abortos y localizaciones mamarias (23). Además de todas las ventajas apuntadas anteriormente, experimentos llevados a cabo en ratones han demostrado que RB51 induce inmunidad frente a un amplio rango de especies de *Brucella* (22). Finalmente, la ausencia de signos de infección tras la inoculación accidental de RB51 sugiere que esta cepa es avirulenta para la especie humana (24), por lo mencionado anteriormente la cepa RB51 se convierte en una alternativa muy interesante para la profilaxis médica de la brucelosis animal y muchos países la usan como vacuna de referencia en sustitución de cepa 19 (19). Ha sido demostrado que la eficacia protectora de RB51 frente a desafíos con especies homólogas (*B. abortus*) y heterólogas (*B. melitensis* y *B. suis*) en ratones es, en todos los casos, significativamente inferior a la conferida por las vacunas de referencia cepa19 y Rev 1 (40). Si bien los experimentos en ratones poseen sólo una validez relativa, todos los experimentos mencionados sugieren que el nivel de protección conferido por RB51 y, sobre todo, la duración efectiva de la protección podrían ser menores que los inducidos por vías vacunas de referencia Rev 1 y cepa 19 (19).

En un experimento de protección en bovino frente a un desafío con cepa virulenta *B.abortus* 2308, la vacuna RB51 confirió un nivel de protección a corto plazo (7-13 meses) del orden del 87%, algo inferior al conferido por la cepa 19 (95%) (25).

El beneficio de la vacuna RB51 es la capacidad de permitir identificar serológicamente los animales infectados aun cuando ellos hayan sido vacunados con la cepa RB51. Sin embargo, es necesario informar que animales vacunados con la cepa RB51 pueden sero-convertirse cuando son expuestos a las cepas virulentas de campo de *Brucella abortus*; mientras que la incidencia de los abortos será muy baja (21).

La vacuna *B. abortus* cepa 19 confiere protección completa contra la infección en 65-75% de los animales vacunados y en 25 -35% restante una protección relativa. En un porcentaje superior al 95% la vacunación evita el aborto en hembras que se han infectado y recordando que este constituye un alto peligro para la propagación de la infección en el hato afectado y en los hatos de producciones vecinos (21). La vacunación con RB51, tiene un doble beneficio: disminuye la susceptibilidad a la infección al conferir protección inmunitaria y reduce el nivel de exposición a la infección al disminuir el número de animales excretores de *Brucella abortus* y reducir sustancialmente el número de abortos en los hatos infectados (21).

El control de la brucelosis requiere de medidas de bioseguridad adicionales como son el monitoreo serológico continuo, con la finalidad de identificar oportunamente animales que empiezan la enfermedad y evitar que contagien otros animales sanos al momento del parto o el aborto. Es importante además la segregación de animales enfermos hasta que terminen su ciclo productivo para su eliminación paulatina, ya que la presencia de animales seropositivos representa un factor de riesgo importante. Se debe contemplar el diagnóstico de la brucelosis a los animales de reemplazo antes de introducirlos y cuarentena de los mismos. Otra de las medidas adicionales a considerar es no alimentar a las crías con la leche de madres brucelosas (26).

**Diagnóstico.**-Son numerosas las pruebas para el diagnóstico, sin embargo no todas se pueden emplear indistintamente; existirán casos especiales donde se aplicara tal o cual prueba. Para el diagnóstico se cuenta con el aislamiento e identificación de la bacteria, inoculación en animales de laboratorio y la serología. Esta última es la técnica más empleada para el diagnóstico de brucelosis, lo ideal sería tener una prueba serológica con una elevada sensibilidad y especificidad, que fuera capaz de diferenciar animales vacunados de animales infectados. Sin embargo, para poder hacer esta selección es necesario saber el tipo de inmunoglobulina que se pretende identificar (19).

La prueba serológica ideal sería aquella que:

- fuese capaz de diferenciar los animales infectados de los vacunados
- fuese simple de realizar
- y proporcionará los resultados con rapidez y repetibilidad

La diferenciación entre infectados y vacunados se realiza interpretando las pruebas serológicas en función del tipo de inmunoglobulina, el antígeno empleado y el estado del animal. En bovinos está claramente demostrado que en los animales infectados y en los vacunados la respuesta humoral incluye las clases IgM e IgG; sin embargo, en la vacunación el nivel de anticuerpos cae rápidamente, de tal manera que a los seis meses no se encuentra IgG2 y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG1. En contraste, en los animales infectados persisten altos niveles de IgG1 e IgG2 (19).

Mientras que la infección y vacunación estimulan la aparición de IgM e IgG frente al LPS, los anticuerpos frente al poly-B, HN y proteínas citoplasmáticas son de la clase IgG.

Las pruebas inmunológicas establecidas por la Norma oficial Mexicana 041-ZOO-1995 y efectuadas por el personal oficial o aprobado son: para especies lisas, la prueba de tarjeta al 3 y 8%, rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche; y para la detección de *Brucella ovis*, la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), además de estas, existen pruebas como son la Inmunodifusión radial (IDR) con HN que en diversos trabajos ha demostrado su utilidad para diferenciar entre animales vacunados recientemente de animales infectados (4, 8).

La prueba de tarjeta también llamada Prueba del antígeno brucelar amortiguado o Prueba de rosa de Bengala, se desarrolló en 1967, es utilizada como prueba tamiz, es decir que a los sueros positivos a esta prueba se les practicarán métodos confirmatorios, y consiste en una suspensión de *Brucella abortus* cepa 1119-3 en una contracción de 8%, amortiguada a un pH de  $3.5 \pm 0.05$  y teñida con rosa de Bengala. En 1993 se demostró que en ovinos y caprinos la modificación en concentración del antígeno de tarjeta del 8% al 3%, aporta resultados más fieles al aumentar la sensibilidad en la detección de animales positivos.

La prueba de rivanol es una técnica complementaria para el diagnóstico oficial de brucelosis en el ganado bovino. Es un método cuantitativo, rápido y complementario cuando resultan animales positivos a la prueba de tarjeta. La prueba de rivanol detecta anticuerpos IgG, los cuales están ligados a un fuerte estímulo antigénico y su presencia permanente está relacionada con un estado de infección activo o con enfermedad crónica, pudiendo así diferenciar animales infectados de vacunados con la cepa 19. La respuesta humoral incluye anticuerpos de las clases IgM e IgG. Sin embargo, en la vacunación, el nivel de anticuerpos cae rápidamente de manera que a los 6 meses no se encuentra IgG2 y solo persisten bajos niveles de IgG1 e IgM. En contraste, en animales infectados persisten después de 6 meses altos niveles de IgG1 e IgG2 (19).

La técnica de rivanol se clasifica entre las técnicas que emplean células completas de *Brucella abortus*, en donde el LPS es el antígeno inmunodominante de la superficie de la *Brucella* lisa y como tal interviene en todas las pruebas diagnósticas que emplean suspensiones celulares. Esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad alrededor de 83% y 93% respectivamente.

Su fundamento se basa en que el rivanol (colorante de acridina) en una primera etapa precipita la albúmina y los anticuerpos de tipo IgM, los cuales predominan en el caso de una vacunación o infección primaria, quedando viables en el sobrenadante los de tipo IgG, los cuales se encuentran en mayor cantidad solo en estimulaciones inmunogénicas posteriores (19).

Esta técnica se usa exclusivamente para suero de bovino que haya resultado positivo a la prueba de tarjeta o Rosa de Bengala, con el fin de diferenciar animales vacunados de infectados. Los resultados serán interpretados tomando en cuenta si hubo vacunación previa; en hembras vacunadas con cepa 19 a dosis reducida únicamente se podrán realizar las pruebas diagnósticas 10 meses después de la fecha de vacunación; en hembras nunca antes vacunadas y en machos enteros el muestreo se realizará a partir de los 6 meses de edad. Sin embargo en caso de revacunación se pueden presentar falsos positivos (19).

La prueba de anillo en leche o prueba de Bang se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en la leche de vacas infectadas; es una prueba que si se efectúa en forma correcta tiene mucha sensibilidad. Este método aun cuando no proporciona un diagnóstico definitivo, sí puede brindarnos información general sobre la enfermedad de una determinada área. De este modo se podrá determinar en un momento dado que producciones lecheras de una región están afectadas por la brucelosis, intensificando la acción de control sobre las mismas (19).

El antígeno se une con el anticuerpo formando un complejo junto con los glóbulos de grasa, que asciende por efecto del calor y forma una capa de crema coloreada de azul oscuro (anillo de color azul). Si no existen anticuerpos contra *Brucella*, el antígeno permanecerá suspendido en la leche dando un color homogéneo azulado bajo una capa de crema blanca (19).

La inmunodifusión radial (IDR), se incluye el HN en gel y en los pocillos se colocan las muestras de suero a estudiar. Si algún suero contiene anticuerpos frente a HN se desarrolla un halo de precipitación alrededor del pozo entre dos y seis horas, lo cual indica que la muestra evaluada es positiva. La IDR con poly.B o HN de *B. melitensis* en un medio hipertónico [10% NaCl] ha sido evaluada en el ganado bovino y en menor grado en el ovino.

En el ganado bovino, la prueba presenta una alta especificidad para diferenciar animales con infección demostrada por aislamientos bacteriológico de los vacunados con cepa 19. En el caso más desfavorable, que se da en la vacunación de adultos con la cepa 19, su especificidad es del 80% superior al 66% de la fijación de complemento (FC). Sin embargo, como ocurre con la FC, la IDR puede ser positiva en bovinos vacunados en la edad adulta o en estado de gestación, cuando se establece una infección permanente en las ubres por la cepa vacunal (19).

Esta prueba ha sido aplicada al diagnóstico de la brucelosis bovina dentro de programas de control con buenos resultados. Una prueba de IDR con HN de *B. melitensis* 16M en medio hipertónico y con amortiguador de glicina ha sido evaluada en el ganado caprino, encontrándose que presenta una sensibilidad de 94.5% y una especificidad del 100%. En cuanto a su especificidad en cabritas vacunadas con dosis clásica, es de 94% a los 120 días posvacunación y en cabras adultas

vacunadas con dosis reducida su especificidad es del 95% a los 30 días y del 100% a los 60 días. Esta capacidad de diferenciar animales infectados de vacunados es su mayor atributo, aunada a su sencillez y economía, hacen de la IDR una prueba confirmatoria digna de ser tomada en cuenta para su uso en la campaña contra brucelosis (19).

La técnica de Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) es un ensayo adecuado para el diagnóstico de la brucelosis se caracteriza por su elevada sensibilidad y especificidad, se puede utilizar HN o LPS como antígeno, suero diluido y un reactivo de antiglobulina específico para inmunoglobulina de la especie a trabajar, conjugado con una enzima. Esta prueba en particular es una prueba de la OIE alternativo, pero no se ha estandarizado (3, 7).

La generación de un producto medible en una técnica ELISA es esencial, esta medición puede ser fotométrica, espectrofotométrica, o manométrica. Algunos productos marcados con componentes fluorescentes dan un sistema secundario de amplificación, el cual sirve para incrementar la sensibilidad del ensayo.

Las técnicas ELISA dependen del hecho de que las enzimas o grupos químicos activos puedan unirse de forma covalente a las inmunoglobulinas, bajo las condiciones apropiadas. Estas técnicas combinan la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo con la sensibilidad de un sistema indicador y se clasifican como homogéneas o heterogéneas. Las homogéneas son competitivas ya que en la reacción antígeno-anticuerpo se puede adicionar antígenos o anticuerpos marcados. En el primer caso el antígeno compite por un número limitado de sitios de unión sobre el anticuerpo en cuestión y en el segundo el anticuerpo compite por sitios de unión sobre el antígeno. Este tipo de inmunoensayo es único en los sistemas de ELISA y representa un paso sencillo, rápido con alta sensibilidad y especificidad (19).

Las técnicas EIA heterogéneas son no competitivas, aquí uno de los participantes de la reacción antígeno-anticuerpo debe ser movilizado en una fase sólida en la cual, ya sea un antígeno o un anticuerpo es adsorbido pasivamente en una microplaca de poliestireno por interacciones hidrofóbicas y/o interacciones iónicas. La emisión de la señal del color indicador se incrementa en proporción directa a la

concentración del material en la muestra. Los anticuerpos, antígenos o conjugados utilizados que no se adsorbieron, pueden ser separados de la fase sólida reaccionante por una serie de lavados con una solución amortiguadora de PBS Tween 20 (19).

Los sistemas de ensayo pueden ser clasificados en dos grupos, el primero basado en la inmovilización o adsorción de la molécula en la fase sólida y el segundo por los reactivos marcados. En este último punto se tiene dos tipos: 1) ELISA DIRECTO y 2) ELISA INDIRECTO, en donde ambos tienen la característica de adsorber el antígeno en la fase sólida. La concentración del antígeno dependerá de su pureza y puede ser empleado desde 0.2 hasta 1.0 µg/ml en el caso de poseer un excelente purificado, cuando se pretende usar un antígeno a partir de células lisadas se requiere de una concentración de 5 a 25 µg/ml. Cabe mencionar que la utilización de una mayor concentración de antígeno requerido puede ocasionar el incremento de interacciones entre proteína y proteína produciendo complejos de estas, los cuales se unen de manera débil a la fase sólida y al momento del lavado la mayoría de los complejos proteínicos complejos se eliminan quedando una cantidad insuficiente del antígeno en la microplaca. Estos métodos se diferencian entre si porque en el primer sistema el anticuerpo está directamente conjugado con la enzima indicadora (con biotina o fluorocromo), este método tiene la característica de poseer una sensibilidad baja. En el segundo caso uno de los dos anticuerpos utilizados no está marcado por lo que este sistema es ampliamente utilizado.

**ELISA INDIRECTA** El inmunoensayo indirecto ligado a enzimas tiene muchas aplicaciones en la detección de anticuerpos hacia agentes infecciosos. En el diagnóstico de brucelosis se ha encontrado que la prueba de ELISA indirecta con LPS como antígeno es más sensible y específica que las pruebas de tarjeta y fijación del complemento para el diagnóstico de la infección por *Brucella abortus*. Al analizar sueros problema con ELISA, se ha demostrado que es más específica para la diferenciación entre animales vacunados e infectados.

En el caso de animales adultos ELISA ha sido tan específico como la inmunodifusión radial. En el caso del antígeno se han empleado células completas e incluso Cadena-O separada del lipopolisacárido.

En la prueba de ELISA indirecta se han utilizado varios antígenos como el LPS, HN y proteínas citoplasmáticas de *Brucella melitensis*. La sensibilidad en esta prueba para los diferentes antígenos es de 100% para el LPS y HN y del 96% para las proteínas. La especificidad es del 98% para el LPS y HN y del 94% para las proteínas.

El antígeno a utilizar debe ser previamente titulado para conocer la concentración más adecuada para su posterior uso. El antígeno debe ser diluido en una solución amortiguadora de carbonatos (0.06 M A pH 9.6), La adsorción pasiva del antígeno ocurre cuando se adicionan 100  $\mu$  de la solución del antígeno diluido a la microplaca y se incuba por 24 horas a 37° C. El antígeno que no fue adsorbido es eliminado mediante los tres primeros lavados con una solución amortiguadora de fosfatos adicionado con un detergente (PBS-Tween-20), posteriormente las placas deben ser cubiertas y almacenadas a 4°C en caso de no utilizarse de inmediato (19).

Hay dos parámetros empleados para medir la capacidad de una prueba diagnóstica en cuanto a la diferenciación entre los animales que tienen la enfermedad y de los que no la padecen. La sensibilidad (expresada en porcentaje) es la capacidad de la prueba para identificar de manera exacta a los animales que tienen la enfermedad, es decir, dar al individuo como positivo (19).

Parecería que la sensibilidad es lo único que se debe exigir de una prueba, si se puede identificar de manera exacta a todos los animales que padecen la enfermedad, eso sería suficiente. Sin embargo, es necesario que se incluyan como casos positivos únicamente aquellos con la enfermedad demostrable. De esta delimitación surge el concepto de especificidad. La especificidad (también expresada en porcentaje) es la capacidad de la prueba para proporcionar datos negativos cuando los individuos investigados realmente no presentan la enfermedad problema (19).

El programa para el control de la brucelosis animal en México, está basado en la vacunación con *B. abortus* cepa 19 y *B. melitensis* REV 1, sin embargo, en unidades de producción en las que se practique la vacunación con *Brucella* lisa, pueden esperarse falsos positivos en animales vacunados, porque los anticuerpos presentan reacción cruzada con la infección por la cepa natural (9), las pruebas

serológicas no solamente deben identificar a los animales que han estado en contacto con el antígeno, sino también es preciso poder diferenciar los animales que han sido vacunados y están sanos, de aquellos que habiendo sido vacunados o no, están infectados. Esto es debido a que la vacunación no protege al 100% de los animales; por lo tanto, la prueba serológica ideal sería aquella que fuese simple de realizar y proporcione los resultados con rapidez y repetibilidad, y que fuese capaz de diferenciar los animales infectados de los vacunados, por lo cual, es importante dirigir los diagnósticos a un antígeno que no cause reacción cruzada como lo es el HN.

### **3.-JUSTIFICACIÓN.**

La brucelosis es una enfermedad de curso crónico y en algunos casos de presentación epizootica en las unidades de producción, ocasionando grandes pérdidas económicas (4), actualmente para el diagnóstico se utilizan la prueba de Rosa de Bengala como prueba tamiz, la prueba de Rivanol, Fijación de complemento y Anillo en leche. Todas estas pruebas han enfrentado serias limitaciones por su incapacidad para diferenciar animales vacunados de infectados, especialmente cuando se llevan a cabo prácticas de revacunación. El IDR ha solventado parte de esta problemática debido a su capacidad para detectar animales realmente infectados, sin embargo, su eficiencia es limitada por ser una prueba cualitativa, por lo que el desarrollo y estandarización de una prueba inmunoenzimática de mayor sensibilidad y especificidad con el mismo principio de detección de animales realmente infectados por la utilización del HN como antígeno, permitirá la optimización del diagnóstico (5).

Considerando que actualmente en muchas unidades de producción se practica la revacunación contra la brucelosis y que esto está interfiriendo aún más con los métodos de diagnóstico que se marcan como oficiales, es necesario la estandarización de una prueba efectiva para un diagnóstico oportuno y que presente una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la enfermedad (5).

#### **4.-HIPÓTESIS.**

La estandarización de una prueba de ELISA utilizando el HN de *Brucella abortus* permitirá la detección de animales realmente infectados con una sensibilidad y especificidad aceptable que puede ser útil en el control de la enfermedad de acuerdo a los criterios los criterios normativos oficiales.

#### **5.-OBJETIVO GENERAL.**

Estandarizar una prueba inmunoenzimática (ELISA) que utilice como base antigénica de Hapteno Nativo de *Brucella abortus* y compararla con técnicas oficiales de diagnóstico rutinario.

#### **6.-OBJETIVO PARTICULAR.**

Comprobar que la especificidad de la ELISA-HN es superior a cualquier otra técnica serológica de rutina.

## 7.- MATERIAL Y MÉTODOS.

El proyecto se realizó en El Laboratorio de Diagnóstico en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

**7.1 Muestras.** Para el desarrollo de este trabajo, se contó con muestras de sueros de bovino, que fueron clasificadas en cinco grupos. Los tres primeros fueron tomados de un banco de sueros del Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología Animal, INIFAP, que fueron remitidos para el diagnóstico de brucelosis. Los otros dos grupos correspondieron a sueros procedentes de dos unidades de producción bovina, una considerada como infectada y la otra considerada negativa a brucelosis, ambas ubicadas en Torreón Coahuila, México. Las pruebas a las que fueron sometidos estos últimos dos grupos de animales correspondían a las efectuadas como parte de la campaña contra la brucelosis. Los tres primeros grupos se formaron de acuerdo a los resultados obtenidos en dos pruebas, Tarjeta al 8 % e Inmunodifusión radial (IDR). Las características de estos grupos se resumen en el cuadro 1.

<b>Cuadro 1. Características de las muestras de cada grupo</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Interpretación diagnóstica*</b>	<b>Procedencia</b>
<b>1 (N=41)</b>	Tarjeta 8% positivo, IDR positivo	Animal positivo a brucelosis	Laboratorio de diagnóstico CENID Microbiología animal INIFAP
<b>2 (N=40)</b>	Tarjeta 8% positivo, IDR negativo	Animal posiblemente vacunado, Negativo a brucelosis	Laboratorio de diagnóstico CENID Microbiología animal INIFAP
<b>3 (N=53)</b>	Tarjeta 8% negativo, IDR negativo	Animal Negativo a brucelosis	Laboratorio de diagnóstico CENID Microbiología animal INIFAP
<b>4 (N=100)</b>	Tarjeta 8% positivos y negativos, ELISA-HN positivos y negativos	Bovinos positivos y negativos a brucelosis en contacto.	Unidad de producción Torreón Coahuila
<b>5 (N=100)</b>	Tarjeta 8% negativos, ELISA-HN negativos	Bovinos negativos a brucelosis	Unidad de producción Torreón Coahuila

\*La interpretación diagnóstica estuvo basada en los alcances que tienen ambas pruebas. La prueba de tarjeta se utiliza como prueba tamiz a la que se deben someter el 100 % de animales de una unidad de producción; tiene una sensibilidad del 78% y una especificidad del 100 % (30). La inmunodifusión radial es una prueba que usa como antígeno de detección el HN de *Brucella*, por lo que los animales positivos a esta prueba, se podrían considerar como realmente infectados.

Todas las muestras de suero fueron procesadas con la técnica de ELISA-I utilizando como antígeno de detección el HN de *Brucella abortus*.

**7.2. Estandarización de Antígeno HN.** Se utilizó una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos, donde se llevó a cabo la sensibilización o antigenación con HN. Las diluciones del antígeno que se utilizaron fueron, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 y 1:100 (Anexo 1). Todas estas diluciones fueron hechas en solución de carbonato-bicarbonato (CaBi). (Anexo 2).

Una vez hechas las diluciones, éstas fueron transferidas a las placas de poliestireno de fondo plano, 50  $\mu$ l por pozo, con la distribución siguiente:

Fila A1 a A12 dilución de antígeno 1:20

Fila B1 a B12 dilución de antígeno 1:40

Fila C1 a C12 dilución de antígeno 1:60

Fila D1 a D12 dilución de antígeno 1:80

Fila E1 a E12 dilución de antígeno 1:100

Posteriormente, la misma placa se dividió verticalmente para poder distribuir los sueros controles positivos y negativos, que en este caso servían como anticuerpo primario.

Columnas 1 y 2 suero control positivo No 1

Columnas 3 y 4 suero control positivo No 2

Columnas 5 y 6 suero control positivo No 3

Columnas 7 y 8 suero control negativo No 1

Columnas 9 y 10 suero control negativo No 2

Columnas 11 y 12 suero control negativo No 3

Cuadro 2. Distribución de las diluciones de sueros positivos y negativos en placas antigenadas con HN de <i>Brucella abortus</i>												
Diluciones de antígeno (HN)	Sueros controles positivos						Sueros controles negativos					
	A/1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:20												
1:40	B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1:60	C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1:80	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1:100	E	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	F	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	G	1	2	3	3	3	1	2	2	2	3	3
	H											

**7.2.1 Estandarización de la técnica de ELISA-HN.** La estandarización del método de ELISA-I sólo se realizó para determinar la dilución óptima del antígeno capaz de diferenciar sueros controles positivos de negativos. La estandarización de la dilución de los sueros controles positivos y negativos no se realizó debido a que en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología, por experiencias previas, se tiene establecido una dilución de 1:20 para sueros problema, controles positivos y controles negativos.

Todos los sueros fueron diluidos previamente con solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato y se congelaron hasta su uso.

**7.2.2 Obtención del HN para el desarrollo de la técnica de ELISA.** Se prepararon 60 cajas de cultivo de *Brucella melitensis* 16M (cepa virulenta) en agar Tripticasa-Soya-extracto de Levadura al 2% (TSA-L) las cuales se incubaron de 72 -120 horas a 37°C. Las células se cosecharon en tubos Falcon con 10ml de solución salina estéril por cada tubo utilizado, se agitó suavemente para resuspender las células. Se procedió a centrifugar los tubos Falcon con la suspensión de células de *Brucella melitensis* a 6000 g por un tiempo de 30 minutos, una vez transcurrido este tiempo

se retiró el sobrenadante, se esterilizó y se desechó, las células se resuspendieron en 5 ml de solución salina estéril en un matraz aforado de 100 ml que fue cubierto y se sometió a condiciones de esterilidad en autoclave a 120°C durante 30 minutos para la extracción de los antígenos.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se volvió a colocar en un tubo Falcon, se centrifugó a 6000 g durante 30 minutos.

Una vez centrifugado se procedió a retirar el sobrenadante y se precipitó con tres volúmenes de etanol absoluto frío a 4° C durante 18 horas con agitación (magnética).

Se colocó en tubos Falcon y se centrifugó a 6000 g, durante 15 minutos y se conservó tanto el sedimento (primer precipitado), como el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió el primer precipitado en 5.0 ml de agua destilada estéril, se dializó (con dos cambios) y se liofilizó.

Se añadió al sobrenadante dos volúmenes más de etanol frío y se dejó precipitar a -20 °C de 12-18 horas.

Transcurrido ese tiempo se centrifugó el nuevo precipitado a 6000 g durante 15 minutos y se obtuvo un segundo precipitado, el cual se resuspendió en aproximadamente 3.0 ml de agua destilada estéril y se liofilizó.

NOTA:

EL PRIMER PRECIPITADO contiene proteínas, LPS y una pequeña cantidad de HN; puede emplearse para doble inmunodifusión en gel, pero se requiere de experiencia para identificar las bandas.

EL SEGUNDO PRECIPITADO contiene principalmente HN y una pequeña cantidad de LPS contaminante que no interfiere en los resultados de la prueba de IDR.

El antígeno ya liofilizado se pesa a razón de 1.0 mg de HN y se fracciona en tubos Eppendorff®, este antígeno puede mantenerse bien sellado a temperatura ambiente o bien en congelación a -20 °C. Una vez resuspendido, se mantiene en refrigeración a 4°C.

Para reconstituir el HN cuando sea necesario usarlo, se debe de agregar 1.0 ml de agua destilada estéril por cada 1.0 mg de HN, tomando en cuenta que cuando no se use, debe permanecer en refrigeración a 4°C.

### 7.2.3 Desarrollo de la técnica de ELISA-HN

- Se procedió a antígenar la placa con las diferentes diluciones del HN colocando 50  $\mu$ l del antígeno por pozo y se incubó 24 horas entre 2 y 8°C.
- Después de este periodo, la placa se lavó cuatro veces con 300  $\mu$ l de PBS Tween 20 (Anexo 2).
- La placa fue bloqueada colocando 50  $\mu$ l de leche descremada por pozo al 3% y se incubó a 37°C por una hora, posteriormente se realizó nuevamente el lavado de la placa.
- Se colocaron 50 $\mu$ l del anticuerpo primario en cada pozo (en este caso los sueros controles positivos y negativos) de acuerdo a la distribución mencionada anteriormente. Se incubó una hora a 37°C, transcurrido esto se realizó otro lavado de la placa (Anexo 3).
- Se colocó el anticuerpo secundario (Conjugado-Anti IgG bovino a una dilución 1:2000 (Anexo 4) de acuerdo a las especificaciones del fabricante) colocando 50 $\mu$ l en cada uno de los pozos, se cubrió con papel aluminio y posterior a esto se incubó a 37°C por un lapso de una hora.
- Posterior a esto, se adicionaron a cada pozo, 50 $\mu$ l de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) y se mantuvo en la oscuridad 5 minutos.
- Aun en condiciones de oscuridad., Se realizó la lectura de la placa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 y con la ayuda del programa de cómputo Gen5.

Para establecer el punto de corte se basó en los promedios de la densidad óptica y las desviaciones estándar de cada una de las diluciones del antígeno. Estos datos fueron graficados para determinar con cuántas desviaciones estándar sumadas y restadas a los promedios de los sueros controles positivos y negativos no existía interferencia entre ellos.

Ya establecido el punto de corte y la dilución óptima del antígeno, se procedió a realizar la técnica de ELISA para los cinco grupos de sueros bajo estudio.

### 7.3 Análisis estadístico.

Los resultados de D.O. se expresaron como la media de ( $\pm$  DS) y fueron analizados por el Índice de concordancia Kappa (K) esto para determinar el grado de acuerdo entre los resultados de IDR y Tarjeta al 8% contra los resultados obtenidos de la ELISA-HN.

**Cuadro 3. Valoración del coeficiente kappa**

<b>Coeficiente kappa</b>	<b>Fuerza de la concordancia</b>
0,00	Pobre ( <i>Poor</i> )
0,01 - 0,20	Leve ( <i>Slight</i> )
0,21 - 0,40	Aceptable ( <i>Fair</i> )
0,41 - 0,60	Moderada ( <i>Moderate</i> )
0,61 - 0,80	Considerable ( <i>Substantial</i> )
0,81 - 1,00	Casi perfecta ( <i>Almost perfect</i> )

La concordancia Kappa fue calculada utilizando el programa de Excel mediante la siguiente formula:

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

$$Pe = \frac{F1 \times C1 + F2 \times C2}{n^2}$$

Po= Numero de acuerdos/ (Número de acuerdos + número de desacuerdos).

	+	-	Total
+	A	B	F1
-	C	D	F2
Total	C1	C2	n

## 8. RESULTADOS.

**8.1 Estandarización de antígeno HN.** En el cuadro 4, se observan las lecturas de densidad óptica obtenidas con las diferentes diluciones del antígeno cuando fueron enfrentadas a los sueros controles positivos y negativos. Como puede observarse, las lecturas de los sueros controles positivos van disminuyendo conforme la dilución del antígeno aumenta. En la dilución del antígeno 1:100, los valores de los sueros controles positivos, son similares a los obtenidos en los controles negativos. En tanto, en la dilución 1:80, se puede observar que las lecturas obtenidas en sueros controles positivos difieren en un rango razonable de los sueros controles negativos, por lo que se procedió a determinar el punto de corte, esto calculando el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos con los diferentes sueros controles positivos y negativos, cada una de las diluciones realizadas a los controles positivos, así mismo el promedio y desviación estándar general de los sueros controles negativos.

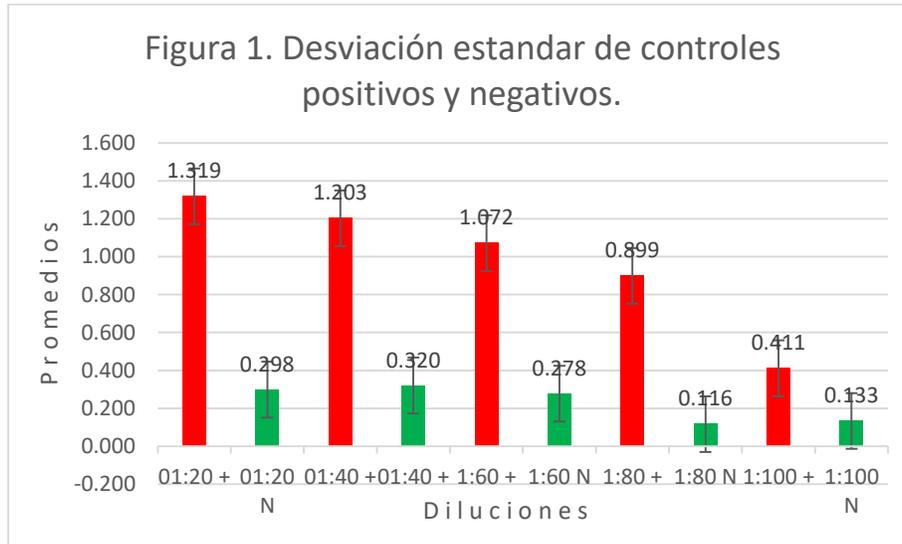
Cuadro 4. Resultados de ELISA para controles negativos y positivos, promedios y desviaciones estándar.																
Dilución del antígeno (HN)	Controles positivos								Controles negativos							
	A/1	2	3	4	5	6	Promedio controles +	Desviación estándar Sueros +	7	8	9	10	11	12	Promedio controles negativos	Desviación estándar controles negativos
1:20	1.225	1.407	1.250	1.551	1.287	1.195	1.319	0.135	0.388	0.295	0.156	0.269	0.346	0.335	0.298	0.081
1:40	B 1.161	1.298	1.109	1.230	1.250	1.170	1.203	0.069	0.356	0.299	0.287	0.321	0.276	0.382	0.320	0.041
1:60	C 1.100	0.101	0.974	1.156	1.116	0.982	1.072	0.075	0.241	0.351	0.252	0.297	0.269	0.256	0.278	0.041
1:80	D 0.952	0.989	0.859	0.798	1.111	0.687	0.899	0.150	0.101	0.152	0.098	0.126	0.119	0.102	0.116	0.021
1:100	E 0.523	0.462	0.323	0.589	0.250	0.320	0.411	0.133	0.085	0.154	0.200	0.162	0.132	0.065	0.133	0.050

Se analizó los datos correspondientes a la dilución 1:80 en la cual se observó que restando dos desviaciones estándar a los controles positivos y sumando dos desviaciones estándar a los controles negativos, no hay superposición de resultados, por lo que esta dilución fue seleccionada para la realización de las pruebas en los cinco grupos de trabajo (Figura 2).

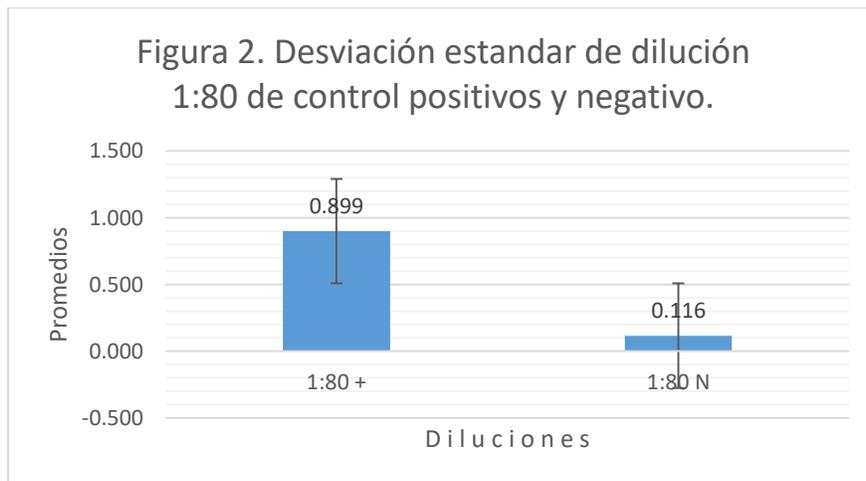
Derivado de lo anterior, se determinó que el rango de datos para el punto de corte es el siguiente:

>0.601 positivos

>0.600 negativos



**Figura 1. Desviación estándar de controles positivos y negativos.**- Se graficaron los promedios de controles positivos y negativos de cada una de las diluciones, así mismo se agregó la desviación estándar y se observó que en la dilución 1:100 la desviación estándar se superponía considerablemente en comparación con la desviación estándar de los controles negativos, por lo tanto se rechazó inmediatamente como una posible dilución a utilizar. En la dilución 1:80 se observa que la desviación estándar presenta un buen rango de valores en comparación a la desviación estándar de los controles negativos, por lo tanto es considerada para la realización de la técnica de ELISA-HN.



**Figura 2. Desviación estándar de dilución 1:80 y controles negativos.** En un principio la desviación estándar de la dilución 1:80 nos mostraba un gran rango de datos en comparación con el promedio de los controles negativos, por lo cual se procedió a realizar una segunda desviación estándar en la cual el rango se redujo considerablemente, esto sin superponerse ambas desviaciones estándar, considerando lo anterior se seleccionó esta dilución para el análisis de resultados en cada uno de los cinco grupos seleccionados.

Una vez establecido el punto de corte y la dilución óptima del antígeno, se procedió a la realización de la técnica de ELISA-I para todos los grupos de sueros bajo estudio.

## **8.2 Grupos procedentes del Laboratorio de Diagnóstico CENID Microbiología Animal-INIFAP**

Una vez terminado las pruebas de ELISA-HN para los grupos de sueros procedentes del Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología Animal se procedió al análisis de los mismos, comparando los resultados procedentes de Tarjeta al 8% e IDR para cada uno de los sueros.

### Porcentaje de igualdad

En el Grupo 1 de sueros, Tarjeta positivo e IDR positivo, donde la interpretación diagnóstica era de animales positivos a brucelosis, 39/41 (95.12%) resultaron positivos al ELISA-HN.

En el Grupo 3 de sueros, Tarjeta negativo e IDR negativo, donde la interpretación diagnóstica era de animales negativos a brucelosis, 45/53 (84.9%) resultaron negativos al ELISA-HN.

En el Grupo 2 de sueros, Tarjeta positivo e IDR negativo, donde la interpretación diagnóstica era de animales posiblemente vacunados, negativos a brucelosis, 27/40 (67.5%) resultaron positivos al ELISA-HN.

### Índices de concordancia entre pruebas

Para el índice de concordancia se unificaron los sueros procedentes del Laboratorio de diagnóstico del CENID Microbiología Animal obteniéndose los siguientes resultados:

El índice de concordancia de Tarjeta 8%-HN (Cuadro 5) fue de  $K=0.64$  lo que se interpreta como concordancia considerable (41, 42, 43). De un total de 134 sueros utilizados, se obtuvieron 66 positivos a ambas pruebas, 45 negativos a ambas pruebas y 23 resultados discordantes (positivos a una prueba y negativos a la otra).

	<b>Cuadro 5. Concordancia de resultados para prueba de Tarjeta 8%- ELISA (HN), GRUPO UNICO.</b>					
	<b>HN +</b>		<b>HN N</b>		<b>Total (n)</b>	<b>Total (%)</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>		
<b>Tarjeta 8% +</b>	66	49.2%	15	11.1	81	60.5%
<b>Tarjeta 8% N</b>	8	5.9%	45	33.5	53	39.5%
<b>Total</b>	74	55.22%	60	44.7	134	100

El índice de concordancia Tarjeta 8%-IDR (Cuadro 6) fue de  $K=0.44$  lo que se interpreta como concordancia moderada (41, 42, 43). De un total de 134 sueros utilizados, se obtuvieron 41 positivos a ambas pruebas, 53 negativos a ambas pruebas y 40 discordantes (positivos a una prueba y negativos a la otra).

	<b>Cuadro 6. Concordancia de resultados para prueba de Tarjeta 8%-IDR, GRUPO UNICO.</b>					
	<b>IDR +</b>		<b>IDR N</b>		<b>Total (n)</b>	<b>Total (%)</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>		
<b>Tarjeta 8% +</b>	41	30.597	40	29.850	81	60.447
<b>Tarjeta 8% N</b>	0	0	53	39.552	53	39.552
<b>Total</b>	41	30.597	93	69.132	134	100

El índice de concordancia de las pruebas IDR-HN (Cuadro 7) fue de  $K=0.46$  lo que se interpreta como concordancia moderada (41, 42, 43). De un total de 134 sueros utilizados, se obtuvieron 39 positivos a ambas pruebas, 58 negativos a ambas pruebas y 37 resultados discordantes (positivos a una prueba y negativos a la otra)

	<b>Cuadro 7. Concordancia de resultados para prueba de Tarjeta IDR-HN, GRUPO UNICO.</b>					
	<b>HN +</b>		<b>HN N</b>		<b>Total (n)</b>	<b>Total (%)</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>		
<b>IDR +</b>	39	29.1	2	1.49	41	30.5
<b>IDR N</b>	35	26.1	58	43.2	93	69.4
<b>Total</b>	74	55.2	60	44.7	134	100

Posteriormente se procedió a trabajar con los grupos restantes, para los cuales se compararon los resultados proporcionados por el laboratorio procedente de Torreón Coahuila con los resultados obtenidos en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología Animal.

### 8.3 Grupos procedentes de Torreón Coahuila

Grupo 4 Tarjeta 8% positivos y negativos, ELISA-HN positivos y negativos

El índice de concordancia en Tarjeta 8% INIFAP-Tarjeta 8% Torreón (Cuadro 8) fue de  $K=0.66$  lo que se interpreta como concordancia considerable (41, 42, 43). De un total de 100 sueros utilizados, se obtuvieron 44 positivos a ambas pruebas, 39 negativos a ambas pruebas y 17 resultados discordantes (positivos a una prueba y negativos a la otra)

	<b>Cuadro 8. Concordancia de resultados para prueba de TARJETA 8% INIFAP VS Torreón GRUPO POSITIVOS Y NEGATIVOS</b>					
	<b>TARJETA 8% TORREÓN +</b>		<b>TARJETA 8% TORREÓN N</b>		<b>Total (n)</b>	<b>Total (%)</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>		
<b>TARJETA 8% INIFAP +</b>	44	44%	14	14%	58	58%
<b>TARJETA 8% INIFAP N</b>	3	3%	39	39%	42	42%
<b>Total</b>	47	47%	53	53%	100	100%

El índice de concordancia de las pruebas HN INIFAP-HN Torreón (Cuadro 9) fue de  $K=0.24$  lo que se interpreta como concordancia leve (41, 42, 43). De un total de 100 sueros utilizados, se obtuvieron 35 positivos a ambas pruebas, 23 negativos a ambas pruebas y 42 resultados discordantes.

	<b>Cuadro 9. Concordancia de resultados para prueba de ELISA (HN) GRUPO POSITIVOS Y NEGATIVOS</b>					
	<b>ELISA HN TORREÓN (+)</b>		<b>ELISA HN TORREÓN (N)</b>		<b>Total (n)</b>	<b>Total (%)</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>		
<b>ELISA HN INIFAP +</b>	35	35%	38	38%	73	73%
<b>ELISA HN N INIFAP</b>	4	4%	23	23%	27	27%
<b>Total</b>	39	39%	61	61%	100	100%

Grupo 5, Tarjeta 8% negativos, ELISA-HN negativos

El porcentaje de igualdad en el grupo de negativos para los sueros procesados en Torreón comparado con los resultados obtenidos en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología en la prueba Tarjeta 8% fue de 100% (Cuadro 10).

	<b>Cuadro 10. Porcentaje de igualdad de resultados para prueba de Tarjeta al 8% NEGATIVOS</b>					
	<b>Tarjeta 8% TORREÓN +</b>		<b>Tarjeta 8% TORREÓN N</b>			
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Total (n)</b>	<b>Total (%)</b>
<b>Tarjeta 8% INIFAP +</b>	0	0%	0	%	0	0%
<b>Tarjeta N INIFAP</b>	0	0%	100	%	100	100%
<b>Total</b>	0	0%	100	%	100	100%

El porcentaje de igualdad en el grupo de negativos para los sueros procesados en Torreón comparado con los resultados obtenidos en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología en la prueba ELISA-HN fue de 95% (Cuadro 11).

	<b>Cuadro 11. Porcentaje de igualdad de resultados para prueba de ELISA (HN) NEGATIVOS</b>					
	<b>ELISA HN TORREÓN +</b>		<b>ELISA HN TORREÓN N</b>			
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Total (n)</b>	<b>Total (%)</b>
<b>ELISA HN INIFAP +</b>	0	0%	5	5%	5	5%
<b>ELISA HN INIFAP N</b>	0	0%	95	95%	95	95%
<b>Total</b>	0	0%	100	100%	100	100%

## 9.- DISCUSIÓN.

El diagnóstico de brucelosis bovina se basa principalmente en pruebas serológicas, que están diseñadas para la detección de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos de la bacteria. En este trabajo se estandarizó una prueba inmunoenzimática tipo ELISA, en la cual, se utilizó como antígeno de detección el HN de *Brucella abortus*. La presencia de anticuerpos específicos contra este compuesto, depende de la intensidad del estímulo antigénico, por lo que, sólo en la infección natural se induce la producción de anticuerpos frente al HN, posiblemente por la multiplicación activa de la cepa virulenta, que causa un estímulo intenso y prolongado, proporcionando así un método más específico para detectar animales realmente infectados (27). Actualmente, la prueba de inmunodifusión radial, la cual utiliza como antígeno de detección al HN, ha demostrado tener una buena especificidad, pero una sensibilidad relativamente baja (19,38), por lo que la combinación entre una prueba de ELISA y el uso del HN como antígeno de detección, ofrece una prueba de alta sensibilidad y especificidad.

El diagnóstico oficial de brucelosis bovina según la NOM-041-ZOO-1995, debe realizarse mediante la prueba de tarjeta (prueba Tamiz), rivanol y fijación de complemento como pruebas complementarias. Estas pruebas se han visto rebasadas en cuanto a sus alcances. El problema principal de estas pruebas, es la gran cantidad de animales falsos positivos, ya que el antígeno de detección, es el antígeno o cadena "O" de *Brucella*. Los falsos positivos pueden deberse a reacciones cruzadas ocasionadas por infecciones con otros agentes, como *Yersinia enterocolitica* serotipo O9, *Salmonella urbana*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas maltophilia*, así como a prácticas inadecuadas de revacunación, independientemente si éstas se realizan con Cepa 19 o con RB51, entre otras. (35, 28).

En la prueba de ELISA estandarizada en este trabajo, el punto de corte fue establecido a través del siguiente método se consideró el promedio y dos desviaciones estándar de controles positivos y negativos (39), con lo cual no se obtuvo ningún animal sospechoso, obteniéndose así un rango un punto de corte convincente para el análisis de resultados.

En el presente trabajo se utilizaron 5 grupos de sueros. En donde el primer grupo fue catalogado como grupo positivo a *Brucella abortus*, debido a que el 100% de muestras tenían resultados positivos a Tarjeta e IDR. Para este grupo, en la prueba de ELISA-HN se obtuvo un 95.12% de resultados positivos y el 4.8% negativos, lo que indica que la validez de la ELISA-HN desarrollada. La discordancia obtenida se puede deber a la presencia de animales falsos positivos, ya que, la técnica de ELISA tiene una mayor especificidad que la técnica de IDR. Además, de que la IDR es una prueba cualitativa y depende del factor humano para su interpretación e implica que pueden obtenerse errores respecto a la lectura de resultados que pueden variar de persona a persona.

El segundo grupo tenía las características de ser 100% positivo a tarjeta y 100% negativo a IDR, los cuales, según el alcance de la prueba de IDR se consideran como sueros negativos, pero según la prueba de tarjeta, podrían corresponder a animales vacunados, a reacciones cruzadas, o a animales brucelosos no detectados por IDR. En este grupo, en la ELISA-HN se obtuvieron 67.5% de sueros positivos y el 32.5% negativos, la discordancia obtenida se asocia a la presencia de animales falsos negativos a IDR por la relativa baja sensibilidad de la prueba.

Respecto al tercer grupo de sueros con características de Tarjeta e IDR negativos, al correrse prueba de ELISA se obtuvo 84.9% de sueros negativos y un 15.08% de sueros positivos. Sin embargo, cuatro animales que resultaron positivos, estaban muy cercanos al punto de corte.

En los tres grupos se observó que aunque la prueba de Rosa de Bengala es una buena prueba tamiz, se necesita de una prueba más específica para ser utilizada como confirmatoria (33), ya que se observa que sueros que resultaron positivos en la prueba de Tarjeta, resultan negativos (falsos positivos) en la prueba de IDR, y así mismo, en estos mismos sueros, al trabajarse con ELISA-HN se obtuvo que aun después de ser positivos a IDR resultan como negativos a la prueba de ELISA-HN, por lo tanto, se confirma que la técnica estandarizada tiene una alta especificidad comparada con las anteriores. Cabe mencionar que aunque la prueba de Tarjeta es una prueba con alta sensibilidad, al momento de diferenciar animales vacunados de

infectados, su capacidad es mala, lo que se hace más evidente en bovinos revacunados (34).

Los sueros de los grupos uno, dos y tres, procedentes del Laboratorio de diagnóstico del CENID Microbiología Animal, se unificaron en un solo grupo, con el fin de realizar un análisis de concordancia y determinar los índices de Kappa.

En la evaluación del índice de concordancia entre **Tarjeta y ELISAHN** se obtuvo un índice Kappa de 0.64, lo cual se interpreta como considerable (43), así mismo se obtuvo 23 sueros discordantes, por lo que se debe considerar que las pruebas de tarjeta y rivanol, utilizan como antígeno de detección el LPS de *Brucella*, por lo que el porcentaje de positividad más alto de estas pruebas puede deberse a reacciones cruzadas con otras bacterias tales como *Yersinia enterocolitica*, obteniéndose en consecuencia resultados falsos positivos (28), explicando así la discordancia antes mencionada.

En la evaluación del índice de concordancia entre **Tarjeta e IDR** se obtuvo un índice Kappa de 0.44, lo cual se interpreta como moderado, así como 40 sueros discordantes. Debe considerarse que la prueba de inmunodifusión Radial (IDR) usando como antígeno el hapteno nativo, presenta 96% de sensibilidad y aproximadamente un 80% de especificidad, para el diagnóstico diferencial de vacas infectadas con *B. abortus* o vacunadas con Cepa 19, puede determinar la presencia de un antígeno (6), por lo que se justifica que el índice de concordancia sea bajo, ya que como se mencionó IDR presenta una alta especificidad compara con la prueba de Tarjeta.

En la evaluación del índice de concordancia entre **IDR e HN** se obtuvo un índice Kappa de 0.46, lo cual se considera como moderada, así mismo se obtuvo 35 sueros discordantes, para lo cual se debe tomar en cuenta que aunque Inmunodifusión Radial (IDR) usa como antígeno el HN, es una prueba cualitativa (6) dependiente de la visualización de un halo que se forma en el gel de agar donde se lleva a cabo y la observación o no de este se utiliza para considerar una muestra positiva o negativa. Comparado con la ELISA cuya especificidad depende del tipo de antígeno utilizado, que será tanto mayor mientras éste sea más selectivo para anticuerpos específicos, en la cual se ha evaluado la especificidad y sensibilidad

utilizando diversos antígenos y se ha demostrado que la especificidad es mayor con el uso de antígenos recombinantes (31), tal como lo muestra *Reyes* (1996), quien realizó un estudio en donde probó la especificidad y sensibilidad de diferentes pruebas diagnósticas en becerras de tres a nueve meses, vacunadas con dosis clásica de cepa 19 de *B. abortus*, encontrando que IDR fue la segunda prueba más específica para diferenciar animales infectados de vacunados después de ELISA (29). Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo anterior, ya que en sueros que se presentaron como negativos a IDR, se obtuvieron resultados positivos en la técnica de ELISA, demostrando que al ser una prueba cuantitativa y al tener una mayor especificidad, se pueden obtener mejores resultados. Se debe tomar en cuenta que las múltiples comparaciones de técnicas inmunoenzimáticas realizadas con respecto a las convencionales, han demostrado en su mayoría, que su aplicación podría agilizar programas de control y erradicación de la enfermedad y garantizar el comercio internacional, sugiriendo así la utilización del ELISA indirecto, como prueba confirmatoria de elevada sensibilidad con respecto a la prueba de Rosa de Bengala y del ELISA competitivo con respecto a la fijación de complemento como prueba confirmatoria y diferencial del estatus de infección o vacunación de los animales reactivos positivos en la prueba indirecta (32).

En el **cuarto grupo** de sueros (procedentes de Torreón Coahuila), a los cuales se les habían hecho las pruebas de Tarjeta y ELISA-HN en un laboratorio particular y en los que se encontraban sueros positivos y negativos a ambas pruebas, se determinó la concordancia entre las pruebas realizadas en ese laboratorio y las realizadas en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología Animal. La concordancia entre la prueba de Tarjeta realizada en el laboratorio comercial y la realizada en el CENID Microbiología Animal, tuvo un índice kappa de 0.66, lo que se interpreta como considerable e indica que la prueba tiene una buena concordancia, sin embargo, se obtuvo un 17% de sueros discordantes, lo que puede deberse a que las condiciones de trabajo de cada laboratorio es diferente y pueden influir la calidad de reactivos entre otros obteniendo así resultados diferentes, de igual modo es importante tener en cuenta que la calidad del antígeno utilizado debe de ser óptima, ya que de no ser así, aunque se esté valorando el mismo suero se

pueden obtener resultados erróneos, del mismo modo se debe tomar en cuenta que el Laboratorio del CENID Microbiología Animal, es un laboratorio acreditado por la EMA (Entidad Mexicana de Acreditación) para el diagnóstico serológico de brucelosis, que cuenta con capacitación constante de su personal, con calibración y mantenimiento constante de material de laboratorio, del mismo modo se llevan a cabo verificaciones regulares acerca de calidad y el correcto manejo de los reactivos utilizados, lo que asegura la confiabilidad de sus resultados.

Al evaluarse la concordancia de ELISA-HN entre ambos laboratorios, se obtuvo un índice de concordancia de 0.24 lo que se considera una concordancia aceptable y donde se observó que existía una discordancia del 42%, esta discordancia podría estar dada entre otras cosas a la calidad del antígeno (HN), se debe tomar en cuenta que en el Laboratorio de Diagnóstico de CENID Microbiología Animal se produce el HN y durante todo su proceso se cuidan entre otras cosas, tiempos y temperaturas para su óptima obtención, así mismo, después de ser elaborado se mantiene siempre liofilizado y únicamente se reconstituye cuando se requiere (tomando en cuenta que una vez reconstituido debe de mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4°C), por lo tanto al momento de ser utilizado para la técnica de ELISA-HN, únicamente permanece afuera al momento de su medición, lo que reduce considerablemente posibles alteraciones que alteren su calidad, por otro lado, el HN que es usado en Torreón es producido también en el CENID Microbiología Animal. Sin embargo, durante el transporte puede sufrir algún tipo de alteración, por exceder el tiempo de traslado, o incluso por el mal manejo que se le puedan dar los encargados de la empresa de paquetería. También, se desconoce el punto de corte utilizado para la interpretación de los resultados, factores que pueden explicar la discordancia observada respecto a resultados obtenidos en la misma técnica utilizada.

En el **grupo cinco** con características Tarjeta negativos y ELISA-HN negativos, al evaluar la prueba de Tarjeta entre ambos laboratorios, se obtuvo un porcentaje de igualdad de 100% lo que podría considerarse como excelente.

En este último grupo, al evaluarse la prueba de ELISA-HN entre ambos laboratorios se obtuvo un porcentaje de igualdad del 95%, lo que podría considerarse como una

igualdad buena, se debe tomar en cuenta que la desigualdad obtenida puede deberse a factores como calidad del antígeno, habilidad o experiencia del técnico, así como al punto de corte utilizado para la interpretación de resultados, ya que como se mencionó anteriormente se desconoce qué punto de corte se utilizó para los sueros procedentes de Torreón. También, es importante resaltar, que para sueros francamente negativos, no existen problemas de discordancia en la interpretación de resultados, quizá porque los animales negativos no tienen anticuerpos específicos contra *Brucella*, en niveles basales detectables.

Se debe tener en cuenta que el diagnóstico definitivo de la brucelosis se lleva a cabo con el aislamiento de *Brucella spp*, a partir de tejidos, líquidos corporales y leche. La confirmación de la presencia de este microorganismo en cualquiera de las muestras, significa que el animal es positivo, aún en ausencia de anticuerpos séricos. Son escasos los laboratorios que cuentan con capacidad para el aislamiento bacteriológico de brucelas, además de que los procedimientos bacteriológicos no son siempre exitosos, son tardados y representan un gran riesgo de infección para los técnicos de laboratorio (28).

La prueba de ELISA-HN desarrollada y estandarizada en este trabajo, demuestra ser una alternativa para el diagnóstico de la brucelosis bovina, con la característica de tener una alta sensibilidad y especificidad relativa, por lo que se puede utilizar como prueba confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis bovina. Así la posibilidad de ser incluida en la NOM041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

## 10. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y estandarizó una prueba de ELISA que usa como antígeno de detección el Hapteno Nativo de *Brucella abortus*, que mostro una sensibilidad y especificidad relativamente alta.
- Las discordancias de la ELISA HN que se observaron con la prueba de tarjeta e IDR se asociaron a la mayor sensibilidad y especificidad que muestra esta prueba.
- Las pruebas de Tarjeta e IDR mostraron una menor sensibilidad comparadas con la prueba de ELISA desarrollada, lo que indica que con estas pruebas pueden existir animales falsos negativos.
- La prueba de ELISA es una prueba con cierto grado de complejidad, que si se realiza en otros laboratorios se pueden alcanzar discordancias muy altas, derivadas por diferentes factores como: punto de corte inadecuado, capacitación inadecuada del personal, entre otras.

## 11.-BIBLIOGRAFIA

1. Miranda (2012), Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud
2. Gasque (2008), Enciclopedia Bovina, Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Primera Edición, México
3. Coelho, A., García-Díez, J., & Coelho, A. C. (2014). Brucelosis en pequeños ruminantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. *REDVET Rev Electrón Vet*, 15(05).
4. NOM, N. O. M. (1996). 041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. *Publicada en el Diario Oficial de la Federación el, 20.*
5. López, J., & Best, A. (1998). Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). *Archivos de medicina veterinaria*, 30(1), 133-138.
6. Miranda EG, Andrade, L. H., & Aparicio, E. D. (2012). Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo, para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 44(2), 269-276.
7. Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary microbiology*, 90(1), 447-459.
8. Aparicio, E. D., Andrade, L. H., Díaz, V. O., Martínez, J. M. B., & Güemes, F. S. (2000). Evaluación de la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis en caprinos. *Vet. Méx*, 31(1), 53.
9. Brucelosis bovina (2012), O. I. E. Manual de la OIE sobre animales terrestres
10. López-Merino A, López Santiago R. (1989) Immunology of Brucellosis in humans. En: Madkour MM, ed. Brucellosis. Cambridge: Butterworths

11. Claro Agreda, Perdidas económicas por brucelosis bovina en un hato lechero (provincia Andrés Ibáñez, departamento de Santa Cruz) [tesis licenciatura]. Santa Cruz de la Sierra Bolivia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno
12. Merchant, I.A. y Packer, R.A. (1980) Bacteriología y Virología Veterinaria. Traducida de la 6ta. ed. en Inglés al Español por Cordero I. 2. ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 71 - 78.
13. Figueroa (1984), Enfermedades infecciosas de los animales en Centroamérica. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
14. Rojas Campos, N. (1995). El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas, recientes avances en estructura, genética y bioquímica. *Rev. costarric. cienc. méd*, 16(3), 71-84.
15. Caroff, M., Bundie, D. R., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. and Duncan, J. R. (1984). Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect. Immun.*; 46:384-389.
16. Castro, H. A., González, S. R., & Prat, M. I. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(2), 203-216.
17. Pontow S, Kery V, Stahl D. (1992). Mannose receptor. *Int Rev Cytol*; 137: 221-41
18. Aréstegui MB, Gualtieri CS, Domínguez J, Scharovsky G. (2001). El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet Mex* 2001; 32(2): 131-9.
19. Díaz-Aparicio, Hernández-Andrade, Manual de brucelosis animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. SAGARPA.
20. Thomsen, A. (1943). Does the bull spread infectious abortion in cattle? Experimental studies from 1936 to 1942. *J. Pathol.* 53:199-211.
21. Olascoaga, C. (2003). Informe sobre vacunas y vacunación contra Brucelosis bovina. *Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*, Año LXIII, Vol. 38, 25-30.

22. De Bagüés, M. J., Elzer, P. H., Jones, S. M., Blasco, J. M., Enright, F. M., Schurig, G. G., & Winter, A. J. (1994). Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infection and immunity*, 62(11), 4990-4996.
23. Palmer, M. V., Cheville, N. F., & Jensen, A. E. (1996). Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Veterinary pathology*, 33(6), 682-691.
24. Olsen, S. C., Stevens, M. G., Cheville, N. F., & Schurig, G. (1997). Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(4), 363-367.
25. Cheville, N. F., Olsen, S. C., Jensen, A. E., Stevens, M. G., Palmer, M. V., & Florance, A. M. (1996). Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *American journal of veterinary research*, 57(8), 1153-1156.
26. Suárez, G. F., Arellano, R. B., & Díaz-Aparicio, E. (2009). Brucelosis: Importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico. FMVZ UNAM CENID Microbiología INIFAP SAGARPA; 1: 1-12
27. Bustamante Sánchez, Salazar Hernández, Díaz Aparicio, Manzano Cañas, Pérez González, & Hernández Andrade (2012). Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis de vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 38(1).
28. Rentería Evangelista, Organes De los Santos, Medina Basulto, Nielsen, Montañó Gómez, Moreno Rosales, Pujol Manríquez, (2005). Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Técnica Pecuaria en México*, enero-abril, 117-126.

29. Reyes, P. R. (1996). Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina [tesis licenciatura]. *México DF México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.*
30. Torres, E. D. N., Aparicio, E. D., Quezada, et al., (1997). Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. *Veterinaria México*, 28(3), 241-245.
31. Medina, M. (2002). Validación del inmunoensayo enzimático (ELISA) y hemoaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*, 6(3), 4.
32. Martínez, K. M., & Flores, C. L. (2012). Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con ELISA para el diagnóstico de brucelosis bovina. *REDVET-Rev. electrón. vet.-Revista electrónica de Veterinaria*, 13(2).
33. Bouza et al., 2005; Yildiz et al., 2005-- Bouza, E., Sánchez-Carrillo, C., Hernangomez, S., González, M.J. Laboratory-acquired brucellosis: A Spanish national survey. *J.Hosp Infect* 2005; 61:80-83).
34. Aparicio-Bahena, Díaz-Aparicio, et al., 2003, Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Téc Pecu Méx* 2003; 41 suppl 2:129-140
35. Mittal KR, Tizard IR. (1980). Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res Vet Sci*; 28(3):311-314.
36. Ficha técnica: Kit para la detección de anticuerpos del Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV)/SueroPlus. HerdChek\* BVDV ag/SerumPlus. IDEXX Laboratories Zul. Nr. BGVV-B233. Versión 06-43860-02.
37. Crowther JR. (2001). The ELISA guidebook. *Methods in molecular biology*; Vol. 149. USA: Humana press; 1 - 8; 45 – 82.

38. Díaz-Aparicio, E. E. (1994). Evaluación de pruebas serológicas para el diagnóstico de infección de *Brucella melitensis* en cabras. In *Proceedings. XVIII World Buiatrics Congress, August 29-September 2, 1994, Bologna, Italy* (No. 636.2 WORp 1994 v. 2).
39. Espinoza, Huapaya, Suárez, Chávez, Sevilla, Carlos, Dávila, Elizabeth, Huiza, Alina, Náquira, César, & Alva, Pilar. (2003). Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana. *Anales de la Facultad de Medicina*, 64(1), 7-12.
40. Winter, A. J., Rowe, G. E., Duncan, J. R., Eis, M. J., Widom, J., Ganem, B., & Morein, B. (1988). Effectiveness of natural and synthetic complexes of porin and O polysaccharide as vaccines against *Brucella abortus* in mice. *Infection and Immunity*, 56(11), 2808–2817.
41. De Ullibarri Galparsoro, L., & Pita Fernández, S. (1999). Medidas de concordancia: el índice de Kappa. *Cad Aten Primaria*, 6, 169-171.
42. Abraira, V. (2001). El índice kappa. *Semergen-Medicina de Familia*, 27(5), 247-249.
43. Cerda, J., & Villarroel Del, L. U. I. S. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista chilena de pediatría*, 79(1), 54-58.

## 12.-ANEXO

**Anexo 1.-** Cálculo del antígeno (HN) dependiendo de la dilución a utilizar para la estandarización y cálculo de anticuerpo primario (sueros problema).

### Cálculo del antígeno (HN)

#### Dilución 1:20

Pozos totales en placa: 96

Posibles errores de pipeteo: 4

Total de pozos a tomar en cuenta para la dilución: 100

$100 \text{ pozos} \times 50\mu\text{l} = 5000\mu\text{l} = 5 \text{ ml de Ag-HN diluido por placa}$

$\text{Dilución } 1:20 = 5000 \mu\text{l} / 20 = 250 \mu\text{l de HN diluido}$

$4750 \mu\text{l de CaBi}$

$= 5000 \mu\text{l de Ag}$

#### Dilución 1:40

Pozos totales en placa: 96

Posibles errores de pipeteo: 4

Total de pozos a tomar en cuenta para la dilución: 100

$100 \text{ pozos} \times 50\mu\text{l} = 5000\mu\text{l} = 5 \text{ ml de Ag-HN diluido por placa}$

$\text{Dilución } 1:40 = 5000 \mu\text{l} / 40 = 125 \mu\text{l de HN diluido}$

$4875 \mu\text{l de CaBi}$

$= 5000 \mu\text{l de Ag}$

#### Dilución 1:60

Pozos totales en placa: 96

Posibles errores de pipeteo: 4

Total de pozos a tomar en cuenta para la dilución: 100

$100 \text{ pozos} \times 50\mu\text{l} = 5000\mu\text{l} = 5 \text{ ml de Ag-HN diluido por placa}$

$\text{Dilución } 1:60 = 5000 \mu\text{l} / 60 = 83.3 \mu\text{l de HN diluido}$

$4916.7 \mu\text{l de CaBi}$

$= 5000 \mu\text{l de Ag}$

Dilución 1:80

Pozos totales en placa: 96

Posibles errores de pipeteo: 4

Total de pozos a tomar en cuenta para la dilución: 100

$100 \text{ pozos} \times 50 \mu\text{l} = 5000 \mu\text{l} = 5 \text{ ml de Ag-HN diluido por placa}$

$\text{Dilución } 1:80 = 5000 \mu\text{l} / 80 = 62.5 \mu\text{l de HN diluido}$

$4937.5 \mu\text{l de CaBi}$

$= 5000 \mu\text{l de Ag}$

Dilución 1:100

Pozos totales en placa: 96

Posibles errores de pipeteo: 4

Total de pozos a tomar en cuenta para la dilución: 100

$100 \text{ pozos} \times 50 \mu\text{l} = 5000 \mu\text{l} = 5 \text{ ml de Ag-HN diluido por placa}$

$\text{Dilución } 1:100 = 5000 \mu\text{l} / 100 = 50 \mu\text{l de HN diluido}$

$4950 \mu\text{l de CaBi}$

$= 5000 \mu\text{l de Ag}$

Cálculo de anticuerpo primario (sueros problema).

$\text{Dilución } 1:20 = 200/10 = 10 \text{ correspondiente a } 10 \mu\text{l de suero problema} - \text{antígeno primario.}$

$190 \mu\text{l de CaBi}$

$200 \mu\text{l de volumen total}$

**Anexo 2.- Metodología y material de CaBi.**

<b>Cuadro 12. Reactivos para elaborar CaBi (Solución amortiguadora Carbonato-Bicarbonato).</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (carbonato de sodio)	3.56 g
NaCO <sub>3</sub> H (bicarbonato de sodio)	8.40 g
NaN <sub>3</sub> (Azida de sodio)	0.2 g
H <sub>2</sub> O Destilada (agua destilada)	1.0 l

1. Con la ayuda de una probeta se mide 1 litro de agua y se coloca en un frasco
2. Se colocan los reactivos en el orden marcado en la tabla anterior
3. Se ajusta el pH a 9.6
4. Se refrigera hasta su uso.

**Anexo 3.- Metodología y material para la elaboración de Tween-20.**

<b>Cuadro 13. Reactivos para elaborar TWEEN-20</b>	
Agua destilada	900 ml
Tween-20	500 $\mu$ l
Solución PBS 1X	100 ml

1. Con la ayuda de una probeta colocar 900 ml de agua destilada en un frasco de vidrio
2. Colocar 100 ml de Solución PBS 1X
3. Agregar 500  $\mu$ l de Tween-20
4. Mezclar y refrigerar hasta su uso

**Anexo 4.- Cálculo para la dilución del anticuerpo secundario (Anti-IgG bovino).**

Dilución de 1:2000

Pozos totales en placa: 96

Posibles errores de pipeteo: 4

Total de pozos a tomar en cuenta para la dilución: 100 pozos por placa

100 pozos por 1 placas

50 µl por pozo = 50 x 100= 5000 µl de Ac secundario-Anti IgG bovino

5000/2000= 2.5 µl de Ac secundario

4997.5 µl de CaBi

5000 µl o 5 ml de Ac secundario por cada placa

Es importante señalar que al Anti IgG bovino se encuentra en congelación ya que solo de esta forma conserva sus propiedades, por lo tanto una vez utilizado inmediatamente se debe regresar al congelador para que no se desnaturalice.

**Anexo 4.-** Tabla de grupo único con las características de los tres primeros grupos utilizados para ELISA-HN

CUADRO 14. GRUPO UNICO TARJETA 8% POSITIVO, IDR POSITIVO PUNTO CORTE >0.601 POSITIVOS <0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA				
IDENTIFICACIÓN	TARJETA 8%	IDR	D.O. ELISA	INTERPRETACIÓN ELISA
1	POSITIVO	POSITIVO	1.21	POSITIVO
2	POSITIVO	POSITIVO	1.2	POSITIVO
3	POSITIVO	POSITIVO	1.597	POSITIVO
4	POSITIVO	POSITIVO	0.639	POSITIVO
5	POSITIVO	POSITIVO	1.201	POSITIVO
6	POSITIVO	POSITIVO	1.224	POSITIVO
7	POSITIVO	POSITIVO	1.455	POSITIVO
8	POSITIVO	POSITIVO	1.117	POSITIVO
9	POSITIVO	POSITIVO	1.447	POSITIVO
10	POSITIVO	POSITIVO	1.243	POSITIVO
11	POSITIVO	POSITIVO	1.278	POSITIVO
12	POSITIVO	POSITIVO	1.342	POSITIVO

CUADRO 14. GRUPO UNICO TARJETA-8% POSITIVO, IDR POSITIVO PUNTO CORTE >0.601 POSITIVOS <0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA				
IDENTIFICACIÓN	TARJETA 8%	IDR	D.O. ELISA	INTERPRETACIÓN ELISA
13	POSITIVO	POSITIVO	1.176	NEGATIVO
14	POSITIVO	POSITIVO	1.209	POSITIVO
15	POSITIVO	POSITIVO	1.35	POSITIVO
16	POSITIVO	POSITIVO	1.333	POSITIVO
17	POSITIVO	POSITIVO	1.1	POSITIVO
18	POSITIVO	POSITIVO	1.232	POSITIVO
19	POSITIVO	POSITIVO	1.21	POSITIVO
20	POSITIVO	POSITIVO	1.147	POSITIVO
21	POSITIVO	POSITIVO	1.333	POSITIVO
22	POSITIVO	POSITIVO	0.766	POSITIVO
23	POSITIVO	POSITIVO	1.2	POSITIVO
24	POSITIVO	POSITIVO	1.399	POSITIVO
25	POSITIVO	POSITIVO	1.076	POSITIVO
26	POSITIVO	POSITIVO	1.075	POSITIVO
27	POSITIVO	POSITIVO	1.087	POSITIVO
28	POSITIVO	POSITIVO	1.032	POSITIVO
29	POSITIVO	POSITIVO	1.1	POSITIVO
30	POSITIVO	POSITIVO	1.241	POSITIVO
31	POSITIVO	POSITIVO	1.315	POSITIVO
32	POSITIVO	POSITIVO	1.153	POSITIVO
33	POSITIVO	POSITIVO	0.943	POSITIVO
34	POSITIVO	POSITIVO	0.833	POSITIVO
35	POSITIVO	POSITIVO	1.365	POSITIVO
36	POSITIVO	POSITIVO	1.385	POSITIVO

<b>CUADRO 14. GRUPO UNICO TARJETA-8% POSITIVO, IDR POSITIVO PUNTO CORTE &gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA</b>				
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8%</b>	<b>IDR</b>	<b>D.O. ELISA</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA</b>
37	POSITIVO	POSITIVO	0.238	NEGATIVO
38	POSITIVO	POSITIVO	0.959	POSITIVO
39	POSITIVO	POSITIVO	0.957	POSITIVO
40	POSITIVO	POSITIVO	1.186	POSITIVO
41	POSITIVO	POSITIVO	0.972	POSITIVO

<b>CUADRO 15. GRUPO UNICO, TARJETA 8% POSITIVO, IDR NEGATIVO PUNTO CORTE &gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA</b>				
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8%</b>	<b>IDR</b>	<b>D.O. ELISA</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA</b>
42	POSITIVO	NEGATIVO	0.055	NEGATIVO
43	POSITIVO	NEGATIVO	0.488	NEGATIVO
44	POSITIVO	NEGATIVO	0.864	POSITIVO
45	POSITIVO	NEGATIVO	0.894	POSITIVO
46	POSITIVO	NEGATIVO	0.247	NEGATIVO
47	POSITIVO	NEGATIVO	0.889	POSITIVO
48	POSITIVO	NEGATIVO	0.833	POSITIVO
49	POSITIVO	NEGATIVO	0.654	POSITIVO
50	POSITIVO	NEGATIVO	0.621	POSITIVO
51	POSITIVO	NEGATIVO	0.532	NEGATIVO
52	POSITIVO	NEGATIVO	1.059	POSITIVO
53	POSITIVO	NEGATIVO	0.911	POSITIVO
54	POSITIVO	NEGATIVO	0.424	NEGATIVO
55	POSITIVO	NEGATIVO	0.895	POSITIVO
56	POSITIVO	NEGATIVO	0.767	POSITIVO

CUADRO 15. GRUPO UNICO TARJETA 8% POSITIVO, IDR NEGATIVO PUNTO CORTE >0.601 POSITIVOS <0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA				
IDENTIFICACIÓN	TARJETA 8%	IDR	D.O. ELISA	INTERPRETACIÓN ELISA
57	POSITIVO	NEGATIVO	1.147	POSITIVO
58	POSITIVO	NEGATIVO	0.066	NEGATIVO
59	POSITIVO	NEGATIVO	0.926	POSITIVO
60	POSITIVO	NEGATIVO	0.852	POSITIVO
61	POSITIVO	NEGATIVO	0.735	POSITIVO
62	POSITIVO	NEGATIVO	0.653	POSITIVO
63	POSITIVO	NEGATIVO	0.515	NEGATIVO
64	POSITIVO	NEGATIVO	0.463	NEGATIVO
65	POSITIVO	NEGATIVO	0.961	POSITIVO
66	POSITIVO	NEGATIVO	0.771	POSITIVO
67	POSITIVO	NEGATIVO	0.442	NEGATIVO
68	POSITIVO	NEGATIVO	0.813	POSITIVO
69	POSITIVO	NEGATIVO	0.788	POSITIVO
70	POSITIVO	NEGATIVO	0.259	NEGATIVO
71	POSITIVO	NEGATIVO	0.629	POSITIVO
72	POSITIVO	NEGATIVO	0.708	POSITIVO
73	POSITIVO	NEGATIVO	0.49	NEGATIVO
74	POSITIVO	NEGATIVO	0.674	POSITIVO
75	POSITIVO	NEGATIVO	0.83	POSITIVO
76	POSITIVO	NEGATIVO	0.566	NEGATIVO
78	POSITIVO	NEGATIVO	1.102	POSITIVO
79	POSITIVO	NEGATIVO	0.842	POSITIVO
80	POSITIVO	NEGATIVO	0.732	POSITIVO
81	POSITIVO	NEGATIVO	0.904	POSITIVO

<b>CUADRO 16. GRUPO UNICO TARJETA 8% NEGATIVO, IDR NEGATIVO PUNTO CORTE &gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA</b>				
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8%</b>	<b>IDR</b>	<b>D.O. ELISA</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA</b>
82	NEGATIVO	NEGATIVO	0.486	NEGATIVO
83	NEGATIVO	NEGATIVO	0.43	NEGATIVO
84	NEGATIVO	NEGATIVO	0.465	NEGATIVO
85	NEGATIVO	NEGATIVO	0.401	NEGATIVO
86	NEGATIVO	NEGATIVO	0.59	NEGATIVO
87	NEGATIVO	NEGATIVO	0.497	NEGATIVO
88	NEGATIVO	NEGATIVO	0.552	NEGATIVO
89	NEGATIVO	NEGATIVO	0.47	NEGATIVO
90	NEGATIVO	NEGATIVO	0.437	NEGATIVO
91	NEGATIVO	NEGATIVO	0.464	NEGATIVO
92	NEGATIVO	NEGATIVO	0.725	POSITIVO
93	NEGATIVO	NEGATIVO	0.58	NEGATIVO
94	NEGATIVO	NEGATIVO	0.404	NEGATIVO
95	NEGATIVO	NEGATIVO	0.43	NEGATIVO
96	NEGATIVO	NEGATIVO	0.465	NEGATIVO
97	NEGATIVO	NEGATIVO	0.401	NEGATIVO
98	NEGATIVO	NEGATIVO	0.59	NEGATIVO
99	NEGATIVO	NEGATIVO	0.497	NEGATIVO
100	NEGATIVO	NEGATIVO	0.552	NEGATIVO
101	NEGATIVO	NEGATIVO	0.47	NEGATIVO
102	NEGATIVO	NEGATIVO	0.437	NEGATIVO
103	NEGATIVO	NEGATIVO	0.464	NEGATIVO
104	NEGATIVO	NEGATIVO	0.725	POSITIVO
105	NEGATIVO	NEGATIVO	0.58	POSITIVO
106	NEGATIVO	NEGATIVO	0.465	NEGATIVO

<b>CUADRO 16. GRUPO UNICO TARJETA 8% NEGATIVO, IDR NEGATIVO PUNTO CORTE &gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA</b>				
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8%</b>	<b>IDR</b>	<b>D.O. ELISA</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA</b>
107	NEGATIVO	NEGATIVO	0.463	NEGATIVO
108	NEGATIVO	NEGATIVO	0.475	NEGATIVO
109	NEGATIVO	NEGATIVO	0.448	NEGATIVO
110	NEGATIVO	NEGATIVO	0.425	NEGATIVO
111	NEGATIVO	NEGATIVO	0.492	NEGATIVO
112	NEGATIVO	NEGATIVO	0.533	NEGATIVO
113	NEGATIVO	NEGATIVO	0.521	NEGATIVO
114	NEGATIVO	NEGATIVO	0.738	POSITIVO
115	NEGATIVO	NEGATIVO	0.5	NEGATIVO
116	NEGATIVO	NEGATIVO	0.509	NEGATIVO
117	NEGATIVO	NEGATIVO	0.764	POSITIVO
118	NEGATIVO	NEGATIVO	0.39	NEGATIVO
119	NEGATIVO	NEGATIVO	1.057	POSITIVO
120	NEGATIVO	NEGATIVO	0.287	NEGATIVO
121	NEGATIVO	NEGATIVO	0.445	NEGATIVO
122	NEGATIVO	NEGATIVO	0.455	NEGATIVO
123	NEGATIVO	NEGATIVO	0.463	NEGATIVO
124	NEGATIVO	NEGATIVO	0.542	NEGATIVO
125	NEGATIVO	NEGATIVO	0.499	NEGATIVO
126	NEGATIVO	NEGATIVO	0.527	NEGATIVO
127	NEGATIVO	NEGATIVO	0.584	NEGATIVO
128	NEGATIVO	NEGATIVO	0.507	NEGATIVO
129	NEGATIVO	NEGATIVO	0.593	NEGATIVO
130	NEGATIVO	NEGATIVO	0.421	NEGATIVO

CUADRO 16. GRUPO UNICO TARJETA 8% NEGATIVO, IDR NEGATIVO PUNTO CORTE >0.601 POSITIVOS <0.600 NEGATIVOS INTERPRETACIÓN DIRECTO DE LECTURA				
IDENTIFICACIÓN	TARJETA 8%	IDR	D.O. ELISA	INTERPRETACIÓN ELISA
131	NEGATIVO	NEGATIVO	1.005	POSITIVO
132	NEGATIVO	NEGATIVO	0.564	NEGATIVO
133	NEGATIVO	NEGATIVO	0.545	NEGATIVO
134	NEGATIVO	NEGATIVO	0.965	POSITIVO

**Anexo 5.-** Sueros procedentes del laboratorio ubicado en Torreón.

CUADRO 17. GRUPO POSITIVOS Y NEGATIVOS >0.601 POSITIVOS <0.600 NEGATIVOS					
IDENTIFICACIÓN	TARJETA 8% INIFAP	TARJETA 8% TORREÓN	ELISA INIFAP	INTERPRETACIÓN ELISA INIFAP	INTERPRETACIÓN ELISA TORREÓN
1	NEGATIVO	NEGATIVO	1.301	POSITIVO	POSITIVO
2	POSITIVO	POSITIVO	1.178	POSITIVO	POSITIVO
3	POSITIVO	POSITIVO	1.134	POSITIVO	POSITIVO
4	POSITIVO	POSITIVO	1.528	POSITIVO	POSITIVO
5	NEGATIVO	POSITIVO	0.579	NEGATIVO	NEGATIVO
6	POSITIVO	POSITIVO	1.287	POSITIVO	POSITIVO
7	POSITIVO	POSITIVO	1.099	POSITIVO	POSITIVO
8	POSITIVO	POSITIVO	1.11	POSITIVO	POSITIVO
9	POSITIVO	POSITIVO	1.095	POSITIVO	POSITIVO
10	NEGATIVO	NEGATIVO	0.447	NEGATIVO	NEGATIVO
11	NEGATIVO	NEGATIVO	0.408	NEGATIVO	NEGATIVO
12	NEGATIVO	NEGATIVO	0.627	POSITIVO	NEGATIVO
13	NEGATIVO	NEGATIVO	0.77	POSITIVO	NEGATIVO
14	POSITIVO	NEGATIVO	0.856	POSITIVO	NEGATIVO
15	NEGATIVO	NEGATIVO	0.873	POSITIVO	NEGATIVO
16	POSITIVO	POSITIVO	1.567	POSITIVO	POSITIVO
17	POSITIVO	POSITIVO	1.383	POSITIVO	NEGATIVO
18	POSITIVO	POSITIVO	1.403	POSITIVO	POSITIVO
19	POSITIVO	POSITIVO	1.067	POSITIVO	POSITIVO
20	POSITIVO	POSITIVO	1.292	POSITIVO	POSITIVO
21	NEGATIVO	NEGATIVO	0.363	NEGATIVO	NEGATIVO

<b>CUADRO 17. GRUPO POSITIVOS Y NEGATIVOS</b>					
<b>&gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS</b>					
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8% INIFAP</b>	<b>TARJETA 8% TORREÓN</b>	<b>ELISA INIFAP</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA INIFAP</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA TORREÓN</b>
22	NEGATIVO	NEGATIVO	0.416	NEGATIVO	NEGATIVO
23	NEGATIVO	NEGATIVO	0.408	NEGATIVO	NEGATIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO	0.614	POSITIVO	NEGATIVO
25	NEGATIVO	NEGATIVO	0.693	POSITIVO	NEGATIVO
26	NEGATIVO	NEGATIVO	0.446	NEGATIVO	NEGATIVO
27	POSITIVO	NEGATIVO	1.395	POSITIVO	NEGATIVO
28	POSITIVO	NEGATIVO	1.201	POSITIVO	NEGATIVO
29	NEGATIVO	NEGATIVO	1.112	POSITIVO	NEGATIVO
30	NEGATIVO	NEGATIVO	0.582	NEGATIVO	NEGATIVO
31	NEGATIVO	POSITIVO	0.436	NEGATIVO	NEGATIVO
32	POSITIVO	POSITIVO	1.309	POSITIVO	POSITIVO
33	POSITIVO	POSITIVO	1.375	POSITIVO	POSITIVO
34	POSITIVO	POSITIVO	1.432	POSITIVO	POSITIVO
35	POSITIVO	POSITIVO	1.297	POSITIVO	POSITIVO
36	POSITIVO	POSITIVO	0.821	POSITIVO	POSITIVO
37	POSITIVO	POSITIVO	1.503	POSITIVO	NEGATIVO
38	POSITIVO	POSITIVO	0.884	POSITIVO	NEGATIVO
39	POSITIVO	POSITIVO	1.209	POSITIVO	POSITIVO
40	POSITIVO	POSITIVO	1.422	POSITIVO	POSITIVO
41	POSITIVO	POSITIVO	1.203	POSITIVO	POSITIVO
42	POSITIVO	POSITIVO	0.757	POSITIVO	NEGATIVO
43	POSITIVO	POSITIVO	1.385	POSITIVO	POSITIVO
44	POSITIVO	POSITIVO	0.866	POSITIVO	POSITIVO
45	POSITIVO	POSITIVO	1.4	POSITIVO	POSITIVO
46	POSITIVO	POSITIVO	1.235	POSITIVO	POSITIVO
47	NEGATIVO	POSITIVO	0.947	POSITIVO	POSITIVO
48	POSITIVO	POSITIVO	1.105	POSITIVO	POSITIVO
49	POSITIVO	POSITIVO	1.186	POSITIVO	POSITIVO
50	POSITIVO	POSITIVO	1.152	POSITIVO	POSITIVO
51	NEGATIVO	NEGATIVO	0.608	POSITIVO	NEGATIVO
52	NEGATIVO	NEGATIVO	0.411	NEGATIVO	NEGATIVO
53	NEGATIVO	NEGATIVO	0.709	POSITIVO	NEGATIVO
54	NEGATIVO	NEGATIVO	0.834	POSITIVO	NEGATIVO
55	NEGATIVO	NEGATIVO	0.428	NEGATIVO	NEGATIVO

<b>CUADRO 17. GRUPO POSITIVOS Y NEGATIVOS</b>					
<b>&gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS</b>					
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8% INIFAP</b>	<b>TARJETA 8% TORREÓN</b>	<b>ELISA INIFAP</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA INIFAP</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA TORREÓN</b>
56	POSITIVO	NEGATIVO	0.777	POSITIVO	NEGATIVO
57	NEGATIVO	NEGATIVO	0.778	POSITIVO	NEGATIVO
58	NEGATIVO	NEGATIVO	1.041	POSITIVO	NEGATIVO
59	POSITIVO	NEGATIVO	1.203	POSITIVO	NEGATIVO
60	POSITIVO	NEGATIVO	1.051	POSITIVO	NEGATIVO
61	NEGATIVO	NEGATIVO	0.77	POSITIVO	NEGATIVO
62	NEGATIVO	NEGATIVO	1.013	POSITIVO	NEGATIVO
63	NEGATIVO	NEGATIVO	1.312	POSITIVO	NEGATIVO
64	NEGATIVO	NEGATIVO	0.453	NEGATIVO	NEGATIVO
65	NEGATIVO	NEGATIVO	0.901	POSITIVO	NEGATIVO
66	POSITIVO	POSITIVO	1.027	POSITIVO	POSITIVO
67	POSITIVO	POSITIVO	1.262	POSITIVO	POSITIVO
68	POSITIVO	POSITIVO	1.553	POSITIVO	POSITIVO
69	POSITIVO	POSITIVO	1.088	POSITIVO	POSITIVO
70	POSITIVO	POSITIVO	1.021	POSITIVO	POSITIVO
71	NEGATIVO	NEGATIVO	0.487	NEGATIVO	NEGATIVO
72	NEGATIVO	NEGATIVO	0.402	NEGATIVO	NEGATIVO
73	NEGATIVO	NEGATIVO	0.761	POSITIVO	NEGATIVO
74	NEGATIVO	NEGATIVO	0.701	POSITIVO	NEGATIVO
75	POSITIVO	NEGATIVO	1.394	POSITIVO	NEGATIVO
76	POSITIVO	NEGATIVO	1.27	POSITIVO	NEGATIVO
77	NEGATIVO	NEGATIVO	0.509	NEGATIVO	NEGATIVO
78	NEGATIVO	NEGATIVO	0.376	NEGATIVO	NEGATIVO
79	POSITIVO	NEGATIVO	1.3	POSITIVO	NEGATIVO
80	POSITIVO	NEGATIVO	1	POSITIVO	NEGATIVO
81	POSITIVO	POSITIVO	0.3	NEGATIVO	POSITIVO
82	POSITIVO	POSITIVO	0.381	NEGATIVO	NEGATIVO
83	POSITIVO	POSITIVO	0.312	NEGATIVO	POSITIVO
84	POSITIVO	POSITIVO	0.888	POSITIVO	POSITIVO
85	POSITIVO	POSITIVO	0.978	POSITIVO	POSITIVO
86	NEGATIVO	NEGATIVO	1.012	POSITIVO	NEGATIVO
87	NEGATIVO	NEGATIVO	1.648	POSITIVO	NEGATIVO
88	NEGATIVO	NEGATIVO	1.481	POSITIVO	NEGATIVO
89	POSITIVO	NEGATIVO	0.819	POSITIVO	NEGATIVO

<b>CUADRO 17. GRUPO POSITIVOS Y NEGATIVOS</b>					
<b>&gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS</b>					
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8% INIFAP</b>	<b>TARJETA 8% TORREÓN</b>	<b>ELISA INIFAP</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA INIFAP</b>	<b>INTERPRETACIÓN ELISA TORREÓN</b>
90	POSITIVO	NEGATIVO	0.599	NEGATIVO	NEGATIVO
91	NEGATIVO	NEGATIVO	0.384	NEGATIVO	NEGATIVO
92	POSITIVO	NEGATIVO	1.043	POSITIVO	NEGATIVO
93	NEGATIVO	NEGATIVO	0.686	POSITIVO	NEGATIVO
94	NEGATIVO	NEGATIVO	0.369	NEGATIVO	NEGATIVO
95	POSITIVO	POSITIVO	0.953	POSITIVO	NEGATIVO
96	POSITIVO	POSITIVO	0.448	NEGATIVO	POSITIVO
97	POSITIVO	POSITIVO	0.364	NEGATIVO	POSITIVO
98	NEGATIVO	NEGATIVO	0.238	NEGATIVO	NEGATIVO
99	POSITIVO	POSITIVO	0.354	NEGATIVO	NEGATIVO
100	POSITIVO	NEGATIVO	0.356	NEGATIVO	NEGATIVO

<b>CUADRO 18. GRUPO NEGATIVOS</b>					
<b>&gt;0.601 POSITIVOS &lt;0.600 NEGATIVOS</b>					
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	<b>TARJETA 8% INIFAP</b>	<b>TARJETA 8% TORREÓN</b>	<b>ELISA</b>	<b>INTERPRETACIÓN HN INIFAP</b>	<b>INTERPRETACIÓN HN TORREÓN</b>
1	NEGATIVO	NEGATIVO	0.43	NEGATIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO	0.368	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	0.403	NEGATIVO	NEGATIVO
4	NEGATIVO	NEGATIVO	0.316	NEGATIVO	NEGATIVO
5	NEGATIVO	NEGATIVO	0.353	NEGATIVO	NEGATIVO
6	NEGATIVO	NEGATIVO	0.472	NEGATIVO	NEGATIVO
7	NEGATIVO	NEGATIVO	0.435	NEGATIVO	NEGATIVO
8	NEGATIVO	NEGATIVO	0.425	NEGATIVO	NEGATIVO
9	NEGATIVO	NEGATIVO	0.403	NEGATIVO	NEGATIVO
10	NEGATIVO	NEGATIVO	0.412	NEGATIVO	NEGATIVO
11	NEGATIVO	NEGATIVO	0.459	NEGATIVO	NEGATIVO
12	NEGATIVO	NEGATIVO	0.411	NEGATIVO	NEGATIVO
13	NEGATIVO	NEGATIVO	0.432	NEGATIVO	NEGATIVO
14	NEGATIVO	NEGATIVO	0.383	NEGATIVO	NEGATIVO
15	NEGATIVO	NEGATIVO	0.374	NEGATIVO	NEGATIVO
16	NEGATIVO	NEGATIVO	0.636	POSITIVO	NEGATIVO
17	NEGATIVO	NEGATIVO	0.403	NEGATIVO	NEGATIVO
18	NEGATIVO	NEGATIVO	0.445	NEGATIVO	NEGATIVO
19	NEGATIVO	NEGATIVO	0.487	NEGATIVO	NEGATIVO
20	NEGATIVO	NEGATIVO	0.323	NEGATIVO	NEGATIVO
21	NEGATIVO	NEGATIVO	0.566	NEGATIVO	NEGATIVO
22	NEGATIVO	NEGATIVO	0.434	NEGATIVO	NEGATIVO
23	NEGATIVO	NEGATIVO	0.372	NEGATIVO	NEGATIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO	0.405	NEGATIVO	NEGATIVO
25	NEGATIVO	NEGATIVO	0.75	POSITIVO	NEGATIVO
26	NEGATIVO	NEGATIVO	0.433	NEGATIVO	NEGATIVO
27	NEGATIVO	NEGATIVO	0.304	NEGATIVO	NEGATIVO

**CUADRO 18. GRUPO NEGATIVOS**  
**>0.601 POSITIVOS <0.600 NEGATIVOS**

IDENTIFICACIÓN	TARJETA 8% INIFAP	TARJETA 8% TORREÓN	ELISA	INTERPRETACIÓN HN INIFAP	INTERPRETACIÓN HN TORREÓN
28	NEGATIVO	NEGATIVO	0.32	NEGATIVO	NEGATIVO
29	NEGATIVO	NEGATIVO	0.415	NEGATIVO	NEGATIVO
30	NEGATIVO	NEGATIVO	0.457	NEGATIVO	NEGATIVO
31	NEGATIVO	NEGATIVO	0.525	NEGATIVO	NEGATIVO
32	NEGATIVO	NEGATIVO	0.482	NEGATIVO	NEGATIVO
33	NEGATIVO	NEGATIVO	0.424	NEGATIVO	NEGATIVO
34	NEGATIVO	NEGATIVO	0.388	NEGATIVO	NEGATIVO
35	NEGATIVO	NEGATIVO	0.468	NEGATIVO	NEGATIVO
36	NEGATIVO	NEGATIVO	0.401	NEGATIVO	NEGATIVO
37	NEGATIVO	NEGATIVO	0.476	NEGATIVO	NEGATIVO
38	NEGATIVO	NEGATIVO	0.441	NEGATIVO	NEGATIVO
39	NEGATIVO	NEGATIVO	0.374	NEGATIVO	NEGATIVO
40	NEGATIVO	NEGATIVO	0.461	NEGATIVO	NEGATIVO
41	NEGATIVO	NEGATIVO	0.364	NEGATIVO	NEGATIVO
42	NEGATIVO	NEGATIVO	0.439	NEGATIVO	NEGATIVO
43	NEGATIVO	NEGATIVO	0.432	NEGATIVO	NEGATIVO
44	NEGATIVO	NEGATIVO	0.491	NEGATIVO	NEGATIVO
45	NEGATIVO	NEGATIVO	0.452	NEGATIVO	NEGATIVO
46	NEGATIVO	NEGATIVO	0.515	NEGATIVO	NEGATIVO
47	NEGATIVO	NEGATIVO	0.605	POSITIVO	NEGATIVO
48	NEGATIVO	NEGATIVO	0.943	POSITIVO	NEGATIVO
49	NEGATIVO	NEGATIVO	0.489	NEGATIVO	NEGATIVO
50	NEGATIVO	NEGATIVO	0.409	NEGATIVO	NEGATIVO
51	NEGATIVO	NEGATIVO	0.525	NEGATIVO	NEGATIVO
52	NEGATIVO	NEGATIVO	0.507	NEGATIVO	NEGATIVO
53	NEGATIVO	NEGATIVO	0.392	NEGATIVO	NEGATIVO
54	NEGATIVO	NEGATIVO	0.387	NEGATIVO	NEGATIVO
55	NEGATIVO	NEGATIVO	0.537	NEGATIVO	NEGATIVO
56	NEGATIVO	NEGATIVO	0.394	NEGATIVO	NEGATIVO
57	NEGATIVO	NEGATIVO	0.461	NEGATIVO	NEGATIVO
58	NEGATIVO	NEGATIVO	0.43	NEGATIVO	NEGATIVO
59	NEGATIVO	NEGATIVO	0.338	NEGATIVO	NEGATIVO
60	NEGATIVO	NEGATIVO	0.425	NEGATIVO	NEGATIVO
61	NEGATIVO	NEGATIVO	0.401	NEGATIVO	NEGATIVO
62	NEGATIVO	NEGATIVO	0.494	NEGATIVO	NEGATIVO
63	NEGATIVO	NEGATIVO	0.945	POSITIVO	NEGATIVO
64	NEGATIVO	NEGATIVO	0.581	NEGATIVO	NEGATIVO
65	NEGATIVO	NEGATIVO	0.335	NEGATIVO	NEGATIVO
66	NEGATIVO	NEGATIVO	0.471	NEGATIVO	NEGATIVO
67	NEGATIVO	NEGATIVO	0.479	NEGATIVO	NEGATIVO
68	NEGATIVO	NEGATIVO	0.463	NEGATIVO	NEGATIVO
69	NEGATIVO	NEGATIVO	0.372	NEGATIVO	NEGATIVO
70	NEGATIVO	NEGATIVO	0.423	NEGATIVO	NEGATIVO
71	NEGATIVO	NEGATIVO	0.59	NEGATIVO	NEGATIVO
72	NEGATIVO	NEGATIVO	0.375	NEGATIVO	NEGATIVO
73	NEGATIVO	NEGATIVO	0.382	NEGATIVO	NEGATIVO
74	NEGATIVO	NEGATIVO	0.445	NEGATIVO	NEGATIVO
75	NEGATIVO	NEGATIVO	0.441	NEGATIVO	NEGATIVO
76	NEGATIVO	NEGATIVO	0.513	NEGATIVO	NEGATIVO

**CUADRO 18.**  
**GRUPO NEGATIVOS**  
**>0.601 POSITIVOS <0.600 NEGATIVOS**

IDENTIFICACIÓN	TARJETA 8% INIFAP	TARJETA 8% TORREÓN	ELISA	INTERPRETACIÓN HN INIFAP	INTERPRETACIÓN HN TORREÓN
77	NEGATIVO	NEGATIVO	0.388	NEGATIVO	NEGATIVO
78	NEGATIVO	NEGATIVO	0.374	NEGATIVO	NEGATIVO
79	NEGATIVO	NEGATIVO	0.436	NEGATIVO	NEGATIVO
80	NEGATIVO	NEGATIVO	0.46	NEGATIVO	NEGATIVO
81	NEGATIVO	NEGATIVO	0.32	NEGATIVO	NEGATIVO
82	NEGATIVO	NEGATIVO	0.59	NEGATIVO	NEGATIVO
83	NEGATIVO	NEGATIVO	0.429	NEGATIVO	NEGATIVO
84	NEGATIVO	NEGATIVO	0.37	NEGATIVO	NEGATIVO
85	NEGATIVO	NEGATIVO	0.561	NEGATIVO	NEGATIVO
86	NEGATIVO	NEGATIVO	0.562	NEGATIVO	NEGATIVO
87	NEGATIVO	NEGATIVO	0.463	NEGATIVO	NEGATIVO
88	NEGATIVO	NEGATIVO	0.299	NEGATIVO	NEGATIVO
89	NEGATIVO	NEGATIVO	0.35	NEGATIVO	NEGATIVO
90	NEGATIVO	NEGATIVO	0.474	NEGATIVO	NEGATIVO
91	NEGATIVO	NEGATIVO	0.373	NEGATIVO	NEGATIVO
92	NEGATIVO	NEGATIVO	0.395	NEGATIVO	NEGATIVO
93	NEGATIVO	NEGATIVO	0.382	NEGATIVO	NEGATIVO
94	NEGATIVO	NEGATIVO	0.346	NEGATIVO	NEGATIVO
95	NEGATIVO	NEGATIVO	0.382	NEGATIVO	NEGATIVO
96	NEGATIVO	NEGATIVO	0.467	NEGATIVO	NEGATIVO
97	NEGATIVO	NEGATIVO	0.458	NEGATIVO	NEGATIVO
98	NEGATIVO	NEGATIVO	0.413	NEGATIVO	NEGATIVO
99	NEGATIVO	NEGATIVO	0.378	NEGATIVO	NEGATIVO
100	NEGATIVO	NEGATIVO	0.43	NEGATIVO	NEGATIVO