

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia

Microtécnica del FAB para la pesquisa de anticuerpos contra *Brucella* spp. IPK. 2017

Tesis para optar por el título de Máster en
Bacteriología-Micología

Autora: Dra. Odisney Lugo Suárez

La Habana, 2017



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia

Microtécnica del FAB para la pesquisa de anticuerpos contra *Brucella* spp. IPK. 2017

Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología

Autora: Dra. Odisney Lugo Suárez

Tutora: Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes, Dr C.

Asesor: Lic. Alberto Baly Gil, Dr C.

La Habana, 2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a quienes gentilmente han compartido conmigo sus conocimientos, sus esfuerzos y su tiempo durante la travesía de este trabajo de tesis.

De manera especial agradezco a mi tutora Ana Margarita Obregón por su dedicación y preocupación desmedidas, por sus energías para seguir brillando, aunque todo se apague, y por su cariño sincero; a mi asesor, Alberto Baly, por su tiempo, que sé que es escaso, y su ayuda desde los inicios de esta investigación; y a Eduardo por sus consejos, su colaboración constante y su amistad incondicional.

Agradezco a mis compañeros del LNEB y del departamento de bacteriología por su entrega, su disposición y su buena vibra, porque el buen trato y las sonrisas siempre hacen la diferencia. Especial mención para las muchachas de recepción de muestra, quienes amablemente durante dos meses emplearon parte de su tiempo en llenar encuestas que fueron imprescindibles en la estimación de los costos en esta investigación.

Gracias a Ro, Silvia, Yeny y Yoima, porque siempre están dispuestas a ocuparse y no a preocuparse y porque sé que son un regalo para mí. Mil gracias también para mi amiga Yaindrys por siempre guardarme un espacio y enviarme fuerzas cuando ya no me quedan.

Gratitudes para mi familia por su apoyo, ayuda y comprensión durante este tiempo. A mi madre, mi tía, mi hermana, mi suegra, mi esposo y a mi hijo Samuel, que no entiende por qué mamá de nuevo tiene que estudiar tanto. Gracias a todos por su paciencia y su amor.

Por último, pero no menos importante, agradezco a Dios porque sé que es el único dueño de las huellas que han quedado en la arena.

Abreviaturas

IPK:	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
LNREB:	Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y Brucelas
MINSAP:	Ministerio de Salud Pública
SNS:	Sistema Nacional de Salud
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PNO:	Procedimientos y Normativas Operacionales
LPS:	Lipopolisacárido
Ac:	Anticuerpo
IgA:	Inmunoglobulina A
IgG:	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
μl:	Microlitros
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
ELISA:	Ensayo inmunoensimático, del inglés <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAB:	Sistema serológico comercial para la pesquisa de anticuerpos contra <i>Brucella</i> , del inglés <i>Febrile Antigen Brucella</i>
PMN:	Polimorfonucleares neutrófilos
NK:	Células asesinas naturales, de sus siglas en inglés <i>Natural Killer</i>
IFN-γ:	Interferón ganma
IL-12:	Interleuquina 12
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa
Th1:	Células de respuesta adaptativa de tipo 1
CUP:	Cubanos pesos
CUC:	Cubanos convertibles
v.o.:	Vía oral
i.m.:	Intramuscular

RESUMEN

El incremento de la percepción clínica y epidemiológica de casos con sospecha de brucelosis humana en Cuba, ha provocado que en ocasiones se agote la suspensión bacteriana del FAB en los laboratorios. Esto conlleva al retraso en el diagnóstico, el tratamiento, la notificación y el seguimiento de casos confirmados. La presente investigación valida la microtécnica del FAB comercial y estima sus costos económicos parciales, como propuesta para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp., en suero humano. Se realizó un estudio de corte transversal, entre enero y junio de 2017 en 486 sueros de casos sospechosos cubanos. Se emplearon los sistemas de referencia ELISA IgM y ELISA IgG contra *Brucella* spp. La estimación de los costos se realizó en 182 sueros recibidos en el LNREB durante marzo y abril de 2017. Se obtuvo 100% de especificidad y 98% de sensibilidad para la microtécnica del FAB comercial. La concordancia entre el FAB comercial y la microtécnica resultó muy buena (Kappa = 0,8816). Los costos económicos estimados para una determinación fueron de 617,19 CUP, cifra que jamás superará los gastos que genera al sistema de salud un enfermo de brucelosis no diagnosticado oportunamente. La microtécnica del FAB comercial demuestra ser una herramienta robusta y segura, capaz de reemplazar la metodología utilizada actualmente, por lo que se recomienda su uso en la red nacional de laboratorio de salud pública en Cuba.

ÍNDICE

Acápites	Pág.
Introducción.....	1
Objetivos.....	4
I. Revisión bibliográfica.....	5
1.1 Definición y sinonimia.....	5
1.2 Antecedentes históricos de la brucelosis.....	6
1.3 Agente etiológico.....	6
1.3.1 Características generales.....	8
1.3.2 Taxonomía.....	8
1.3.3 Características genéticas.....	9
1.3.4 Estructura antigénica.....	10
1.3.5 Factores de virulencia.....	11
1.3.6 Patogenia.....	12
1.3.7 Respuesta inmune.....	13
1.4 Epidemiología.....	14
1.5 Manifestaciones clínicas.....	16
1.6 Tratamiento.....	16
1.7 Diagnóstico.....	16
1.7.1 Diagnóstico diferencial y hallazgos de laboratorio clínico.....	16
1.7.2 Diagnóstico microbiológico.....	17

Acápites	Pág.
1.7.2.1 Aislamiento, cultivo e identificación.....	17
1.7.2.2 Diagnóstico molecular.....	19
1.7.2.3 Diagnóstico serológico.....	21
1.8 Economía en salud.....	23
1.8.1 Perspectiva y horizonte analítico.....	24
1.8.2 Los costos.....	25
II. Materiales y métodos.....	27
2.1 Diseño de la investigación y sitio de estudio.....	27
2.2 Universo de estudio.....	27
2.3 Muestras de trabajo.....	27
2.4 Técnicas y procedimientos.....	28
2.4.1 Técnicas serológicas.....	28
2.4.1.1 Normalización de la microtécnica del FAB, utilizando sueros controles...	29
2.4.1.2 Evaluación de la microtécnica del FAB.....	30
2.4.1.3 Aplicación de la microtécnica del FAB.....	30
2.4.2 Costos: recolección y clasificación.....	30
2.5 Análisis de los datos.....	31
2.6 Consideraciones éticas.....	33
III. Resultados y discusión.....	34
3.1 Validación de la microtécnica del FAB para la detección de anticuerpos contra antígenos de <i>Brucella</i>	34

Acápites	Pág.
3.1.1 Normalización de la microtécnica del FAB.....	34
3.1.2 Evaluación de la de la microtécnica del FAB.....	36
3.2 Aplicación de la microtécnica del FAB y el sistema comercial FAB en sueros de casos con sospecha de brucelosis.....	42
3.3 Estimación de los costos económicos de la microtécnica del FAB para el nivel terciario de salud.....	51
3.4 Discusión general.....	55
Conclusiones.....	57
Recomendaciones.....	58
Referencias bibliográficas.....	59
Anexos.....	74

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La brucelosis se considera una enfermedad “olvidada” (Canal, 2011; Scholz *et al.*, 2013), a pesar de ser una de las cinco zoonosis bacterianas más frecuentes en todo el mundo, y de provocar un gran número de enfermos e importantes pérdidas en el sector veterinario (Hincapié *et al.*, 2014, López, 2014; Méndez *et al.*, 2015). Anualmente, se reporta a nivel mundial medio millón de casos nuevos de brucelosis humana (Figueiredo *et al.*, 2015). No obstante, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el total de enfermos es de 10 a 25 veces superior, debido al subdiagnóstico y la subnotificación existentes (Garshasbi *et al.*, 2014).

El agente etiológico de la brucelosis, son las bacterias del género *Brucella*, de ellas *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* son patógenas para el hombre (Zhong *et al.*, 2012, Rahman *et al.*, 2016). En todos los continentes se reportan casos, sin embargo, esta enfermedad es endémica de regiones como la cuenca del Mediterráneo, la Península Arábiga y las Américas. En esta última, países como Argentina, Perú y México muestran las mayores tasas de prevalencia (DE, 2013; Morales *et al.*, 2014).

La infección del ser humano ocurre de forma accidental y está íntimamente relacionada con la enfermedad en los animales domésticos (Díaz *et al.*, 2011). Los pacientes pueden presentar síntomas leves e inespecíficos o cuadros severos, debilitantes e incapacitantes (Dean *et al.*, 2012; DE, 2013). La brucelosis aguda clásica suele manifestarse como una enfermedad febril acompañada de sudoración profusa de predominio nocturno; y de algias de localización articular (sin artritis), muscular y/o neurológica (Ari, 2011, Oliveira *et al.*, 2015).

Los pilares fundamentales para confirmar la infección por brucelas son la elaboración correcta de la historia clínico – epidemiológica y los resultados del laboratorio de microbiología (Araj, 2010). Un diagnóstico erróneo o tardío favorece la evolución hacia la cronicidad, así como la aparición de complicaciones en el 40% de los casos, las cuales, en su mayoría, disminuyen la eficacia de las terapéuticas existentes y la probabilidad de curación definitiva (Ari, 2011; Razzaq y Al Saadi, 2014).

El aislamiento y cultivo de *Brucella* spp. a partir de las muestras clínicas es la prueba de oro para el diagnóstico microbiológico de la brucelosis, sin embargo, su sensibilidad es pobre e inconstante (Alikhani *et al.*, 2013). Este proceder solo se recomienda realizarlo en los laboratorios con nivel de bioseguridad III (Lowe *et al.*, 2015). Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) permiten la identificación rápida, sensible y específica del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Brucella* spp. en cualquier etapa de la enfermedad. Estas técnicas requieren de equipos e insumos costosos, por lo que no suelen estar disponibles para el diagnóstico de rutina en países pobres donde la brucelosis representa un problema de salud (Wang *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2014).

Las técnicas serológicas resultan esenciales para el diagnóstico de esta entidad, a través de la detección de títulos de anticuerpos específicos IgG, IgM e IgA. Entre los métodos más utilizados se encuentran la técnica Rosa de Bengala, la Seroaglutinación en Tubo (SAT) y los Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Pabuccuoglu *et al.*, 2011). Estos últimos permiten conocer si el paciente cursa por la etapa aguda o crónica de la enfermedad (Al Dahouk *et al.*, 2013; Fadeel *et al.*, 2011).

En Cuba, la brucelosis humana es una enfermedad de declaración obligatoria (MINSAP, 2013). Antes de los años 90 del pasado siglo, el diagnóstico microbiológico en la red de laboratorios de salud pública se realizaba mediante el cultivo y las técnicas serológicas caseras. Con el inicio del “periodo especial” disminuyó la disponibilidad de los reactivos (antígenos) para la confirmación de la infección, lo cual contribuyó al subregistro de casos durante aquellos años (Obregón *et al.*, 2015).

En el año 2012 el MINSAP introduce el sistema serológico comercial FAB (del inglés *Febrile Antigen Brucella*) en los laboratorios de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de todo el país, previa validación en el Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK).

Este sistema es comercializado por la firma Diagnostic Senese SpA (DIESSE), y permite la pesquisa de anticuerpos contra brucelas. La evaluación del FAB demostró que, en nuestro medio, es un diagnosticador robusto, sensible, específico y seguro, con el que se rescató la vigilancia nacional de los casos con sospecha de la enfermedad (Obregón *et al.*, 2015). Está formado por una prueba cualitativa rápida y otra semicuantitativa lenta. La prueba cualitativa es similar a la reacción de Huddleson, se realiza en tarjetas, ofrece el resultado en dos minutos y permite la pesquisa de anticuerpos totales en los sueros de los pacientes con sospecha de la enfermedad. Por su parte, la prueba semicuantitativa se les realiza a los sueros que resultan reactivos en la prueba cualitativa. Es equivalente a la reacción de Wright, la que se realiza en tubos y en 24 horas permite conocer el título de anticuerpos totales aglutinantes específicos presentes en el suero del paciente. A partir de este resultado las muestras pueden clasificarse como negativas (no ocurrencia de reacción), reactivas (títulos de 20 a 40), sospechosas (título de 80) y positivas (títulos ≥ 160) (www.diesse.com).

En Cuba, durante los últimos tres años se constata un aumento significativo del número de sueros recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y Brucelas (LNREB) para la confirmación de la infección y la vigilancia nacional, procedentes de casos con sospecha de brucelosis humana. Este hecho ha provocado, en ocasiones, el agotamiento del antígeno FAB y, por ende, el atraso en la confirmación de la infección de los sueros que se estudian. En particular la prueba semicuantitativa del FAB es un proceder técnico que requiere mucho tiempo, resulta fatigoso para el laboratorista y en el que se rompen con facilidad los tubos de cristal que en él se emplean. Además, consume, por determinación, elevados volúmenes de solución salina (7,9 ml), suero del paciente (100 μ l) y suspensión bacteriana (350 μ l), lo cual determina que por cada estuche o kit solo se puedan estudiar 80 sueros (www.diesse.com).

Tomando este antecedente en consideración se decide diseñar y validar una microtécnica basada en el fundamento del FAB comercial semicuantitativo, usando placas de microtitulación de fondo U, que permita el estudio de un mayor número de sueros por estuche, la reducción, por determinación, de los recursos (incluyendo el reactivo) y que se agilice la labor del personal de laboratorio. Para lograr lo expuesto nos trazamos los siguientes objetivos:

Objetivos:

1. Validar la microtécnica del FAB semicuantitativo, para la detección de anticuerpos contra *Brucella*, utilizando sueros negativos y positivos a brucelosis e infecciones víricas y parasitarias.
2. Aplicar la microtécnica del FAB y el sistema comercial del FAB, en sueros de casos sospechosos de brucelosis.
3. Estimar los costos económicos de la microtécnica del FAB para el nivel terciario de salud.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Definición y sinonimia

La brucelosis es una antropozoonosis infectocontagiosa producida por bacterias del género *Brucella*, que afecta a mamíferos terrestres y acuáticos. El ser humano es un hospedero accidental de las brucelas. Esta enfermedad se manifiesta con variados síntomas inespecíficos y elevada tendencia a evolucionar hacia la cronicidad, por lo que el diagnóstico clínico resulta difícil (Galińska y Zagorski, 2013; DE, 2013). Aunque la infección sólo es mortal en el 3% de los casos no tratados, resulta grave e invalidante para muchos de los pacientes que la padecen (Kassiri *et al.*, 2013).

A lo largo del tiempo la brucelosis ha recibido diferentes nombres relacionados con sus descubridores, su presentación clínica o la localización geográfica de los brotes epidémicos. Entre ellos, los más conocidos son: fiebre ondulante, fiebre melitensis, fiebre de Malta, fiebre de Traum, fiebre caprina, fiebre de Chipre, enfermedad de Bang, fiebre de Gibraltar y fiebre sudoralis (Galińska *et al.*, 2013; DGE, 2012).

1.2. Antecedentes históricos de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad tan antigua como el hombre. Tal es así que el análisis paleo-patológico realizado a un esqueleto de un adulto *Australopithecus africanus* que posee entre 1,5 y 2,8 millones de años de antigüedad, sugirió que las lesiones vertebrales en él encontradas (espondilitis deformante) no habían sido causadas por un trauma, sino por una brucelosis no tratada (D'anastasio *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2015). No obstante, la primera descripción de esta enfermedad en el hombre se atribuye a Jeffery Allen Marston en 1863 (Vega *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2015).

Su agente etiológico se identificó en 1887 por el doctor Sir David Bruce, quien fue enviado a investigar el padecimiento febril que causaba la muerte de los soldados. El germen fue encontrado en el bazo de cuatro soldados fallecidos y se denominó en esos momentos *Micrococcus melitensis* (Wyatt, 2009; Rahman *et al.*; 2015).

Luego en 1896 el médico danés Bernhard Lauritz F. Bang identificó el agente causal del aborto epizoótico bovino y le llamó *Bacilo de Bang* (Vega *et al.*, 2008; Padrón *et al.*, 2011); mientras que en 1914 Jacob Traum aisló en fetos abortados de cerdos el microorganismo que luego sería reconocido como *Brucella suis* (Álvarez NE *et al.*, 2015). Pero no fue hasta 1920 que la bacterióloga norteamericana Alice Catherine Evans comprobó la semejanza de los microorganismos aislados por Bruce, Bang y Traum y sugirió que el agente llevara el nombre de *Brucella*, en honor a David Bruce (Laval 2006; Rahman *et al.*, 2015).

Paralelo a ello, se describe que, durante la Conquista de las Américas, la enfermedad se propagó entre los bovinos (Padrón *et al.*, 2011). En Cuba, los primeros reportes de la enfermedad fueron realizados por el Dr. Recio en el año 1918, cuando identificó un brote en ganado bovino que había sido importado desde Estados Unidos (Curbelo y Márquez, 1950).

1.3. Agente etiológico

1.3.1. Características generales

El género *Brucella* está constituido por cocobacilos cortos y pequeños, gramnegativos, que miden de 0,5 a 0,7 μm de ancho por de 0,5 a 1,5 μm de longitud. Estas bacterias son intracelulares facultativas, inmóviles, no encapsuladas, no formadoras de esporas, de crecimiento lento y aerobias estrictas (aunque algunas cepas requieren de dióxido de carbono) (Tae *et al.*, 2011; Von Bargen *et al.*, 2013; Ledwaba *et al.*, 2014). El crecimiento de las brucelas se inhibe en presencia de sales biliares, telurito o selenito; mientras que es favorecido por factores como biotina, tiamina y nicotinamida, por tal razón a las bases de los medios que se utilicen para su cultivo se les adicionar sangre o suero, pero (Castaño, 2010).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y para alcanzar un desarrollo adecuado requieren de un pH entre 6,6-7,4. Estas bacterias no fermentan los azúcares, no producen indol, no licúan la gelatina, no utilizan citratos y reducen los nitratos a nitritos (Lucero *et al.*, 2008; Gupte y Kaur, 2015). Este género bacteriano produce las enzimas catalasa y citocromo oxidasa, a excepción de las especies *B. neotomae* y *B. ovis* que son negativas a la prueba oxidasa (Vega *et al.*, 2008, Castaño, 2010; Araj, 2010).

Las brucelas son resistentes a la congelación y al secado (liofilización). Además, son capaces de permanecer viables durante largos periodos de tiempo en condiciones de alta humedad, baja temperatura, pH cercano a la neutralidad y poca luz solar (Obregón (A) *et al.*, 2015). Igualmente, pueden sobrevivir por más de dos meses en el agua y productos lácteos como quesos frescos; seis semanas en la tierra seca contaminada de orina, secreción vaginal y tejidos placentarios o fetales de animales infectados; y alrededor de seis meses en tierra húmeda o estiércol líquido conservado en un ambiente frío y oscuro (Corbel y Beeching, 2012; Martínez, 2013). Sin embargo, son muy sensibles a la luz solar, las radiaciones ionizantes y a la mayoría de los desinfectantes comunes, con excepción de las sales cuaternarias de amonio (Corbel y Beeching, 2012; Díaz, 2013).

Según el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades Infecciosas (CDC, del inglés *Control Diseases Center*) *Brucella* spp. se encuentra en la categoría B de los agentes del bioterrorismo, principalmente las especies *B. melitensis* y *B. suis*, que son consideradas como posibles armas biológicas (Santis *et al.*, 2011). Lo anterior se atribuye a que bastan entre 10-100 bacterias para propagar la infección a través de aerosoles, con el resultado de la aparición de 413 muertes y 82 500 nuevos casos, muchos de los cuales pueden presentar secuelas incapacitantes (Yagupsky y Barón, 2005; Santis *et al.*, 2011).

1.3.2. Taxonomía

La taxonomía de *Brucella* spp. es compleja y controversial. El análisis de las secuencias del ácido ribonucleico 16S (ARNr 16S) permite ubicar a *Brucella* en la familia Brucellaceae (familia III), orden Rhizobiales, clase Alphaproteobacteria, fillum Proteobacteria (Ficht., 2010; Garin-Bastuji *et al*, 2014). Dentro de la familia Brucellaceae se encuentra también *Ochrobactrum intermedium*, bacteria de vida libre y patógena oportunista del hombre, con quien *Brucella* comparte el 98,8% en homología del ARNr 16S (Scholz *et al*, 2008).

En la actualidad se reconocen 12 especies constituyentes del género *Brucella*, que además de diferenciarse genéticamente (Ficht, 2010; Scholz y Vergnaud, 2013) también se diferencian a partir de sus hospederos predilectos (Godfroid *et al.*, 2013). Es así como *B. melitensis* se encuentra fundamentalmente en caprinos y ovinos; *B. abortus* en bovinos y bubalinos, *B. suis* en porcinos, liebres, renos y roedores; y *B. neotomae* en el ratón del desierto. Por su parte, *B. canis* está preferentemente en caninos; *B. ovis* en ovinos; *B. ceti* en los cetáceos; *B. pinnipedialis* en los pinnípedos y *B. microti* en el ratón de campo. Por otra parte, *B. inopinata*, *B. papionis* y *B. vulpis* fueron descubiertas en los últimos 20 años y se aislaron a partir de un implante mamario en una mujer de 71 años; de mandriles y de zorros rojos, respectivamente (Hammerl *et al.*, 2017). De ellas, las especies consideradas de elevado potencial antropozoonótico son *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*, en ese mismo orden (Al Dahouk *et al.*, 2013; Galińska y Zagorski, 2013).

1.3.3. Características genéticas

El genoma de *Brucella* contiene aproximadamente $3,2 \times 10^6$ pares de bases y un 57% de guanina más citosina (G+C) (Bohlin *et al.*, 2010). Está organizado en dos cromosomas circulares, uno grande con un tamaño de 2.1 Mb y otro pequeño de 1,5 Mb, a excepción de la biovariedad 3 de *B. suis*, que presenta sólo un cromosoma de 3,1 Mb (Mantur *et al.*, 2007).

Brucella spp. no presenta plásmidos u otros elementos genéticos móviles, aunque se ha descrito su capacidad para mantener y transferir plásmidos exógenos (Rigby y Frase, 1989; Bohlin *et al.*, 2010). La ausencia de plásmidos propios en las brucelas demuestra su adaptación al ambiente intracelular (nicho ecológico estable) sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que requeriría habitar ambientes con una elevada carga microbiana (Rivers *et al.*, 2006).

1.3.4. Estructura antigénica

Las brucelas son bacterias gram-negativas cuya envoltura celular está compuesta por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio. La membrana externa contiene fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) distribuidos asimétricamente, con una región hidrofóbica insertada en la membrana externa, llamada lípido A, y una región hidrofílica dirigida hacia el exterior (Martínez, 2014).

La región hidrofílica se divide en dos secciones: el núcleo oligosacárido interno unido al lípido A, y la cadena "O" externa (polisacárido o antígeno "O"), que contiene antígenos conocidos como A (abortus), M (melitensis) y C (común a todas las brucelas). Contra estos antígenos están dirigidos la mayoría de los anticuerpos (Ac) en la respuesta humoral, y mediante la determinación de la proporción de estos epítopos antigénicos se pueden identificar las diferentes biovariedades (Sbriglio *et al.*, 2007; Zygmunt *et al.*, 2012; Murray, 2013).

El polisacárido "O" de *Brucella* spp. puede dar lugar a reacciones cruzadas con anticuerpos que se produzcan contra el polisacárido "O" de otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Pseudomonas maltophilia* S555, *Vibrio cholera* O1, *Escherichia coli* O157:H7, *Xanthomonas maltophilia* y *Francisella tularensis* (Fadeel *et al.*, 2011; Al Dahouk *et al.*, 2013). Las especies de *Brucella* que poseen la cadena "O" son lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*), mientras que aquellas en las que está ausente la cadena "O" son las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) (Martínez, 2014). La mayoría de las brucelas patógenas para el hombre poseen LPS en fase lisa y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica (La Paque *et al.*, 2005).

1.3.5. Factores de virulencia

Brucella spp. a diferencia de otras bacterias intracelulares, no exhibe factores de virulencia clásicos como producción de exotoxinas, cápsula, fimbrias, flagelos, plásmidos, inductores apoptóticos o fagos lisogénicos (de Jong y Tsolis, 2012). Sin embargo, posee un conjunto de mecanismos fisiológicos y adaptaciones metabólicas que garantizan la evasión de las defensas del hospedero y su adaptación a la vida intracelular (Baldi y Giambartolomei, 2013).

Entre los determinantes de la virulencia de este microorganismo se encuentran su habilidad para entrar y sobrevivir dentro de células fagocíticas y no fagocíticas y para acidificar el fagosoma (de Jong y Tsolis, 2012). Éste último propicia la expresión de los 12 genes del operón virB, los cuales codifican para el Sistema de Secreción de Tipo IV (SST4, de sus siglas en inglés). Experimentos realizados en líneas celulares y en ratones, sugieren que la interrupción del operón virB da lugar a que la bacteria pierda su capacidad infectiva. Por tanto, su expresión es crucial para la infección, supervivencia y establecimiento del nicho replicativo (de Jong y Tsolis, 2012; Byndloss y Tsolis, 2016).

Otra característica que se considera un factor de virulencia en este género bacteriano es el lípido A del LPS el cual tiene ácidos grasos más extensos que los lípidos A clásicos, siendo este componente el responsable de evitar que *Brucella* genere una respuesta inflamatoria a escala general en el hospedador, y que, por ende, logre mantenerse por largos periodos dentro del hospedero (Von Bargen *et al.*, 2013). Al mismo tiempo, la cadena-O del LPS muestra resistencia a la degradación por los macrófagos y le confiere a este género la capacidad de entrar a la célula usando balsas lipídicas, de inhibir la fusión fagolisosoma y evitar la apoptosis del macrófago que parasitan (de Jong y Tsolis, 2012; Ahmed *et al.*, 2016).

1.3.6. Patogenia

La patogenicidad del género *Brucella* está relacionada con su capacidad para adherirse, penetrar, sobrevivir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células fagocíticas, lo que impide que sean eliminadas por los mecanismos de defensa del organismo (Skendros *et al.*, 2011), o que sean erradicadas por los antimicrobianos (Alavi SM y Alavi L, 2013). Su permanencia en tejidos y órganos “diana” permite las recaídas de la infección (Martirosyan y Gorvel, 2013).

Al penetrar las brucelas al hospedero se adhieren a la membrana plasmática de las células “diana” y forman microcolonias, que le permiten ingresar por macropinocitosis (balsas lipídicas) y formar la BCV (de sus siglas en inglés: *Brucella Containing Vacuole*). Esta bacteria inhibe la fusión de la BCV con los lisosomas, modificando así el proceso de maduración de los fagosomas y creando un nicho intracelular replicativo, en el que se multiplican y permanecen protegidas de los efectos del sistema inmune (Von Bargen *et al.*, 2012; Sycz, 2015; Ahmed *et al.*, 2016).

Las bacterias que escapan de la vía endocítica, quedan protegidas del sistema inmune y pueden proliferar, mientras que las brucelas fagocitadas pueden ser transportadas hacia el bazo, el hígado, la médula ósea, los ganglios linfáticos y los riñones (Martirosyan y Gorvel, 2013). Cuando el número de bacterias dentro de la célula hospedera es muy elevado (entre la primera y séptima semana post-infección), se produce su ruptura y se liberan a la sangre circulante, produciéndose una bacteriemia. De este modo *Brucella* puede diseminarse a cualquier órgano, donde secreta proteínas que, en algunos pacientes, conducen a la formación de los granulomas y el daño tisular propio de las focalizaciones y las manifestaciones de cronicidad de esta enfermedad (Murray, 2013).

1.3.7. Respuesta inmune

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra *Brucella* spp. e involucra a macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares (PMN), células NK (del inglés, *Natural Killer*) y al sistema del complemento. Su función es reducir el número inicial de bacterias y preparar el ambiente para la activación de los mecanismos de la inmunidad adaptativa (Lozano *et al.*, 2012). Inicialmente, las brucelas son fagocitadas por PMN y en ellos logran sobrevivir, multiplicarse y transportarse a los órganos del sistema reticuloendotelial (Vega *et al.*, 2008). Por su parte las células NK juegan un papel trascendental pues secretan interferón gamma (IFN- γ), citoquina que potencia la capacidad fagocítica y microbicida de los macrófagos (Corbel y Beeching, 2012). Entre los mecanismos humorales innatos, destaca el sistema de complemento, resultando efectivo cuando *Brucella* spp. se encuentra extracelularmente y en bajas concentraciones (Lozano *et al.*, 2012).

En la respuesta inmune adaptativa sobresalen la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4+ y T CD8+, citoquina que activa la función bactericida de macrófagos; la citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ frente a macrófagos infectados; y la producción de Ac, especialmente los isotipos IgG₂ e IgG₃, que opsonizan al patógeno y facilitan su fagocitosis (Martirosyan y Gorvel, 2013; Elfaki *et al.*, 2015). La respuesta celular adaptativa de tipo *T helper* 1 (Th1), y las citoquinas IFN- γ , IL-12 (Interleuquina 12) y TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa) son claves en el control de la infección. Las células B y los macrófagos secretan IL-12, dirigiendo la respuesta inmune hacia el tipo Th1. Ello favorece la secreción de IFN- γ y TNF- α , esenciales en la inhibición de la replicación intracelular y en la inducción de la muerte bacteriana (Martirosyan y Gorvel, 2013).

En las infecciones por *Brucella* los IgM, aparecen en la 1^{era} y 2^{da} semanas de la infección, seguidos por los IgG. Ambos aumentan durante las siguientes semanas y al parecer opsonizan a los microorganismos, facilitan la fagocitosis y confieren resistencia a las reinfecciones (Lucero *et al.*, 2008; Elfaki *et al.*, 2015).

1.4. Epidemiología

La brucelosis humana tiene una distribución mundial, pero es endémica en países del Mediterráneo (de África y Europa), del Medio Oriente, de Asia Central, de la India, de América Central y de América del Sur (Glynn y Dragon, 2011; Martínez, 2013; Elfaki *et al.*, 2015). En América Latina, los países con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú (DE, 2013; Kassiri *et al.*, 2013).

Los principales reservorios de las brucelas son los animales domésticos. Entre los más frecuentes se encuentran las ovejas, las cabras, el ganado vacuno, los cerdos, los perros, los caballos y los camellos (Díaz *et al.*, 2011). Los animales enfermos son capaces de excretar las bacterias durante mucho tiempo a través de los fluidos uterinos, los fetos muertos, la placenta o la leche materna (Radamés, 2013).

La infección del ser humano es un accidente en la cadena epidemiológica en el que la transmisión puede ocurrir de forma directa o indirecta (Díaz *et al.*, 2011). La vía directa incluye el contacto de heridas o conjuntivas humanas con órganos o secreciones del animal enfermo; la inhalación de aerosoles en ambientes contaminados con estos gérmenes; o la inoculación accidental del microorganismo. Mientras que, la vía indirecta se refiere a la ingestión de productos de origen animal contaminados por brucelas, entre los que se destacan las carnes mal cocidas, y los productos lácteos no pasteurizados adecuadamente como la leche, el queso, la mantequilla, o los helados (Canal, 2011; Martínez, 2013; López, 2014). La transmisión de persona a persona es muy rara. Existen reportes de transmisión por vía sexual, a través de transfusiones de sangre, luego de trasplantes de órganos o tejidos, por vía transplacentaria, o a través de la lactancia materna (Oliveira *et al.*, 2015; Alnemri *et al.*, 2017).

El periodo de incubación de la brucelosis es variable, suele durar entre 5 y 60 días o extenderse por más tiempo (Araj, 2010; Corbel y Beeching, 2012; Martínez, 2013). La enfermedad es más frecuente en el sexo masculino, en edades comprendidas entre 30 y 40 años y en zonas rurales (Ariza, 2016). En los países endémicos se considera una enfermedad ocupacional (Galińska y Zagorski, 2013).

Los principales grupos de riesgo son el personal de laboratorio, los veterinarios, los granjeros, carniceros, entre otros. (DE, 2013; Galińska y Zagorski, 2013; Garshasbi *et al.*, 2014). Entre las medidas para no adquirir la enfermedad se encuentran la vacunación del ganado y el sacrificio o curación de los animales infectados; la correcta pasteurización de la leche y sus derivados; así como el uso de guantes, mascarilla y bata que protejan ante las secreciones de posibles animales infectados. (Vega *et al.*, 2008; Glynn y Dragon, 2011; Alavi y Motlagh, 2012).

1.5. Manifestaciones clínicas

En dependencia del curso de la enfermedad se describen las formas clínicas aguda, subaguda, subclínica y crónica (Galińska y Zagorski, 2013). La evolución y gravedad del cuadro dependen de factores que incluyen el estado del sistema inmune del hospedador, la presencia de enfermedades concomitantes, la concentración del inóculo y la especie de *Brucella* implicada en la infección (Vega *et al.*, 2008; Ariza, 2016).

La brucelosis aguda puede presentarse de forma leve y transitoria o grave, ambas acompañadas de fiebre alta y síntomas inespecíficos. La fiebre puede durar varias semanas, y en algunos casos muestra el patrón ondulante clásico de aparición en el atardecer y la noche. Los pacientes suelen presentar malestar general, escalofríos, sudación profusa con olor característico a paja mojada, astenia, anorexia, debilidad y artralgias pérdida de peso, cefalea, mialgias, dolor lumbar, náuseas y dolor abdominal, entre otros síntomas (Corbel y Beeching, 2012; Dean *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015). El examen físico generalmente no muestra alteraciones, aunque puede aparecer hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatías (Vega *et al.*, 2008; Alavi y Motlagh, 2012; Dean *et al.*, 2012).

La brucelosis subaguda se describe fundamentalmente en áreas endémicas y tiene un tiempo de evolución entre dos y doce meses (Buzgan *et al.*, 2010). Se incluyen en esta forma clínica los pacientes que no completan el tratamiento antimicrobiano. En este caso el patrón clínico es más variado y solapado que el de la forma aguda, predominando la astenia y la artralgia (Ariza, 2002).

La brucelosis subclínica o asintomática, aparece con frecuencia en personas con factores de riesgo ocupacionales como veterinarios, pastores, trabajadores de mataderos o de la industria láctea. Estos individuos suelen presentar títulos elevados de anticuerpos sin evidencia de infección clínica. También existen reportes de bacteriemia asintomática por *Brucella* spp. en estos casos (Celebi *et al.*, 2007).

La brucelosis crónica ocurre cuando tras un episodio de brucelosis aguda y un tratamiento antimicrobiano adecuado, los síntomas persisten más de un año, con o sin enfermedad localizada; o cuando como consecuencia de la ausencia de diagnóstico temprano y tratamiento oportuno los síntomas persisten durante todo este tiempo. La persistencia de altos títulos de anticuerpos IgG constituye un importante hallazgo de laboratorio en estos casos (Ariza, 2002; Alavi y Motlagh, 2012).

El desarrollo de focalizaciones o complicaciones es característico de la brucelosis y pueden presentarse en cualquier fase de la enfermedad. Aparecen hasta en el 30% de los pacientes, acompañadas o no de síntomas sistémicos (Ariza, 2002; Vega *et al.*, 2008). La enfermedad osteoarticular es la complicación más común e incluye presentaciones como la espondilitis y la artritis de grandes articulaciones, entidades de difícil tratamiento, que acarrearán incapacidad e impotencia funcional (Al Dahouk y Nöckler, 2011; Godfroid *et al.*, 2011; Ariza, 2016). Otras focalizaciones frecuentes son la endocarditis, meningioencefalitis, prostatitis, epidídimo-orquitis, salpingitis, hepatitis granulomatosa difusa, abscesos hepáticos, infiltrados pulmonares asociados a derrame pleural, uveítis y queratoconjuntivitis (Corbel y Beeching, 2012; Alavi y Motlagh, 2012; DE, 2013).

1.6. Tratamiento

El tratamiento de la brucelosis humana requiere de una antibióticoterapia combinada y prolongada (para evitar las recaídas), que en algunos casos se debe acompañar de una intervención quirúrgica. Dado su carácter intracelular se deben utilizar medicamentos que penetren y actúen en el interior de las células fagocíticas (Schutze y Jacobs, 2013; Rodríguez y Solera, 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda dos esquemas de tratamiento: ambos incluyen la doxiciclina (100 mg/12 h v.o.) durante seis semanas, combinada con estreptomina (1 g/día i.m. [750 mg si más de 50 años]) durante dos a tres semanas, o con rifampicina (600-900 mg/día) durante seis semanas.

Cuando se utiliza la estreptomina los fracasos terapéuticos y las recaídas no sobrepasan el 5%, pero el segundo esquema que incluye la rifampicina es el más utilizado, porque los pacientes muestran mayor adherencia a él (Ariza, 2016; DE, 2013; Corbel *et al.*, 2013). Algunos autores reportan mejores resultados con el uso de la triple terapia que incluye doxiciclina, rifampicina, y gentamicina intramuscular, a razón de 5 mg/kg de peso durante dos semanas (Skalsky *et al.*, 2008). En los niños mayores de ocho años se mantienen los mismos esquemas de tratamiento (Schutze y Jacobs., 2013; Fruchtman *et al.*, 2015), pero debido a la toxicidad de las tetraciclinas, la doxiciclina se debe sustituir por trimetoprim-sulfametoxazol en los niños pequeños y las embarazadas (Skalsky *et al.*, 2008; Schutze y Jacobs, 2013; Fruchtman *et al.*, 2015).

1.7. Diagnóstico

1.7.1. Diagnóstico diferencial y hallazgos del laboratorio clínico

El diagnóstico diferencial se realiza fundamentalmente con entidades que causan síndrome febril como la fiebre tifoidea, la leptospirosis, la malaria, el dengue, la tuberculosis, la toxoplasmosis, los linfomas y las infecciones por los virus Epstein-Barr, hepatitis y citomegalovirus (Corbel y Beeching, 2012; Ariza, 2016; Schutze y Jacobs, 2013).

Los resultados de los exámenes del laboratorio clínico no brindan información concluyente. Solo suelen aumentar, en algunos casos, los niveles séricos de las enzimas hepáticas y de la bilirrubina, y aparecer, en algunos pacientes, anemia y leucopenia, pero la velocidad de eritrosedimentación y la proteína C presentan valores normales (Franco *et al*, 2007; Buzgan *et al*, 2010).

1.7.2. Diagnóstico Microbiológico

El diagnóstico microbiológico de la brucelosis se requiere ante todo paciente con síntomas y signos compatibles con la enfermedad, y con antecedentes epidemiológicos que sugieran el contacto con *Brucella* spp. (Al Dahouk y Nöckler, 2011; Rodríguez y Solera, 2014). La confirmación o no de los casos depende de los resultados que brinde el laboratorio de microbiología (MINSAP, 2013).

Las muestras útiles para este diagnóstico son sangre, suero, médula ósea, LCR, líquidos corporales, pus y el material obtenido por aspiración de órganos afectados. De acuerdo al tipo de muestra clínica se realizan procedimientos bacteriológicos, serológicos y moleculares. Al suero se le aplican técnicas serológicas y moleculares, mientras que las restantes muestras se utilizan en el diagnóstico bacteriológico y molecular. Para la selección del tipo de muestra y el momento de su obtención es preciso tener en cuenta la fecha de inicio de los síntomas y el cuadro clínico que presente el paciente (Murray, 2013).

1.7.2.1. Aislamiento, cultivo e identificación

El aislamiento y cultivo de las brucelas es la prueba de oro para el diagnóstico de la brucelosis humana (Gupte y Kaur, 2015). El cultivo es un método muy específico, pero su sensibilidad varía entre un 15 y un 70% en los casos agudos y resulta inferior en los pacientes con infección crónica (Ghezelsofla *et al.*, 2015). Entre los factores que conspiran contra el éxito del aislamiento se encuentran el uso de antibióticos antes de la toma de muestra, el número insuficiente de microorganismos en las muestras clínicas, y la elección del método para realizar el cultivo (Araj, 2010; Al Dahouk y Nöckler, 2011; Alikhani *et al.*, 2013).

El método ideal para el aislamiento de las brucelas es el hemocultivo. Se recomienda la obtención de tres muestras de sangre en un periodo de 24 horas, antes de iniciar tratamiento antimicrobiano y cercanas el pico febril (Rodríguez y Solera, 2014). No obstante, es importante señalar que, debido a que la bacteriemia por *Brucella* spp. no siempre se acompaña de fiebre o escalofríos, aunque estén ausentes estos síntomas, siempre que se sospeche la enfermedad es recomendable realizar este proceder (Castaño, 2010).

El cultivo se realiza en medios bifásicos como el de Ruiz-Castañeda, o en medios sólidos como Agar Sangre, Agar Chocolate, Agar *Brucella*, Agar Soya Tripticasa y Agar Suero Dextrosa. Siempre que se sospeche la presencia de *B. ovis* o *B. canis* hay que añadir a la base del medio de cultivo de un 2-5% suero bovino o equino como suplemento, porque estas especies tienen requerimientos nutricionales estrictos (Lucero *et al.*, 2008).

Los cultivos se incuban de 35 a 37°C, en atmósfera que contenga entre un 5-10% de CO₂ (Geresu y Kasa, 2016). El tiempo de incubación fluctúa entre una y tres semanas, y en ocasiones hasta 35 días (Al Dahouk y Nöckler, 2011; Al Dahouk *et al.*, 2013). En los sistemas automatizados como BACTEC y BacTAlert, el crecimiento bacteriano ocurre en un promedio de siete días, pero esta tecnología no está disponible en la mayoría de los países donde prevalece esta enfermedad (Araj, 2010; Alikhani *et al.*, 2013).

El crecimiento de las brucelas se visualiza como colonias pequeñas (0,5-1 mm de diámetro) translúcidas, convexas, de bordes regulares, color ámbar, brillantes, no hemolíticas en Agar Sangre, y de crecimiento pobre en Agar McConkey, sin fermentar la lactosa (Al Dahouk y Nöckler, 2011). Su identificación en especies mediante métodos convencionales incluye el crecimiento en presencia de CO₂, la producción de ureasa, de ácido sulfhídrico y la sensibilidad a colorantes como la fucsina y la tionina.

Además, se puede realizar la serotipificación con los sueros monoespecíficos A, M y R, para diferenciar entre las especies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis*. De igual manera, algunos laboratorios utilizan el fagotipaje, método sustentado en la capacidad que presenta *Brucella* para absorber bacteriófagos, según sea la especie y fase colonial (lisa o rugosa) en que se encuentre (Al Dahouk, 2003; Al Dahouk y Nöckler, 2011).

Dado que el aislamiento y cultivo de *Brucella*, es un proceder altamente riesgoso para el personal de laboratorio que lo realiza (Mohamed *et al.*, 2015; Ghezelsoufi *et al.*, 2015;), la OMS sugiere que las muestras de pacientes con sospecha de brucelosis se trabajen en cabinas con nivel de bioseguridad II y que la manipulación de los cultivos y cepas se realice en gabinetes con nivel de bioseguridad III (Lowe *et al.*, 2015).

1.7.2.2. Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) permite obtener “in vitro” millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. Esta técnica se basa en la síntesis de dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Serrato *et al.*, 2014).

Numerosos estudios han demostrado que la PCR es una herramienta muy útil para el diagnóstico oportuno de la brucelosis aguda, para la detección precoz de recidivas y para el seguimiento de los pacientes luego de que culminan el tratamiento (Mitka *et al.*, 2007; Al Ajlan *et al.*, 2011). Esta técnica permite la detección sensible, específica, rápida y precisa de ADN de *Brucella* spp. pero es por lo general costosa y su principal desventaja radica en que no puede diferenciar entre el ADN de un microorganismo vivo o muerto. (Al Dahouk, 2013; Rodríguez y Solera, 2014).

La PCR simple o convencional presenta con frecuencia variaciones en su sensibilidad y especificidad, lo cual depende principalmente de los cebadores que se utilicen (Wang *et al.*, 2014). Entre los cebadores diseñados para amplificar secuencias dianas del genoma de *Brucella* se encuentran los que codifican para el ARNr 16S (F₄R₂) (Romero *et al.*, 1995; Nimri, 2003), para la proteína de membrana externa omp2 (JP4/JPR) (Leal-Klevezas *et al.*, 1995), y para una proteína inmunogénica de membrana externa de 31 kDa de *B. abortus* que está presente en todas las especies de *Brucella* (BCSP 31) (B₄B₅) (Matar *et al.*, 1996; Queipo-Ortuño *et al.*, 1997), entre otros. Los cebadores que tienen como blanco molecular el gen *bcsp* 31 son los que con mayor frecuencia se utilizan en las PCR implementadas para el diagnóstico de brucelosis. (Baily *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2014; Zahidi *et al.*, 2015).

La PCR en tiempo real también se ha aplicado a la detección de ADN de brucelas. Esta técnica combina la amplificación y la detección de ADN en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (Serrato *et al.*, 2014). Posee características importantes como son su alta especificidad, su amplio rango de detección, la rapidez en la visualización del producto y su reproducibilidad (Geresu y Kasa, 2016). Además, no es necesario realizar electroforesis posteriores a la amplificación, lo que elimina el riesgo asociado a la manipulación del bromuro de etidio, así como posibles contaminaciones entre los productos amplificados (Castaño, 2010; Geresu y Kasa, 2016).

Otras variantes de PCR se emplean como herramientas moleculares en la tipificación de *Brucella* spp. sobre todo en estudios de brotes y de taxonomía y evolución de este germen (Wang *et al.*, 2014). Entre ellas destaca la PCR-REP (del inglés *Repetitive Extragenic Palindromic*) (Tcherneva *et al.*, 1996), la PCR- RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (Al Dahouk *et al.*, 2005), la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y el análisis de secuencias multilocus (MLSA) (Scholz y Vergnaud, 2013).

1.7.2.3. Diagnóstico serológico

Los métodos serológicos son técnicas que consumen poco tiempo y que se reproducen con facilidad, por lo que son ampliamente utilizados en el diagnóstico de brucelosis humana (Pappas *et al.*, 2005). Para detectar anticuerpos producidos en respuesta a la presencia de cepas lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) se recomiendan utilizar suspensiones bacterianas de las cepas *B. abortus* 1119-3 y *B. abortus* 99S, mientras que para detectar la presencia de anticuerpos anti *B. canis* y *B. ovis* (especies rugosas), se necesitan antígenos específicos de especie (Geresu y Kasa, 2016).

Los anticuerpos que se producen durante la primera y segunda semanas de iniciada la infección por *Brucella* spp. son específicos y aglutinantes fundamentalmente del isotipo IgM. Estos pueden ser detectados mediante pruebas de aglutinación (Rodríguez y Solera, 2014). Si el sistema inmune no logra controlar la infección, aparecen, más tarde, anticuerpos IgG e IgA con poca o nula capacidad aglutinante (incompletos o bloqueantes), que alcanzan concentraciones elevadas en las infecciones crónicas (Mantur *et al.*, 2007; Rodríguez y Solera, 2014). A continuación, se describen algunas de las técnicas serológicas utilizadas para la detección de los mismos.

Rosa de Bengala es una prueba de aglutinación que detecta anticuerpos aglutinantes dirigidos contra el lipopolisacárido de las brucelas. Esta técnica utiliza como antígeno una suspensión bacteriana que está mezclada con el colorante Rosa de Bengala (Geresu y Kasa, 2016). Es una prueba rápida de aglutinación, poco costosa e ideal para la pesquisa, pero todo resultado positivo que se obtenga con ella debe ser confirmado con el cultivo o, en su defecto, por otras pruebas serológicas complementarias. Sus falsos negativos se limitan a enfermos con procesos de pocos días de evolución y a algunos casos de enfermedad de curso muy prolongado. (Kaltungo *et al.*, 2013; Rodríguez y Solera, 2014).

La seroaglutinación en tubos (seroaglutinación lenta en tubos o reacción de Wright) es la prueba más utilizada. Esta técnica es sencilla, sensible, específica y detecta anticuerpos antibrucelas que se producen contra el lipopolisacárido de la bacteria. La prueba se realiza enfrentando diluciones crecientes del suero problema a una cantidad constante de una suspensión de brucelas formolizadas a una concentración preestablecida y estandarizada (Pabuccuoglu *et al.*, 2011; Rodríguez y Solera, 2014). Como la actividad aglutinante de un suero está ligada a inmunoglobulinas de las clases IgM, IgG e IgA, pero especialmente a la IgM, este test puede resultar negativo en pacientes con varios meses de evolución (Nouri *et al.*, 2014).

Por su parte la prueba 2-mercaptoetanol es una variante de la Seroaglutinación en tubos en la que el suero se trata con este reactivo. Este compuesto es capaz de destruir las moléculas de IgM, por lo que permite cuantificar hasta que dilución del suero del paciente existen anticuerpos IgG. Debido a la elevada toxicidad de esta sustancia, en la actualidad esta prueba se encuentra en desuso (Nouri *et al.*, 2014, Geresu y Kasa, 2016).

La Prueba de Coombs es la prueba de elección para el diagnóstico de la brucelosis crónica y se utiliza para demostrar la presencia de anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes, fundamentalmente IgG, en el suero del paciente. En esta reacción, el suero de Coombs (inmunoglobulina humana) facilita la aglutinación de los anticuerpos no aglutinantes del suero problema, que han sido fijados a una suspensión antigénica de *B. abortus*. Es por ello que el título obtenido es, como mínimo, el de la aglutinación, resultando generalmente mucho más elevado, en proporción al tiempo de evolución del paciente (Gupte y Kaur, 2015).

En el mercado internacional existe un estuche comercial denominado Brucellacapt, comercializado por la firma española VIRCELL (www.vircell.com). Esta es una técnica de inmunocaptura - aglutinación, con el mismo principio de la prueba de Coombs. Emplea anticuerpos IgG e IgA antihumanos y en un solo paso permite detectar anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes presentes en el suero del paciente, luego de 24 horas de incubación (Rodríguez y Solera, 2014).

Por su parte, los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) pueden detectar IgM, IgG e IgA de forma rápida y con una alta sensibilidad y especificidad. Son la prueba de elección especialmente cuando existe una alta sospecha clínica y otras técnicas resultan negativas. (Borsa *et al.*, 2016). En la mayoría de ellos el antígeno ligado a la fase sólida es el lipopolisacárido de la pared bacteriana (*Brucella abortus* 99) más o menos purificado, pero algunos utilizan al microorganismo entero o proteínas específicas de membrana (Nouri *et al.*, 2014). A pesar de que permiten conocer con una mayor precisión el perfil de las inmunoglobulinas en el curso de la enfermedad, e inferir si el paciente está cursando por la fase aguda o crónica de la enfermedad, esta técnica tampoco ofrece la posibilidad de establecer un criterio para discernir entre curación y evolución a cronicidad (Özdemir *et al.*, 2011).

1.8. Economía en salud

La economía de la salud es la rama de la economía que se centra en el estudio de cómo se utilizan los recursos para satisfacer las necesidades de salud, ya sea en el contexto de un individuo o en el de un grupo de población (Rodríguez y Vidal, 2007; Ramiro y Guevara; 2013). La evaluación económica forma parte de ella porque es el proceder que conjuga los resultados o beneficios que se pudieran obtener o se han obtenido en cualquier rama de la economía, teniendo en cuenta más de una alternativa y sus costos (Valenzuela *et al.*, 2013). El principal propósito de una evaluación económica es promover el uso más eficiente de los recursos en un ambiente de escasez (Zárate, 2010). En el sector de la salud su aplicación da la posibilidad de ir desde la evaluación de los costos de los servicios y las tecnologías hasta la evaluación de la eficiencia de las mismas. (Varian HR, 2004).

Las evaluaciones económicas se clasifican, según su alcance, en completas o parciales. Se consideran evaluaciones económicas completas aquellas que toman en consideración, tanto los costos como las consecuencias (resultados) de diferentes opciones comparadas, por lo que permiten determinar la eficiencia económica de las acciones sanitarias o programas.

Siendo así se describen cuatro tipos principales: análisis de costo-minimización, análisis costo-efectividad, análisis costo-utilidad y análisis costo-beneficio (Valenzuela *et al.*, 2013). Estos análisis se diferencian entre sí en que, a pesar de emplear una metodología similar en la estimación de costos, el método que utilizan para estimar los beneficios es diferente para cada uno de ellos (Zárate, 2010). Por otra parte, las evaluaciones económicas parciales son aquellas en las que se evalúa un aspecto de la evaluación económica, los costos o los resultados, pero sin compararlos con otras alternativas (Valenzuela *et al.*, 2013). Estas evaluaciones involucran los estudios de: descripción de costos, descripción de costo-consecuencia y análisis de costos (Zárate, 2010).

1.8.1. Perspectiva y horizonte analítico

Al realizar una evaluación económica debe considerarse el punto de vista o perspectiva desde la cual se va a realizar, dado que ello conduce a cambios en los costos y en las consecuencias o beneficios a incluir en el análisis (Ramiro y Guevara; 2013). Esto se refiere al punto de vista que se adopte para responder a la pregunta de elección entre las opciones en competencia.

Hay dos perspectivas bien definidas: la social, dónde son relevantes todos los costos y beneficios (daños) no importa quien pague y quien reciba los beneficios; y la de grupos específicos en la sociedad, perspectiva del proveedor de los servicios, donde los costos de los pacientes no son evaluados, solo son relevantes los costos que recaen sobre la entidad estatal de salud (Fox-Rushby, 2006; Ramiro y Guevara; 2013).

Por otra parte, el horizonte analítico es el intervalo de tiempo durante el cual se observan costos y beneficios. Este debe ser seleccionado de tal forma que incluya todos los costos y beneficios relevantes en que se incurra (Baly, 2010).

1.8.2. Los costos

El costo es la expresión financiera del consumo de los recursos para producir un bien o un servicio (Flessa S, 2009). Los costos expresan este consumo en unidades monetarias, tales como pesos cubanos (CUP), pesos cubanos convertibles (CUC), dólares estadounidenses (USD), euros (EUR), etc. Este consumo representa un sacrificio de recursos que no podrán ser utilizados para producir otro bien o servicio. (Flessa S, 2009).

En el contexto de los servicios de salud, los costos se clasifican como sigue. Atendiendo a su finalidad el costo puede ser real, cuando refleja los recursos gastados para efectuar una determinada actividad; o de mercado, si representa el precio en que se compra y se vende un producto o servicio. Tomando en consideración la identificación del servicio se clasifican como directos o indirectos. Los costos directos son los que se asocian al servicio que se está ejecutando, es por ello que se consideran como tales aquellos gastos originados por el pago de la fuerza de trabajo de quien ejecuta directamente las acciones, los consumos de los materiales utilizados, los servicios y otras obligaciones que puedan asociarse de forma directa a la actividad que se ejecuta. Por su parte, los indirectos constituyen gastos o partes de gastos que no pueden asociarse de manera directa a la ejecución de las actividades y por regla general, se originan en otras áreas organizativas que apoyan las acciones de los que lo reciben, se consideran como tal los derivados del agua, teléfono, electricidad, entre otros (Valenzuela *et al.*, 2013).

Según la duración los costos se clasifican como costos de capital, cuando se refiere a recursos de larga duración conocidos también como activos fijos (edificios, muebles, equipos, computadoras, vehículos), y como costos de operación o recurrentes los que se consumen o gastan durante la producción de un bien o servicio y se adquieren regularmente (salarios, medicamentos, combustible, electricidad, alimentos, papelería).

Atendiendo a su comportamiento los costos pueden ser fijos, cuando no varían aunque el nivel de actividad cambie (como ocurre con el sueldo de los profesionales); variables, cuando varían con el nivel de actividad porque se relacionan directamente con la cantidad de bienes y servicios producidos; fijos de amortización, los que se refieren a los costos de depreciación de los bienes; totales, cuando incluyen los costos fijos y variables relacionados con la producción de un bien o servicio; promedio o unitario, que es aquel que se refiere al valor medio de producir un bien o servicio y resulta de dividir el costo total entre el número total de productos o acciones; y marginal, que es el costo de producir una unidad de actividad o servicio adicional. Por último, teniendo en cuenta el tipo de sacrificio incurrido el costo se clasifica como de oportunidad que es aquel en que se incurre por tomar una decisión en lugar de otra (Valenzuela *et al.*, 2013).

La aproximación a la estimación de todos estos costos puede ser hecha por microcosteo o macrocosteo (Gold 1996). El microcosteo también llamado costeo por ingredientes o de abajo hacia arriba, identifica los elementos del costo a través de la descripción del proceso productivo. Estos elementos del costo, se miden utilizando diferentes técnicas de recolección de datos como la revisión documental (ejemplo: registros de contabilidad), entrevistas, encuestas u observación directa. Después se van agregando por actividad o actor o nivel o alguna combinación de estos, hasta conformar los llamados costos totales por actividad, actor, nivel o alguna combinación de ellos. El macrocosteo, costeo bruto o de arriba hacia abajo, estima los costos a partir de unidades agregadas de costo conocidas (Haddix *et al.*, 2003).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño de la investigación y sitio de estudio

Se realizó un estudio de corte transversal para validar y estimar los costos económicos parciales de la microtécnica del FAB, que se utiliza para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp. La investigación se efectuó en el Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y Brucelas (LNREB) del IPK, entre enero y junio de 2017.

2.2 Universo de estudio

El universo de estudio quedó constituido por todos los sueros que se recibieron en el LNREB para diagnóstico y referencia de brucelosis humana entre enero y junio de 2017. También incluyó aquellos pertenecientes a las serotecas de los laboratorios del Centro de Diagnóstico, Referencia e Investigación del IPK que trabajan los siguientes microorganismos: *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., Virus de la Hepatitis B y C, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr.

2.3 Muestras de trabajo

Las muestras de los grupos I, II y III se utilizaron para desarrollar el objetivo 1, el cual se cumplimentó entre enero y febrero de 2017. Los grupos de muestras quedaron constituidos como sigue:

G I: Siete sueros controles de la seroteca del LNREB del IPK, que contenían o no anticuerpos contra *Brucella* spp. Los títulos de anticuerpos fueron determinados por la técnica semicuantitativa en tubo del FAB. Dentro de ellos cinco sueros seropositivos con títulos de 20, 40 (reactivo), 80 (sospechoso), 160 y 320 (positivo). Además, se incluyeron dos sueros negativos por FAB.

G II: 50 sueros que procedían de la seroteca del LNREB positivos a brucelosis humana por las técnicas serológicas de FAB comercial, ELISA-IgM y ELISA- IgG.

G III: 100 sueros de pacientes negativos a brucelosis humana por las técnicas FAB comercial, ELISA-IgM y ELISA-IgG. De los mismos, 50 sueros pertenecían a pacientes “supuestamente sanos” donantes de sangre, proporcionados por el Banco Provincial de la Habana. Los restante otros 50 sueros procedían de individuos con patologías infecciosas cuyos agentes etiológicos pueden cruzar antigénicamente con *Brucella* spp., siendo la distribución la siguiente: *Leptospira* spp. (10), *Toxoplasma gondii* (10), Virus de Hepatitis B (10) y C (7), Citomegalovirus (10) y Virus Epstein Barr (3). El diagnóstico microbiológico de estos agentes etiológicos se confirmó en los respectivos laboratorios de referencia del IPK, usando los algoritmos establecidos para cada uno de ellos.

Para dar salida al objetivo 2, se estableció el Grupo IV, que incluyó 486 sueros de pacientes con sospecha de brucelosis humana, y que se recibieron en el laboratorio, para diagnóstico y referencia, entre marzo y junio de 2017.

Para responder al objetivo 3 se analizaron, en particular, las 182 muestras (sueros) que se recibieron en el laboratorio, para diagnóstico y referencia, durante los meses de marzo y abril de 2017.

2.4 Técnicas y procedimientos

La recolección, procesamiento, conservación de las muestras y confirmación de los casos, se realizó según lo establecido en los Procedimientos y Normativas Operacionales (PNO) del LNREB del IPK, cumplimentando las Buenas Prácticas de Laboratorio. Todos los sueros se conservaron a -20° C hasta su uso.

2.4.1 Técnicas serológicas

En el presente estudio se emplearon técnicas serológicas con la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos anti-brucelas. La técnica comercial del FAB y los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG para *Brucella*, aparecen descritas en los anexos 1, 2 y 3, respectivamente. Los sistemas ELISA fueron considerados como método de referencia. En cada caso se procedió según las indicaciones del fabricante.

2.4.1.1 Normalización de la microtécnica del FAB utilizando sueros controles

Para la normalización de la microtécnica en placa del FAB se realizaron modificaciones a la metodología descrita para la prueba semicuantitativa del FAB de la firma comercial Diesse, con referencia 21212/CUB.

Se disminuyeron en su décima parte los volúmenes de solución salina (SS), del suero y de la suspensión bacteriana propuestos. Se emplearon placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo U. Los materiales utilizados fueron puntas (de 5 a 200 μ l), pipeta semiautomática (2 a 20 μ l) y pipeta semiautomática multicanal (5 a 200 μ l). Los ensayos se realizaron con los sueros controles de los grupos referidos en el acápite 2.3.

Al utilizar la décima parte de los volúmenes descritos en el protocolo convencional del FAB, se añadieron 190 μ l de SS en el primer pocillo y 100 μ l en los restantes siete pocillos. Luego se colocaron 10 μ l de suero del paciente en el primer pocillo y tomando 100 μ l, se realizaron diluciones seriadas y al doble, de modo que el suero del paciente quedara diluido desde 1:20 hasta 1:2560.

Finalmente se adicionaron 5 μ l de la suspensión bacteriana, se cubrieron las placas con nylon y se colocaron en incubación con atmósfera húmeda, a 37°C de 18 a 24 horas. Posteriormente se realizó la lectura visual, esperando encontrar formación de la malla de aglutinación según las diluciones que tenían los sueros positivos, y el punto de sedimentación o botón en los sueros negativos.

Para demostrar la exactitud de la microtécnica de FAB, se esperó encontrar un 100% de concordancia entre el resultado de las mediciones que se realizaron y el de los sueros positivos y negativos utilizados como controles. Para establecer la precisión intra e inter-ensayo se trabajó cada una de las muestras por triplicado, bajo las mismas condiciones y en días alternos. Se esperó obtener los mismos resultados en el 100% de las repeticiones, garantizando la repetitividad de la técnica. No se midió la reproducibilidad.

2.4.1.2 Evaluación de la microtécnica del FAB

Para calcular los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnósticas de la microtécnica del FAB, se utilizaron las muestras de sueros de los grupos II y III. Se tomaron como pruebas de referencia los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG.

2.4.1.3 Aplicación de la microtécnica del FAB

La microtécnica en placa del FAB se aplicó a todos los sueros del grupo IV que resultaron reactivos a la prueba cualitativa del FAB. Al unísono, los sueros del referido grupo se estudiaron con el FAB de la firma comercial Diesse. Se compararon los resultados obtenidos por ambas técnicas. Debido a las posibles diferencias entre la microtécnica y el FAB comercial en cuanto a soporte y volúmenes, se admitieron variaciones en ± 1 dilución entre los resultados de ambas. La interpretación de los resultados de las dos pruebas se realizó como sigue: títulos de 20 y 40 fueron considerados como reactivos, títulos de 80 como sospechosos, y títulos iguales o superiores de 160 como positivos. Según establece el PNO del LNREB, a todos los sueros reactivos en tarjeta (prueba cualitativa) se le realizó la confirmación del diagnóstico por los sistemas ELISAs IgM –IgG *Brucella*.

2.4.2 Costos: recolección y clasificación

El análisis de costos se realizó desde la perspectiva del LNREB. Se estimaron los costos de las tres actividades para completar el diagnóstico: recepción de las muestras, ejecución de la prueba cualitativa FAB y la realización de la microtécnica del FAB.

Los datos de la utilización de los recursos para realizar el cálculo de los costos directos de las actividades antes mencionadas, se recolectaron por microcosteo, a través de la técnica de informantes claves para describir la ficha del proceso (Anexo 4). Esta última se utilizó como base para la medición de la frecuencia de utilización de cada tipo de insumo o recurso según la actividad realizada, a través de la revisión documental de registros contables y/o estadísticos, observación directa y encuestas auto administradas.

La información sobre la recepción de la muestra en el IPK y el traslado al LNREB se recogió en una encuesta descriptiva compuesta por 22 preguntas abiertas (Anexos 5). La descripción del FAB cualitativo, semicuantitativo en tubo y de la microtécnica se obtuvo a partir de una encuesta descriptiva con 65 preguntas, de las cuales 63 fueron abiertas y dos cerradas y dicotómicas (Roldán y Fachelli, 2015) (Anexos 6).

Por otra parte, los costos indirectos se tomaron como el 49% de los costos directos, a partir de la información del Departamento de Contabilidad del IPK. Los costos, en general, se clasificaron de acuerdo a lo que plantean Johns y cols. (2003). La clasificación inicial se hizo por actividad y luego por naturaleza del costo, quedando divididos en costos recurrentes y de capital. Los recurrentes incluyeron los salarios, los materiales, los reactivos y el material de oficina. Los de capital se circunscribieron a la amortización de los equipos de laboratorio y muebles.

2.5 Análisis de los datos

La información de esta investigación se introdujo en Bases de Datos diseñadas al efecto empleando el programa Excel (Microsoft Office), y para su análisis se utilizaron el paquete estadístico EPIDAT 3.1. y el ADD-IN de EXCEL@Risk. Se calcularon los porcentajes de la sensibilidad y la especificidad diagnósticas, así como el índice de concordancia o validez entre la metodología propuesta y la convencional, estimándose un intervalo de confianza (IC) del 95% y un valor de $p \leq 0,05$.

Como consecuencia del corto periodo de estudio para este objetivo (dos meses) y de que el número de mediciones que se realizó fue estadísticamente insuficiente, se previó (o un verbo similar) la posibilidad de obtener una alta incertidumbre para la media de los costos en cada diagnóstico por la microtécnica del FAB, lo cual arrojaría resultados desviados de la realidad. Por tal motivo, se aplicó una simulación Monte Carlo, consistente en asignarle distribuciones de probabilidad a las variables “inputs” sobre las cuales se tenía incertidumbre (ejm: tiempo que el técnico utiliza para realizar una determinación).

Posteriormente se muestreó un número repetido de veces (500 veces en nuestro caso), para obtener así 500 valores distintos de la variable “input”, con lo cual se calcularon la media muestral y la desviación estándar. La media de las variables “input” fue multiplicada por su precio correspondiente (precios constantes del 2017) y así se calculó el costo medio por cada muestra en la realización de la variante de la prueba semicuantitativa del FAB, en el LNREB. Simultáneamente, este cálculo fue introducido en la expresión analítica de las variables “output” [ejm: costo total de una determinación, que es la suma del tiempo promedio para realizar una determinación (variable “input”) más los costos de materiales y los costos de capital], para calcular su media y distribución de frecuencias. Las distribuciones de las variables “inputs” fueron asignadas utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Siegel, 1970), con la que se puede determinar si la distribución teórica que se le asigna a los datos proviene de la misma distribución de los datos empíricos.

Por último, se halló el costo medio total de la microtécnica semicuantitativa del FAB y de la prueba semicuantitativa del FAB comercial, para comparar los resultados de ambas. Se consideró un intervalo de confianza del 95% del costo total medio mencionado y se representó gráficamente a través de un histograma de frecuencias.

La depreciación de los medios de capital se hizo por el método de anualización a una tasa de interés del 3%, valor de restitución según precios de mercado del 2017, tiempo promedio de vida útil según medio de capital y un valor de desecho del 20%. Todos los costos fueron expresados en CUP utilizando la tasa oficial de cambio de 1USD=24 CUP, para aquellos productos que son importados. Las correspondientes tablas de datos fueron elaboradas en EXCEL 6.0 y analizadas con un add-in de EXCEL @Risk 5.0 profesional.

2.6 Consideraciones éticas

La información obtenida en esta investigación fue tratada con carácter confidencial, y solo se utilizó con fines científicos por los investigadores, cuidando no revelar la identidad de los pacientes al presentar los resultados. Los resultados obtenidos en el laboratorio se enviaron por escrito exclusivamente a los médicos de asistencia que indicaron las pruebas.

Toda la información relacionada con el presente estudio se encuentra en formato electrónico, conservada y protegida en el LNREB-IPK. Se realizaron copias (salvas) de la misma, y estará disponible para consulta de los especialistas que participaron en el estudio. Las buenas prácticas de laboratorio se cumplieron estrictamente, junto a las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y manipulación de muestras biológicas según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006 (CITMA, 2006).

En esta investigación se contó con cartas avales de la responsable del Laboratorio Nacional de Espiroquetas y Brucelas (LNEB) del Departamento de Bacteriología-Micología; de los Jefes de Departamento de Virología y Parasitología, del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia del IPK; y del Jefe de Laboratorio SUMA del Banco de Sangre Provincial de La Habana (Anexos 7, 8, 9 y 10), donde se autorizó el uso de los sueros que conforman el grupo II de las muestras de trabajo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Validación de la microtécnica del FAB para la detección de anticuerpos contra antígenos de *Brucella*.

El término validación se refiere a la evaluación de una prueba diagnóstica con el fin de determinar su idoneidad para una utilización concreta (OIE, 2006). Este proceder se debe realizar siempre que se ponga en marcha una técnica analítica, nueva o modificada, y su objetivo es garantizar que el resultado de las pruebas refleje el estado real de las muestras (OIE, 2006; Camaró *et al.*; 2015). Entre las características que deben evaluarse para lograr este propósito se incluyen la precisión, la exactitud, la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo (Camaró *et al.*; 2015).

Es importante destacar que la prueba cualitativa (de pesquisa) y la semicuantitativa del *Febrille Antigen Brucella* son equivalentes a técnicas como la prueba de Rosa de Bengala y la aglutinación lenta en tubo, también conocida como aglutinación de Wright, o SAT, respectivamente (www.diesse.com). Esto se debe a que la base de la preparación del antígeno de estas pruebas de aglutinación es la cepa 1119-3 o la 99S de *Brucella abortus*, por lo que reconocen los mismos anticuerpos (Geresu y Kasa, 2016). Tomando en consideración estos aspectos los resultados obtenidos en esta investigación se compararon, según correspondió, con los de otros trabajos donde se aplican las técnicas mencionadas.

3.1.1 Normalización de la microtécnica del FAB

Para la aplicación de la microtécnica del FAB propuesta en esta investigación se normalizaron las cantidades de reactivos, soluciones, suero del paciente y el protocolo (marcha técnica) a utilizar en la realización de la misma. Esta técnica permite la detección de anticuerpos anti-brucelas que pueden estar presentes en el suero de individuos con brucelosis humana (www.diesse.com).

La exactitud es la cercanía de un valor obtenido en una prueba al valor esperado (verdadero) de un reactivo de referencia estándar cuya concentración o título se conocen, mientras que la precisión es el grado de dispersión entre una serie de mediciones de la misma muestra analizada bajo las mismas condiciones (OIE, 2012). La evaluación de la precisión puede realizarse, siempre utilizando la misma muestra replicada, en diferentes contextos o variantes como pueden ser: en una placa o placas en una misma ejecución de la prueba; entre ejecuciones de la prueba en distintos momentos del mismo día o en distintos días en condiciones similares; entre ejecuciones de la prueba en distintos días con distintos técnicos; y entre laboratorios (OIE, 2012).

La exactitud de la microtécnica del FAB resultó del 100%, al existir total concordancia con los títulos originales de los sueros controles positivos y negativos (ver figura 1). Igualmente, al trabajar cada una de las muestras por triplicado en días alternos, se obtuvo un resultado similar en todas las repeticiones realizadas, por lo que la precisión fue del 100%. Se demostró así la repetibilidad del ensayo (ver tabla 1).

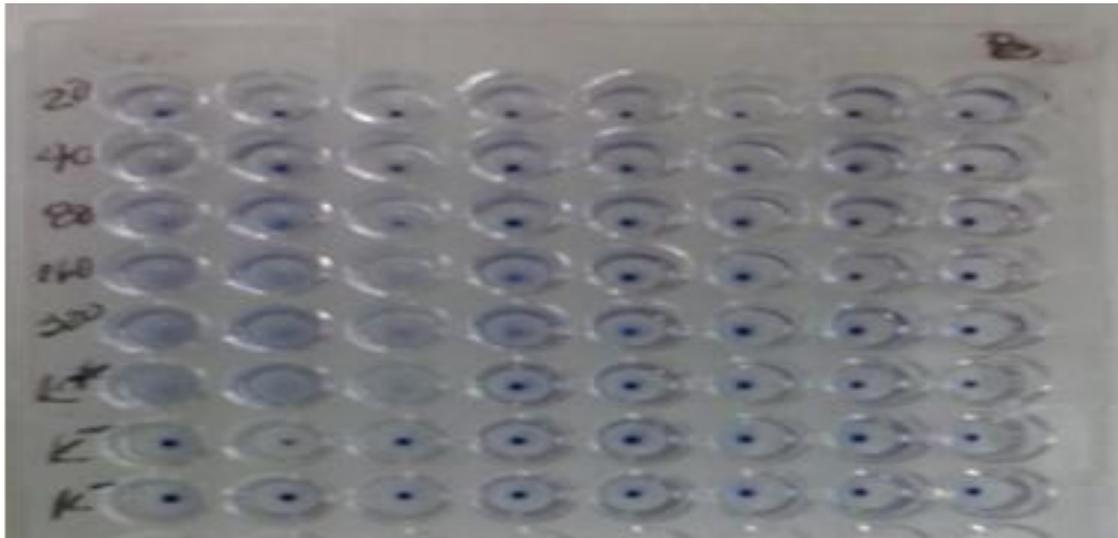


Figura 1. Reacciones serológicas observadas en los sueros controles al aplicarles la microtécnica del FAB.

Tabla 1. Títulos de anticuerpos encontrados mediante la prueba semicuantitativa del FAB y la microtécnica de FAB, con los sueros controles.

Sueros controles (código)	Título por FAB comercial (tubo)	Título por microtécnica (placa de poliestireno)			Coincidencia (%)
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
108	20	20	20	20	100
60	40	40	40	40	100
18	80	80	80	80	100
40	160	160	160	160	100
126	320	320	320	320	100
86	NR	NR	NR	NR	100
87	NR	NR	NR	NR	100

Fuente: Registros del LNREB del IPK

Leyenda: NR: no reactivo; %: porcentaje

Existen factores de laboratorio que pueden influir negativamente en los resultados que se obtenga en la realización de la técnica, lo que conllevaría a que el proceso de validación resulte insatisfactorio. Entre ellos se pueden citar al error técnico “*per se*”, la mala calibración del instrumental, la calidad del agua, el pH, la ionicidad de los tampones y los diluyentes, las variaciones de temperaturas y el tiempo de incubación (Jacobson, 1998; Camaró *et al.*, 2015).

3.1.2 Evaluación de la microtécnica del FAB

Para la evaluación de la microtécnica del FAB se emplearon como técnicas de referencia los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG *Brucella*, porque se consideran de elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de brucelosis humana (www.vircell.com; Bashiri *et al.*, 2013). No se utilizó el cultivo por falta de la infraestructura necesaria en el LNREB-IPK para el manejo de aislados de este microorganismo.

Todos los sueros positivos a brucelosis (Grupo I) disponían de la información clínica y epidemiológica que hacía sospechar la enfermedad; además, mostraron positividad con la prueba ELISA-IgM y/o ELISA-IgG para *Brucella*. Por su parte los negativos (Grupo II) provenían de individuos sin clínica ni epidemiología compatible con la brucelosis, y resultaron de igual manera por las técnicas serológicas antes mencionadas.

De los 50 sueros del Grupo II, 49 resultaron positivos por la microtécnica de FAB. Solo uno de ellos no presentó anticuerpos contra brucelas en ninguna de las siete diluciones efectuadas (ver figura 2). Los 100 sueros del grupo III resultaron negativos por la microtécnica del FAB (ver figura 3). A partir de los resultados obtenidos se calcularon los indicadores de desempeño de la microtécnica de FAB, los cuales se muestran en la tabla 2.

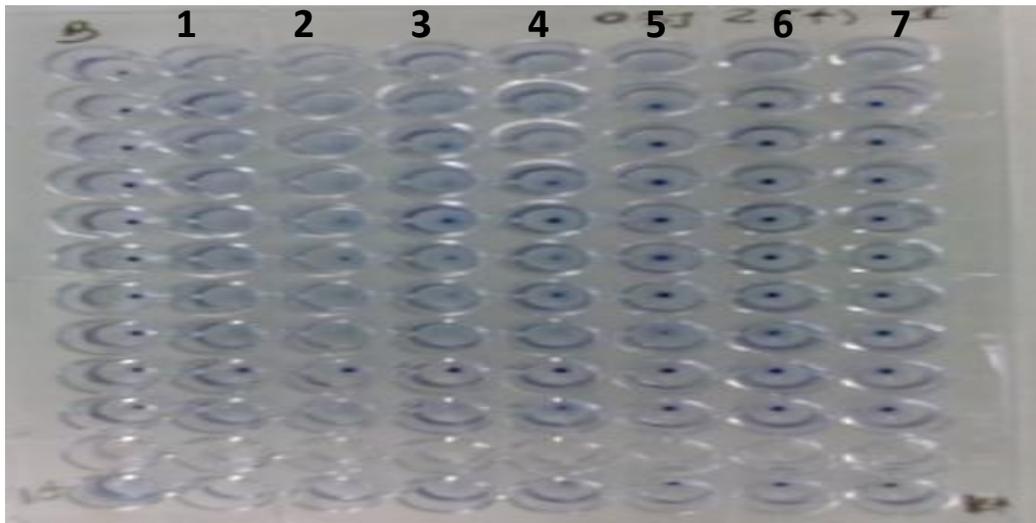


Figura 2. Reacciones de aglutinación de los sueros del grupo II en placas de 96 pocillos y fondo U. **Leyenda:** B: blanco (control negativo); Línea 1 – 7: diluciones de los sueros desde 1: 20 hasta 1: 1280; K⁺: control positivo.

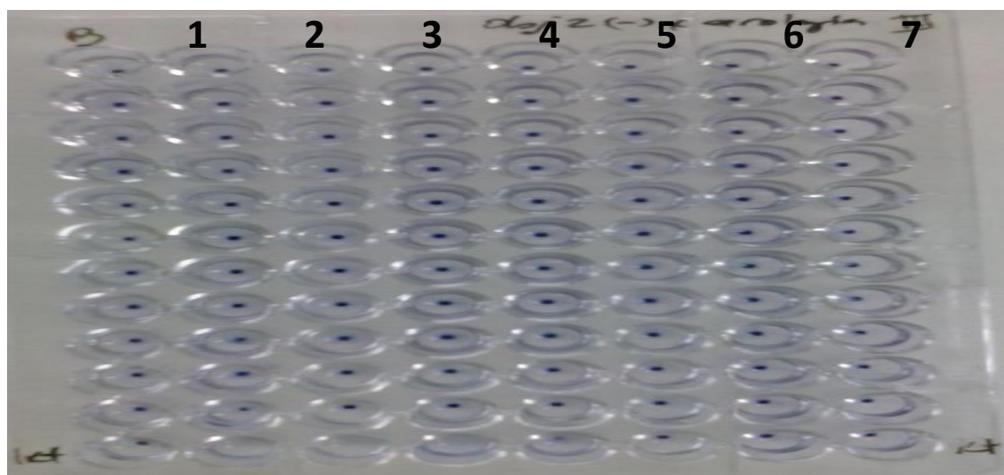


Figura 3. Reacciones de aglutinación de los sueros del grupo III en placas de 96 pocillos y fondo U. **Leyenda:** B: blanco (control negativo); Línea 1 – 7: diluciones de los sueros desde 1: 20 hasta 1: 1280; K⁺: control positivo.

Tabla 2. Indicadores de desempeño de la microtécnica del FAB utilizando los resultados obtenidos en los sueros de los grupos II y III.

Parámetros	Valor (%)	IC (95%)
Sensibilidad	98,00	93,12-100,00
Especificidad	100,00	99,50-100,00
Índice de validez	99,33	97,70-100,00
Valor predictivo positivo	100,00	98,98-100,00
Valor predictivo negativo	99,01	96,58-100,00
Índice de Youden	0,98	0,94-1,02

Técnica de referencia: ELISA IgM/ ELISA IgG *Brucella*

Leyenda: +: positivo, -: negativo, RV: razón de verosimilitud; IC: intervalo de confianza del 95% para una $p \leq 0,05$; %: porcentaje.

La sensibilidad diagnóstica es la proporción de muestras de individuos infectados que resultan positivas cuando se les aplica la prueba diagnóstica en evaluación (microtécnica del FAB) (OIE, 2012). Es decir, mide el porcentaje de individuos enfermos correctamente diagnosticados (Camaró *et al.*, 2015). La sensibilidad diagnóstica de la microtécnica del FAB, resultó ser de 98,0% (49/50), lo que corrobora la capacidad de este sistema para detectar anticuerpos contra brucelas en muestras de suero.

Con el objetivo de conocer el valor diagnóstico de la seroaglutinación lenta en tubos, Memish y cols. en el año 2002 aplican esta técnica a 68 sueros de pacientes con cultivos positivos a *Brucella* spp. y con clínica sugestiva de la enfermedad, los cuales se recibieron en el curso de un año en un hospital de Arabia Saudita. Como resultado del estudio, se reportó una sensibilidad para el SAT de 95,6% (65/68) (Memish *et al.*, 2002). De igual modo, Kuila y cols. estudian las muestras provenientes de 2 088 pacientes que acudieron a un hospital de la India, refiriendo presentar fiebre de más de tres semanas de evolución, entre enero de 2013 y septiembre de 2015. Estos investigadores publican en 2017, que al aplicar la seroaglutinación lenta en tubo a las 88 muestras que resultaron positivas a *Brucella* spp. por PCR, obtienen una sensibilidad de 95,45% (84/88) (Kuila *et al.*, 2017). Consideramos que las similitudes entre estos resultados y el que se obtuvo en la presente investigación se deben a que, en todos los casos, las muestras que se seleccionaron para evaluar la sensibilidad provenían de pacientes con sospecha clínica de brucelosis humana, lo cual respalda la veracidad de los resultados obtenidos (CECMED, 2007).

El valor de la sensibilidad diagnóstica de la microtécnica de FAB (98%) resultó superior al que alcanzan Ertek y cols. (2006) en Turquía (93,7%) en sueros de 32 pacientes con clínica sugestiva de la enfermedad y cultivos positivos a *Brucella* (30/32 positivos). Entre las posibles causas que justifiquen la obtención de las dos muestras negativas, dichos investigadores plantean: la existencia de bajos títulos de aglutinación que en ocasiones se constata al inicio de la infección por brucelas, la presencia de una concentración elevada de anticuerpos en la muestra (efecto de prozona), o por la presencia en el suero de factor reumatoideo, sustancia que es capaz de bloquear las reacciones de aglutinación (Ertek *et al.*, 2006).

El resultado obtenido en el presente estudio, resultó superior al que publican Bashiri y cols. (2013) en Irán (70,3%). Dicha investigación evalúa la seroaglutinación lenta en tubo, en 64 muestras positivas a brucelosis por ELISA (45/64 positivas), provenientes de 109 pacientes que acuden a un hospital iraní en un periodo de 32 meses, con síntomas y signos de brucelosis humana de hasta 15 días de evolución. Ellos señalan que sus resultados están en consonancia con otros reportes que indican que algunos

pacientes con sospecha y manifestaciones clínicas de brucelosis, responden adecuadamente al tratamiento y su serología siempre fue negativa. Además, se basan en estudios realizados en un hospital de Teherán, donde el 40% de los pacientes con cultivos positivos por la prueba del 2- Mercaptoetanol exhiben títulos iguales o inferiores a 40; y a los informes del Instituto Razi que plantean que en el 17% de los pacientes con cultivos positivos, el test de Wright muestra resultados con títulos inferiores a 80 (Bashiri *et al.*, 2013).

Por otra parte, la sensibilidad de la microtécnica del FAB resultó inferior de la que describen Park y cols. (2012) en Corea (100%). En el mismo al igual que en nuestro estudio, se estandariza una técnica de microaglutinación a partir de la seroaglutinación lenta en tubos, y posteriormente se aplican a 30 sueros de individuos con sospecha de la enfermedad, que resultaron positivos a los ELISAs (30/30 positivos) (Park *et al.*, 2012). Las diferencias observadas con relación al estudio de Park pueden deberse a que el antígeno usado por ellos no es producido por Dienes, sino por la empresa Germine (Texas, Estados Unidos). A pesar de que en ambos antígenos el componente fundamental es la cepa *Brucella abortus*, difiere su preparación y esto puede determinar diferencias en cuanto a la sensibilidad de los resultados que se obtengan (Geresu y Kasa, 2016).

La especificidad diagnóstica se define como la proporción de muestras de individuos no infectados o enfermos, que resultan negativas cuando se les aplica la prueba diagnóstica en evaluación (OIE, 2012). O sea, es el porcentaje de individuos sanos correctamente diagnosticados (Camaró *et al.*, 2015).

El porcentaje de especificidad diagnóstica obtenido en esta investigación (100%) coincide con los publicados por Memish y cols., en 2002 (70/70) y Ertek y cols., en 2006 (20/20), luego de evaluar los resultados de la seroaglutinación lenta en tubos, en muestras de individuos aparentemente sanos (Memish *et al.*, 2002; Ertek *et al.*, 2006). Sin embargo, otros investigadores reportan resultados inferiores como ocurre con Park y cols [96,7% (58/60)], Obregón y cols. [97,5% (78/80)] y Kuila y cols., [84,95 % (1699/2000)] (Park *et al.*, 2012; Obregón *et al.*, 2015; Kuila *et al.*, 2017).

La disminución de la especificidad diagnóstica puede ocurrir por la existencia de reacciones de falsos positivos, que tienen como causa la contaminación de la muestra o la detección de antígenos o productos de otros microorganismos, que no son los responsables del cuadro infeccioso que se investiga (OIE, 2012). Existen diversas bacterias gram-negativas que comparten con *Brucella* epítopes antigénicos situados en la cadena O de sus respectivos lipopolisacáridos y que, por ello, su presencia puede dar lugar a reacciones falsas positivas. Entre las más frecuentes se citan a *Yersinia enterocolitica* serotipo O: 9, *Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y *Stenotrophomonas maltophilia* (Yohannes *et al.*, 2012; Rodríguez y Solera, 2014).

El valor predictivo positivo es el porcentaje de pacientes enfermos entre todos los que resultaron positivos, por tanto, indica la probabilidad de que una prueba positiva diagnostique correctamente a un individuo enfermo. Por su parte, el valor predictivo negativo se refiere a la frecuencia de pacientes no enfermos entre todos los que resultaron negativos, por lo que evalúa la probabilidad de que una prueba negativa diagnostique correctamente a un individuo sano (OIE, 2009; Camaró *et al.*, 2015).

En el presente estudio se obtuvo el 100% como el valor predictivo positivo de la microtécnica del FAB y el valor predictivo negativo del 99,01%. Memish y cols. (2002, Arabia Saudita) reportan resultados similares al de esta investigación, con un VPP del 100% y un VPN del 99,7%; mientras que Obregón y cols. (2015, Cuba) refieren valores diferentes, con un VPP del 95,24% y un VPN del 100% (Memish *et al.*, 2002; Obregón *et al.*, 2015). No obstante, en todos los casos ambos parámetros superan el 95%, lo que indica que los resultados obtenidos por las técnicas de aglutinación son confiables para clasificar como enfermos o sanos a individuos con sospecha de brucelosis humana. Aunque es preciso recalcar que para que un resultado positivo o negativo permita inferir con exactitud la condición de un individuo respecto a la infección en estudio, es necesario conocer la prevalencia de la infección en la población de interés (Camaró *et al.*, 2015).

3.2 Aplicación de la microtécnica del FAB y el sistema comercial del FAB, en sueros de casos sospechosos de brucelosis.

De 486 sueros recibidos en el LNRB para diagnóstico y referencia de brucelosis humana en el periodo comprendido entre marzo y junio de 2017, el 62% (282/486) resultó positivo mediante la prueba cualitativa (en tarjeta) del FAB (Ver figura 4).

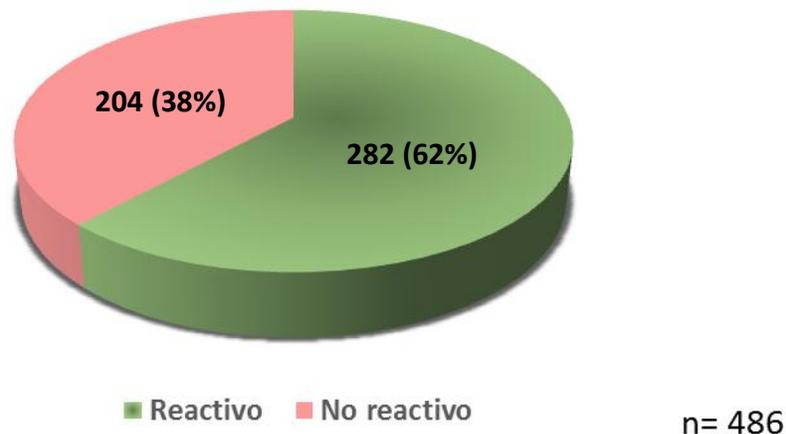
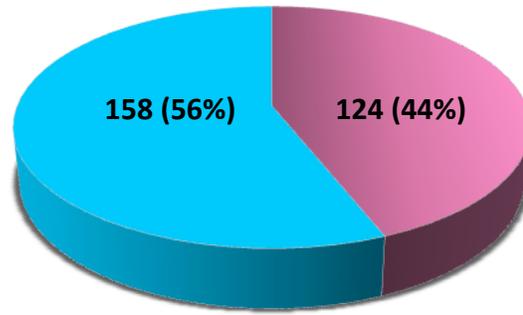


Figura 4. Resultados mediante la prueba cualitativa del FAB, en los sueros recibidos en el LNREB entre marzo y junio de 2017.

En la literatura revisada se hace referencia a diferentes estudios que alcanzan porcentajes de positividad más bajos al utilizar las técnicas de aglutinación en tarjeta para la pesquisa de la brucelosis humana. En la evaluación del FAB comercial realizada en Cuba en 2015, Obregón y cols. señalan que al someter 466 sueros de pacientes con sospecha de la enfermedad a la prueba cualitativa en tarjeta 72 resultan reactivos (15,45%). Estos autores consideran que este resultado responde a la baja incidencia de la enfermedad que reportaba en el país en esos momentos. No obstante, plantean que este fenómeno podía estar condicionado por la falta de diagnóstico confirmatorio en los humanos (Obregón (B) *et al.*, 2015). En la opinión de la autora de esta investigación, nuestro porcentaje de positividad es mayor porque en los últimos años la percepción de la enfermedad por parte de los médicos de asistencia se ha elevado, lo cual se traduce en un mayor número de muestras positivas entre las llegadas al laboratorio y en el aumento discreto de la notificación de casos a nivel nacional.

De Glanville y cols. (2017) en dos centros asistenciales de Kenya utilizan el estuche comercial *FebriLle Antigen Brucella*, comercializado por *Fortress Diagnostics*. Ellos estudian 825 sueros de pacientes, con síntomas compatibles con brucelosis que abarcaban hasta 180 días de la evolución clínica, en el periodo desde junio hasta diciembre de 2012. Al encontrar que la reactividad de la prueba en tarjeta es del 19,6% (162/825), De Glanville y su grupo opinan que sus resultados se deben a que el antígeno es de baja calidad (de Glanville *et al.*, 2017). Sin embargo, en nuestra opinión consideramos que la baja reactividad puede atribuirse a la selección de los individuos sintomáticos con más de dos meses de evolución, donde la producción de anticuerpos aglutinantes, que son los que detecta el FAB, es pobre o nula (Rodríguez y Solera, 2014; www.diesse.com). Por otra parte, Kuila y cols. (2017) reportan que, de los 2 088 pacientes con sospecha de brucelosis recibidos durante 32 meses en un hospital de la India, el 12,59% es reactivo a la técnica Rosa de Bengala (Kuila *et al.*, 2017). Las diferencias entre los resultados del presente trabajo con los publicados por dichos investigadores pueden responder a que su muestra es mayor a la que se utiliza en nuestro estudio.

Siguiendo el procedimiento del PNO del LNREB, a todos los sueros reactivos en tarjeta se les realiza los sistemas ELISA-IgM y ELISA-IgG para *Brucella*. El 44% (124/282) de los sueros reactivos resultaron positivo a un ELISA o a los dos (figura 5). Nuestros resultados son similares a los que publican Bashiri y cols. en Irán (2013), al comparar el valor diagnóstico de las pruebas serológicas tradicionales con el de los ELISAs. De 109 pacientes con síntomas y signos sugestivos de la enfermedad de hasta 15 días de evolución, el 58,7% (64/109) resultan positivos a los ELISAs. De esa forma, demuestran que la introducción de estos sistemas serológicos para el algoritmo diagnóstico de la brucelosis disminuye la proporción de resultados falsos negativos de las pruebas de seroaglutinación (Bashiri *et al.*, 2013). Hallazgos similares reportan Obregón y cols. (2015) en Cuba, cuando encuentran que 38 de las 72 muestras reactivas en tarjetas por FAB resultan positivas a los ELISAs (52,7%) (Obregón (B) *et al.*, 2015).



■ Positivos ■ Negativos

n= 282

Figura 5. Resultado de los sistemas ELISA-IgM e IgG *Brucella*, en los sueros reactivos por la prueba cualitativa del FAB.

La positividad que se encuentra en este trabajo mediante los ELISAs IgM e IgG para *Brucella* supera a la que hallan Sathyanarayan y cols. en 2011. Para dicho estudio se aplican ambos diagnosticadores a las muestras de 42 pacientes que en un periodo de un año acuden a un hospital de la India, y obtienen que el 30,9% (13/42) es positivo a uno o ambos ELISAs (Sathyanarayan *et al.*, 2011). En la India, Kuila y cols. (2017) reportan que de las muestras de 2 088 individuos con sospecha de la enfermedad, el 9,5% (198/2088) son positivas mediante los ELISAs (Kuila *et al.*, 2017). La mayor positividad en nuestro estudio puede deberse a que en este caso los ELISAs se les realizaron a las muestras reactivas mediante la prueba de pesquisa, mientras que en las investigaciones mencionadas estas técnicas se aplican a todas las muestras con sospecha de la enfermedad.

De igual manera, otros investigadores reportan porcentajes mayores de positividad al utilizar los ELISAs en el diagnóstico de la brucelosis humana. Park y cols. en 2012 (Corea), publican que de los sueros de 30 individuos con sospecha clínica de la enfermedad, todos resultan positivos a uno o ambos ELISAs (100%). Hajia y cols. (2013) alcanzan una positividad del 83,6% al aplicar los ELISAs a 267 sueros de pacientes con síntomas clínicos de brucelosis, que acuden durante un año a un hospital del noroeste de Irán (Hajia *et al.*, 2013). Este es un hallazgo esperado que se puede relacionar con la endemidad de la brucelosis humana existente en dicho país (Park *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2016).

La figura 6 muestra la distribución de los sueros positivos por ELISAs según la inmunoglobulina presente. Nótese que de 124 sueros estudiados, 80 (65%) de ellos fueron positivos mediante el ELISA IgM, 14 mediante el ELISA IgG (11%) y 30 por ambos sistemas (24%). Este resultado sugiere que la mayoría de los casos de brucelosis que forman parte del presente estudio se diagnostican durante la fase aguda de la enfermedad, ya que la inmunoglobulina IgM comienza a producirse a partir de la primera o segunda semana de iniciada la infección (Kaltungo *et al.*, 2014; www.diesse.com). Lo anterior coincide con lo notificado por Sathyanarayan y cols. (2011) en la India, quienes encuentran que de los 13 sueros que resultan positivos a los ELISAs en su data de estudio, el 61,5% (8/13) lo fue al ELISA IgM, el 15,4% (2/13) al ELISA IgG y el 23,1% (3/13) a ambos ELISAs (Sathyanarayan *et al.*, 2011). **Figura 6.** Distribución de los sueros positivos a los ELISAs atendiendo a la inmunoglobulina presente en ellos.

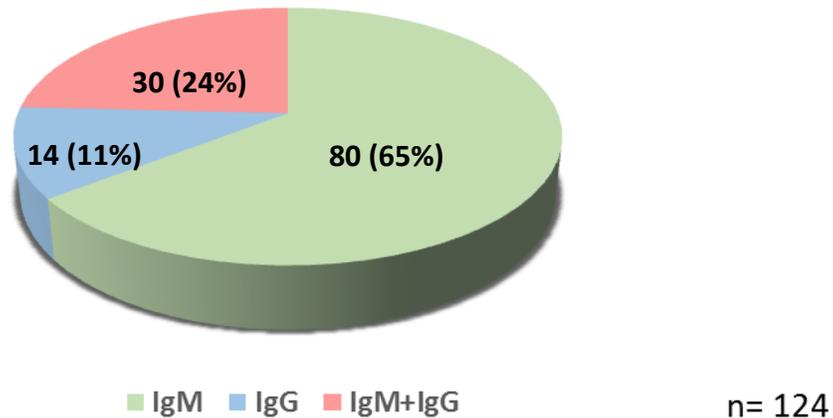


Figura 6. Distribución de los sueros positivos a los ELISAs atendiendo a la inmunoglobulina presente en ellos.

Nuestro resultado coincide con el que obtienen Kuila y cols. (2017) en la India, ya que ellos también encuentran un predominio de la positividad al ELISA IgM [81,3% (161/198)], seguido en orden decreciente al ELISA IgG [15,2% (30/198)] y a la de ambos sistemas [3,5% (7/198)].

Resultados diferentes hallan Obregón y cols. en Cuba, cuando en 2015 reportan un 15,8% (6/38) de positividad al ELISA IgM, un 73,7% (28/38) al ELISA IgG y un 10,5% (4/38) a ambos ELISAs. El predominio al ELISA IgG en su investigación lo justifican debido a la existencia mayoritaria de los casos crónicos en su estudio (Obregón (B) et al., 2015).

La tabla 3 muestra la concordancia obtenida (en ± 1 dilución seriada y al doble) entre los resultados por la microtécnica y la prueba semicuantitativa en tubos del FAB, cuando se utilizaron 282 sueros reactivos en tarjeta. Nótese que de manera general existió coincidencia en el 96,8% de los títulos (273/282) y que las discrepancias ocurrieron en las diluciones desde 1:20 hasta 1:160, destacando la dilución 1:80 (93,97%).

Tabla 3. Coincidencia entre los títulos de los sueros de casos sospechosos de brucelosis humana, obtenidos por la prueba semicuantitativa del FAB comercial y por la microtécnica de FAB.

FAB en tubos (títulos)	FAB en placa de fondo U (títulos)										Total	Coincidencia en +/- 1 dilución n/N (%)
	NR	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
NR	2	1									3	3/3 (100)
20	1	28	14	1	1						45	43/45 (95,55)
40	2	16	46	24							88	86/88 (97,72)
80		4	27	39	12						82	78/82 (93,97)
160			1	23	17	6					47	46/47 (97,87)
320					6	2	1				9	9/9 (100)
640						1	1	2			4	4/4 (100)
1280									2		2	2/2 (100)
2560										1	1	1/1 (100)
5120											1	1/1 (100)
Total	5	49	88	87	36	9	2	2	3	1	282	273/282 (96,8)

Fuente:

Registros del LNREB del IPK. **Leyenda:** NR: no reactivo; %: porcentaje; n: número de sueros coincidentes; N= total de sueros.

El título de anticuerpos semicuantificado, permite la interpretación de los resultados por categorías. En consecuencia, se consideran reactivos los títulos de 20 y 40, sospechosos los títulos de 80 y con valor diagnóstico los títulos iguales o superiores de 160 (www.diesse.com). Teniendo en cuenta, estos criterios se informan los resultados el LNREB del IPK. El análisis y las comparaciones de los resultados de las muestras, al emplear la prueba semicuantitativa del FAB y la microtécnica del FAB, se hace según las categorías explicadas y se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de los sueros del grupo III, según los títulos de anticuerpos, por la prueba semicuantitativa en tubo de FAB y por la microtécnica de FAB.

Categorías (títulos)	Prueba semicuantitativa del FAB comercial n/N (%)	Microtécnica del FAB n/N (%)
No reactivas	3/282 (1,1)	5/282 (1,8)
Reactivas ^(a)	133/282 (47,2)	137/282 (48,6)
Sospechosas ^(b)	82/282 (29,1)	87/282 (30,8)
Positivas ^(c)	64/282 (22,6)	53/282 (18,8)

Fuente: Registros del LNREB del IPK

Leyenda: ^(a): títulos entre 20-40, ^(b): título de 80, ^(c): título \geq 160; n: total de sueros; %: porcentaje; N= 282.

Las mayores discrepancias, aunque solo en un 3,8%, se obtuvieron en la clasificación de los sueros positivos, con un 22,6% (64/282) en la prueba semicuantitativa en tubos, y un 18,8% (53/282) en la microtécnica de FAB usando placas de 96 pocillos con fondo U. En particular, el porcentaje de positividad que se alcanzó con la microtécnica coincide con el que reportan Kuila y cols. en la India (2017), al constatar que los sueros del 18,43% de los pacientes (385/2088) resultan positivos a la seroaglutinación lenta en tubos con títulos iguales o superiores a 160 (Kuila *et al.*, 2017).

El porcentaje de positividad encontrado en la presente investigación fue superior al que publican Purwar y cols. en la India en 2016. En dicho trabajo se alcanza un 8,5% de positividad (34/400) al aplicar la seroaglutinación lenta en tubos, a 400 sueros de pacientes con fiebre de origen desconocido de más de 15 días de evolución (Purwar *et al.*, 2016). En contraste, resulta inferior al 92,3% que reportan Abo-shadi y cols. en la India (2014), cuando confirman como positivos a 60 de los 65 sueros de pacientes estudiados con sospecha de brucelosis. Una de las causas que podría justificar las diferencias encontradas con respecto a los resultados de Abo-Shadi y su grupo, puede ser el hecho de que ellos consideran como positivos a títulos iguales o superiores a 80. De igual manera, el porcentaje de positividad en la presente investigación fue menor al 80% que encuentran Garshasbi y cols. en Irán (2014), al diagnosticar como positivos a 128 de los 160 individuos que estudiaron (Abo-Shadi *et al.*, 2014; Garshasbi *et al.*, 2014).

Cuando se desea conocer si con un método o instrumento nuevo se obtienen resultados equivalentes al método habitual de tal manera que, eventualmente, uno y otro puedan ser remplazados o intercambiados, se debe determinar la concordancia que existe entre ellos. La concordancia es el grado en que dos o más observadores, métodos, técnicas u observaciones están de acuerdo sobre el mismo fenómeno observado. No evalúa la validez o la certeza sobre una u otra observación con relación a un estándar de referencia dado, sino cuán acordes están entre sí observaciones sobre el mismo fenómeno (Cortés *et al.*, 2010).

La estimación de la concordancia entre los resultados que se obtuvieron por el FAB comercial y la microtécnica de FAB, se realizó mediante el índice de Kappa, un instrumento diseñado por Cohen que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada (Cepeda *et al.*, 2001). Para la interpretación cualitativa de los resultados del índice de Kappa se utiliza la propuesta de Landis y Koch, en la que la fuerza de concordancia se califica como pobre o débil si el valor es menor a 0,40; moderada, para valores entre 0,41 y 0,60; buena, entre 0,61 y 0,80, y muy buena para valores superiores hasta 1 (Landis y Koch, 1977).

De las 282 muestras que resultaron reactivas en tarjeta, 218 fueron clasificadas como negativas y 53 como positivas por ambas pruebas, mientras que 11 positivas por la prueba semicuantitativa en tubo resultaron negativas por la microtécnica de FAB. Al realizar el análisis estadístico utilizando el índice de Kappa, se obtuvo un valor de 0,8816 con un rango 0,8136 – 0,9497 para un intervalo de confianza del 95%. Este valor permite, según Landis y Koch, considerar como muy buena la concordancia existente entre los resultados obtenidos por las dos pruebas analizadas.

El análisis de la distribución de los títulos de los sueros positivos por la microtécnica del FAB, con respecto a la positividad mediante los sistemas ELISAs IgM e IgG *Brucella*, se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Distribución de los títulos obtenidos por la microtécnica del FAB, en los sueros positivos por los sistemas ELISAs IgM e IgG *Brucella*.

Sistemas		Microtécnica del FAB				
		Títulos				
		20(a) n (%)	40(a) n (%)	80(b) n (%)	≥ 160(c) n (%)	Total n (%)
Positivos por ELISA	IgM	3 (2,4)	18 (14,5)	40 (32,3)	19 (15,3)	80 (64,5)
	IgG	0 (0,0)	5 (4,05)	5 (4,05)	4 (3,2)	14 (11,3)
	IgM+IgG	1 (0,8)	2 (1,7)	7 (5,6)	20 (16,1)	30 (24,2)
Total		4 (3,2)	25 (20,3)	52 (41,9)	43 (34,6)	124 (100)

Fuente: Registros del LNREB del IPK

Leyenda: ^(a): títulos entre 20-40, ^(b): título de 80, ^(c): título ≥160; n: total de sueros; %: porcentaje; n=124.

Nótese que el mayor porcentaje de muestras positivas por ELISAs correspondió a los sueros con títulos de 80 (categoría sospechosa) con el 41,9% (52/124). De estas, 40 muestras (32,3%) fueron positivas al ELISA IgM, lo cual sugiere que en su mayoría eran pacientes iniciando la fase aguda de la enfermedad (Yohannes, 2012).

Le siguen en frecuencia con el 34,6% (43/124) los sueros con títulos iguales o mayores que 160 (categoría positiva) y en este grupo, 20 sueros (16,1%) resultaron positivos a los ELISAs IgM e IgG, lo cual indica que son pacientes que están finalizando la fase aguda de la enfermedad, equivalente a la cuarta semana de evolución (Abo-Shadi *et al.*, 2014). Por último, en tercer y cuarto lugar, se encontraron los sueros con títulos de 40 y 20 (categoría reactiva) con el 20,3% (25/124) y el 3,2% (4/124), respectivamente. En esta categoría, 18 (14,5%) de los sueros con título de 40 y 3 (2,4%) de los sueros con título de 20, resultaron positivos al ELISA IgM; lo que demuestra la importancia que tiene el pareamiento de estas muestras para el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad (Béjar, 2017). De igual manera, con este resultado se justifica el empleo de los ELISAs en el diagnóstico confirmatorio de la brucelosis humana, dados los excelentes valores de sensibilidad y especificidad que siguen mostrando estos sistemas (Bashiri *et al.*, 2013).

En esta investigación los sueros de 124 pacientes resultaron positivos a uno o ambos ELISAs (IgM-IgG *Brucella*), mientras que al aplicar el FAB comercial y la microtécnica de FAB, se obtuvo títulos iguales o superiores a 160 en 64 y 53 sueros, respectivamente. Existen otros investigadores que también hacen referencia a la positividad de los ELISAs cuando se obtienen bajos títulos de aglutinación, y demuestran que la introducción de estos sistemas en sus algoritmos diagnósticos ha disminuido los resultados falsos negativos en el diagnóstico definitivo (Sathyanarayan *et al.*, 2011; Binnicker *et al.*, 2012; Bashiri *et al.*, 2013; Hajia *et al.*, 2013).

Nuestro resultado difiere del que obtienen Obregón y cols. (2015, Cuba) al realizar el mismo análisis. Ellos informan un predominio de los sueros con títulos iguales o superiores a 160 con un 63,2% (24/38), sobresaliendo los que sólo fueron positivos al ELISA IgG (15/24). Estos investigadores consideran que su resultado se debe a que durante la fase crónica de la brucelosis humana los síntomas y signos de la enfermedad están bien establecidos, lo que permite un diagnóstico clínico acertado (Obregón (B) *et al.*, 2015).

3.3 Estimación de los costos económicos de la microtécnica de FAB para el nivel terciario de salud

En la literatura internacional no se encontraron publicaciones que refieran la estimación del costo del diagnóstico de brucelosis humana, utilizando el estuche comercial *Febrille Antigen Brucella*. Sin embargo, en el año 2013 Obregón y cols. en Cuba, validaron y costearon este diagnosticador previa introducción en la red de laboratorios del país. No obstante, para comparar el costo de la microtécnica de FAB con el de la prueba semicuantitativa en tubo en este trabajo, se decide estimar al unísono el costo de ambas técnicas, ya que los salarios y el precio de algunos reactivos han aumentado en Cuba, desde ese entonces hasta la fecha.

La tabla 6 muestra la distribución del costo total, de la la microtécnica de FAB y del FAB comercial. Obsérvese que la media del costo total para la microtécnica del FAB fue de 617,69 CUP, con un mínimo de 616,85 CUP, un máximo de 618,44 CUP y una desviación estándar de 0,52 CUP; mientras que para la prueba semicuantitativa en tubo fue de 654,92 CUP con un mínimo de 654,01 CUP, un máximo de 655,53 CUP y una desviación estándar de 0,5 CUP.

Tabla 6. Costo total de la microtécnica del FAB y el FAB comercial

Técnica	Costo total (CUP)	Desviación estándar	IC del 95% (CUP)	
Microtécnica del FAB	617,69	0,52	616.85	618.44
Sistema FAB disponible	654,92	0,5	654,01	655,53

Fuente: Encuestas archivadas en el LNREB del IPK

Leyenda: CUP: cubanos pesos; IC: intervalo de confianza; %: por ciento; n=124

La media del costo total para la microtécnica de FAB, resultó superior al que obtienen Obregón y cols. en 2012. Ellos reportan que la media del costo total del FAB es de 21,46 CUP. Consideramos que las diferencias con estos investigadores se deben a que ellos emplean la tasa oficial de cambio de 1USD=1CUP para luego expresar todos los costos en CUP, mientras que en esta investigación fue pertinente establecer la tasa de cambio de 1USD= 24CUP, por lo que los costos se expresan en CUP. Además, a diferencia de la estimación que realizan Obregón y cols. que incluye los tres niveles de salud, la realizada en este estudio incluye solo al nivel terciario (IPK) donde existen mayores salarios, un mayor equipamiento y mayores costos indirectos.

No obstante, como ya se ha expresado, el costo total al aplicar la microtécnica del FAB en las condiciones actuales, es menor que el de aplicar la prueba de semicuantificación en tubos. Además, permite estudiar un mayor número de sueros por estuche y reducir el tiempo de ejecución de la técnica. No obstante, resalta que la diferencia entre el costo de ambas pruebas es de 37,23 CUP, hallazgo que tiene su respuesta en el análisis de sus respectivos costos medios por actividad (ver tabla 7).

No existen variaciones para las pruebas costeadas en el valor del costo medio de la recepción de las muestras en el IPK y su traslado al LNRB, así como respecto a la recepción y ejecución de la prueba cualitativa en el LNRB del IPK, con valores de 0,52 CUP y 16,98 CUP, respectivamente. Estos valores se siguieron en orden ascendente por los obtenidos al estimar el costo medio de la realización de la prueba semicuantitativa en tubos (637,42 CUP) y en la microtécnica en placas de 96 pocillos (600 CUP). La diferencia de los resultados radicó en el costo de los materiales (426,68 CUP y 401,75 CUP, respectivamente), y en particular en el costo del antígeno por determinación que es el elemento contable que varía (28,21 CUP y 3,22 CUP, respectivamente).

Tabla 7. Comparación del costo medio (CUP) por actividad y costo medio total para el diagnóstico serológico de brucelosis humana mediante el sistema FAB comercial y la microtécnica.

Actividad/elemento de costo	Microtécnica de FAB					FAB comercial				
	Costo medio*	SD	%	IC 95%		Costo medio*	SD	%	IC 95%	
Recepción de muestra en IPK y traslado al LNREB										
Salarios	0,18		0,03			0,18		0,029		
Materiales	0,02		0,003			0,02		0,003		
Depreciación de medios de capital	0,149					0,15		0,0		
Costos directos	0,35		0,1			0,35		0,1		
Costos indirectos(49% de costos directos)	0,17		0,03			0,17		0,03		
Subtotal	0,52	0,48	0,1	0,1	1,03	0,52	0,48	0,1	0,1	1,03
Recepción en el LNRB y ejecución de prueba cualitativa										
Salarios	4,55		0,7			4,55		0,7		
Materiales	5,98		0,9			5,98		1,0		
Depreciación de medios de capital	0,87		0,1			0,87		0,1		
Costos directos	1,39		1,7			11,39		1,8		
Costos indirectos(49% de costos directos)	5,58		0,9			5,58		0,9		
Subtotal	16,98	0,16	2,6	16,45	16,75	16,98	0,16	2,6	16,45	16,75
Prueba semi-cuantitativa a muestras positivas por prueba cualitativa										
Salarios	0,898		0,15			0,95		0,14		
Materiales	401,75		65,0			426,68		65,2		
Depreciación de medios de capital	0,17		0,0			0,17		0,0		
Costos directos	402,82		65,2			427,80		65,3		
Costos indirectos(49% de costos directos)	197,38		32,0			209,62		32,0		
Subtotal	600,20	0,02	97,2	600,2	600,36	637,42	0,02	97,3	637,35	637,42
Gran total costos directos	414,56		67,1			439,54		67,1		
Gran total costos indirectos	203,13		32,9			215,38		32,9		
Gran total costos	617,69	0,52	100,0	616,85	618,44	654,92	0,5	100,0	654,01	655,53

* los números fueron redondeados a la próxima cifra. **Leyenda:** SD: desviación estándar, %: por ciento, IC: intervalo de confianza.

La brucelosis es una entidad que desde el punto de vista clínico tiende a confundirse con otras enfermedades. Este resultado es un llamado de atención sobre el gasto innecesario de tiempo y recursos que genera la indicación injustificada de esta prueba; pero enfatizamos en la necesidad de realizarla siempre que se sospeche la enfermedad porque los gastos que genera un enfermo de brucelosis humana al sistema de salud pública (por hospitalización, tratamiento, intervenciones quirúrgicas, rehabilitación, etc.) y a la economía (por ausencias o baja de su centro laboral) superan en mucho al costo de una determinación de una prueba de pesquisa.

3.4 Discusión general:

La brucelosis está catalogada como una de las zoonosis más importantes por sus implicaciones en la economía y la Salud Pública de los países que afecta. Es una enfermedad que, lastimosamente, rara vez se sospecha y se confirma. En Cuba, el aumento del número de muestras de casos sospechosos de la enfermedad a estudiarse en la red nacional de laboratorios del país, conlleva al agotamiento del antígeno del *Febrille Antigen Brucella* (FAB) usado para la pesquisa de anticuerpos contra brucela en dichas entidades. Por tal razón, se diseña y valida una microtécnica del FAB usando placas de poliestireno de 96 pocillos, con el objetivo de disminuir los volúmenes de suero y reactivos, estudiar un mayor número de sueros por estuche y reducir los costos aproximados por determinación.

La microtécnica del FAB muestra excelentes porcentajes de exactitud y precisión, valores de sensibilidad (98%) y especificidad (100%), así como muy buena concordancia ($Kappa = 0,8816$) con la prueba semicuantitativa en tubos del FAB comercial. Se demuestra además que la microtécnica del FAB, es una herramienta diagnóstica robusta y segura, por lo que sugiere la posibilidad de poder reemplazar el sistema comercial del FAB en uso.

Por su elevada sensibilidad y especificidad, los sistemas ELISAs IgM e IgG para *Brucella*, se toman como técnicas de referencia en esta investigación y, además, se aplican a todos los sueros que resultan reactivos en la prueba del FAB en tarjeta. Importante resaltar que 124 sueros de pacientes con sospecha de la enfermedad son positivos a los ELISAs, sin embargo, 64 y 53 sueros fueron positivos al FAB comercial y a la microtécnica FAB, respectivamente. Lo anterior evidencia que contar con los ELISAs en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad permite disminuir los resultados falsos negativos. De igual manera, consideramos que la no utilización del cultivo o de técnicas moleculares como métodos de referencia en el presente estudio, no le resta valor al diseño del trabajo realizado en esta investigación, ni a los resultados obtenidos en la misma.

Por otra parte, sobresalen las diferencias de las investigaciones realizadas en Cuba con respecto al presente trabajo. En este sentido, hace cinco años atrás en nuestro medio, el mayor porcentaje de sueros positivos a los ELISAs (63,2%) tenían títulos iguales o superiores a 160 en la prueba de aglutinación. En la actualidad resulta que el 65,4% de los sueros positivos a los ELISAs tienen títulos de aglutinación iguales o inferiores a 80. Estos resultados señalan el camino para realizar nuevas investigaciones encaminadas a conocer si los valores de corte del FAB que propone el fabricante en el instructivo comercial, son adecuados para la pesquisa y el diagnóstico de la enfermedad en nuestro medio.

El costo total de una determinación por la microtécnica del FAB, fue de 617,19 CUP y resulta inferior al que se obtiene al aplicar el FAB comercial (654, 92 CUP). Aunque resulta un costo elevado, esta cifra nunca superará los gastos que genera al SNS un enfermo de brucelosis no diagnosticado oportunamente, por concepto de hospitalización, tratamiento, intervenciones quirúrgicas, rehabilitación, etc.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La microtécnica del FAB detecta anticuerpos totales contra *Brucella*, con gran precisión, exactitud, y aceptables indicadores de desempeño con relación a los métodos confirmatorios, lo que avala su uso en los laboratorios provinciales de la red nacional de Cuba.
2. La microtécnica del FAB tiene muy buena concordancia con el FAB disponible, lo que sugiere su incorporación al algoritmo serológico de laboratorio para el diagnóstico de la brucelosis humana en nuestro medio.
3. El costo económico estimado de la microtécnica del FAB para el nivel terciario de salud es inferior al del sistema FAB disponible, lo que justifica su introducción para la pesquisa de brucelosis humana en Cuba.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Informar los resultados de esta investigación a las autoridades nacionales de salud pública, con vista a la aprobación de su introducción en el algoritmo del LNREB.
2. Estimar los costos económicos parciales de la microtécnica del FAB para el nivel secundario (CPHEM) de salud de Cuba.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Abo-Shadi MA, Al-Harbi AH, Ballal EM. Rerum levels of interferón Ganma in patients with brucelosis in a Saudi Hospital. *British Microbiology Research Journal* 2014; 4 (3): 293-305.
2. Ahmed W, Zheng K, Liu Z. Establishment of Chronic Infection: *Brucella's* Stealth Strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6: 30. doi: 10.3389/fcimb.2016.00030.
3. Al Ajlan HH, Ibrahim AS, Al Salamah AA: Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *Pol J Microbiol* 2011; 60(1):27–33.
4. Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2011; 9 (7): 833-45.
5. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2013; 32 (1): 177-88.
6. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory based diagnosis of brucellosis – a review of the literature. Part I: techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin. Lab.* 2003; 49 (9–10): 487–505.
7. Al Dahouk S, Tomaso H, Prenger-Berninghoff E, Spletstoesser WD, Scholz HC, Neubauer H. Identification of brucella species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Crit Rev Microbiol.* 2005; 31(4):191–196.
8. Alavi SM, Alavi L. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. *Caspian J Intern Med.* 2013; 4: 636-41.
9. Alavi SM, Motlagh ME. A Review of Epidemiology, Diagnosis and Management of Brucellosis for General Physicians Working in the Iranian Health Network. *Jundishapour J Microbiol.* 2012; 5 (2):384-7.

10. Alikhani MY, Hashemi SH, Naseri Z, Farajnia S, Peeri-Dogaheh H. Diagnosis of Human Brucellosis by Blood Culture (BACTEC) and PCR Method via Whole Blood and Serum. *Jundishapur J Microbiol.* 2013; 6(3):248-51. DOI: 10.5812/jjm.5073.
11. Alnemri AR, Hadid A, Hussain SA, Somily AM, Sobaih BH, Alrabiaah A, et al. Neonatal brucellosis: A case report. *J Infect Dev Ctries* 2017; 11(2):199-202. doi:10.3855/jidc.8938.
12. Álvarez MG, Saldaña C, Ballesteros MR, Martínez IO, López A, Briones E, et al. Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp. en muestras humanas. *Gac Med Mex.* 2015;151: 620-5.
13. Álvarez NE, Díaz M, Ortiz M. Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Medicina e Investigación* 2015; 3 (2):129-33.
14. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36 (1): 12-7.
15. Ari MD, Guracha A, Fadeel MA, Njuguna C, Njenga MK, Kalani R, et al. Challenges of establishing the correct diagnosis of outbreaks of acute febrile illnesses in Africa: the case of a likely *Brucella* outbreak among nomadic pastoralists, Northeast Kenya, March–July 2005. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85(5): 909–12.
16. Ariza J. Brucelosis en el siglo XXI. *Med Clin (Barc).* 2002; 119 (9):339-44. Documento descargado de <http://www.elsevier.es> el 08/07/2015.
17. Ariza X. Brucelosis. En: Rozman C, Cardellach F, Agustí A, et al., editores. Tratado de Medicina Interna Farreras-Rozman. Vol 2. 18ª ed. España: Elsevier; 2016. p. 2045-7.
18. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 1992; 95:271–275.
19. Baldi PC, Giambartolomei GH. Immunopathology of *Brucella* infection. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2013; 8 (1): 18-26.

20. Baly A. Costomy costo – efectividad de estrategias comunitarias para el control del *Aedes Aegypti* y la prevención del dengue. [Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud]. La Habana.: IPK; 2010.
21. Bashiri H, Sayad B, Madani SH. Study of the Assimilation Rate of Immunoenzymatic Tests and Traditional Serological Methods in the Diagnosis of Human Brucellosis. *Jundishapur J Microbiol.* 2013; 6(4): e4828. DOI: 10.5812/jjm.4828
22. Béjar C. Evaluación de la utilidad de las reacciones febriles de aglutinación: estudio comparativo de resultados entre poblaciones con y sin manifestaciones clínicas de enfermedades infecciosas febriles. [Consultado 10 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.contactoquímico.com/htm/Artículos/Inmunología/Inmunología6Evaluación.htm>.
23. Berk S, Engin A, Epozturk K. Pneumonia and Pleural Effusion Due to *Brucella*. *Arch Bronconeumol.* 2012; 48 (8):301-2.
24. Binnicker MJ, Theel ES, Larsen SM, Patel R. A High Percentage of Serum Samples That Test Reactive by Enzyme Immunoassay for Anti-Brucella Antibodies Are Not Confirmed by the Standard Tube Agglutination Test. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(8): 1332–4. doi: 10.1128/CVI.00197-12
25. Bohlin J, Snipen L, Cloeckert A, Lagesen K, Ussery D, Kristoffersen AB, Godfroid J. Genomic comparisons of *Brucella* spp. and closely related bacteria using base compositional and proteome based methods. *BMC Evolutionary Biology.* 2010; 10: 249.
26. BRUCELLA CAPTURA (BrucellaCapt); 2014. Disponible en: www.vircell.com.
27. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, Baran AI, Karsen H, Evirgen O, Akdeniz H. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *Int J Infect Dis.* 2010; 14: 469-78.
28. Byndloss MX, Tsolis RM. Chronic Bacterial Pathogens: Mechanisms of Persistence. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0020-2015.

29. Camaró ML, Martínez R, Olmos P, Catalá V, Ocete MD, Gimeno C, *et al.* Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(7): e31–e36.
30. Canal ML. Importancia socioeconómica de la brucelosis. *Revista Sapuvet de Salud Pública.* 2011; 2 (1): 51-61.
31. Castaño MJ. Brucelosis crónica y persistencia de ADN de *Brucella melitensis* [tesis doctoral]. Madrid (España): Universidad Autónoma de Madrid; 2010. 231p.
32. Cecmed. Regulación No. 47-2007: Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. Disponible en: <http://www.cecmed.cu/Pages/AmbReg-8.htm>. [Revisado: 10 de septiembre de 2015].
33. Celebi G, Külah C, Kiliç S, Uständag G. Asymptomatic *Brucella* bacteremia and isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from human breast milk. *Scand J Infect Dis.* 2007; 39: 205-8.
34. Cepeda M, Perez A, en: Ruiz M, Gómez C, Londoño D. Investigación Clínica: Epidemiología clínica aplicada. *Centro Editorial Javeriano*; 2001. p. 288-301.
35. Christopher S, Umapathy BL, Ravikumar KL. Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. *J Lab Physicians.* 2010; 2 (2): 55-60.
36. Corbel MJ, Beeching NJ. Brucellosis. En: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, *et al.*, editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. Vol 2. 18a ed. México: McGraw-Hill; 2012. p. 1296 – 1301.
37. Cortés E, Rubio JA, Gaitán H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 2010; 61(3): 247-55.
38. Curbelo A, Márquez V. La brucelosis humana en Cuba. En: Tercer Congreso interamericano de brucelosis; 7-9 de agosto de 1950; Washington, D. C. p. 4-6.
39. D'anastasio R, Staniscia T, Milia ML, Manzoli L, Capasso L. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139(1): 149-56.
40. De Glanville W, Conde R, Moriyón I, Njeru J, Díaz R, Cook E, *et al.* Poor performance of the rapid test for human brucellosis in health facilities in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Apr; 11(4): e0005508.

41. De Jong MF, Tsolis RM. Brucellosis and type IV secretion. *Future Microbiology* 2012; 7(1): 47-58.
42. Dean AS, Crump L, Greter H, Hattendorf J, Schelling E, Zinsstag J. Clinical manifestations of human brucellosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6 (12): e1929.
43. Díaz A. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2013; 32(1): 43-51.
44. Diaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The Rose Bengal test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (4): e950.
45. DIESSE, Diagnostica Senese SpA. Italia. Febrile Antigen Brucella [citado en el I Taller Nacional de Laboratorio para el Diagnóstico de Brucelosis humana, La Habana, Cuba, el 11 de marzo de 2012]. Disponible en: www.diesse.com.
46. Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación, República Argentina. Enfermedades infecciosas, Brucelosis. Guía para el equipo de salud Nro. 12. 2013. Disponible en: www.msal.gov.ar.
47. Dirección General de Epidemiología (México) (DGE). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis. Secretaría de Salud. 2012. Disponible en: www.salud.gob.mx.
48. Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. Host response to *Brucella* infection: review and future perspective. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9 (7): 697-701. doi:10.3855/jidc.6625.
49. Ertek M, Yazgi H, Özkurt Z, Ayyildiz A, Parlak M. Comparison of the diagnostic value of the Standard Tube Agglutination Test and ELISA IgG and IgM in patients with brucellosis. *Turk J Med Sci* 2006; 36 (3): 159-63.
50. Fadeel MA, Hoffmaster AR, Shi J, Pimentel G, Stoddard RA. Comparison of four commercial IgM and IgG ELISA kits for diagnosing brucellosis. *J Med Microbiol.* 2011; 60(12):1767-73.
51. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol.* 2010; 5(6): 859–66.

52. Flessa S. Costing of Health Care Services in Developing Countries. A prerequisite for Affordability Sustainability and Efficiency. Heidelberg: Peter Lang. 2009
53. Fox-Rushby J. Economic evaluation. 2006. London: Open University Press.
54. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:775–86.
55. Fruchtman Y, Segev RW, Golan AA, Dalem Y, Tailakh MA, Novak V, *et al.* Aspects of *Brucella* Bacteremia in Children in Southern Israel: A 7-Year Retrospective Study (2005–2011). *Vector-borne and zoonotic diseases* 2015; 15 (3): 195-201.
56. Galińska EM, Zagórski J. Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann Agric Environ Med.* 2013; 20 (2): 233–8.
57. Garin-Bastuji B, Mick V, Le Carrou G, Allix S, Perrett LL, Dawson CE, Groussaud P, Stubberfield EJ, Koylass M, Whatmore AM. Examination of Taxonomic Uncertainties Surrounding *Brucella abortus* bv. 7 by Phenotypic and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 2014; 80 (5): 1570–9.
58. Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, Javani S, Moradi S. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanzan, Iran. 2014; 45 (2): 533- 8. Disponible en: www.sbmicrobiologia.org.br [20 de abril de 2015].
59. Geresu MA, Kassa GM. A Review on Diagnostic Methods of Brucellosis. *J Veterinar Sci Techno* 2016; 7: 323. doi: 10.4172/2157-7579.1000323.
60. Ghezelsofla E, Moghadas K, Zamani M, Moghni M, Aghamolae H, Moosavi F, *et al.* Evaluation of two PCR techniques for detection of *Brucella* DNA in Contaminated serum sample. *Science Journal* 2015; 36 (3) ISSN: 1300-1949.
61. Glynn K, Dragon G. Brucelosis. En: Heymann DL, editor. El control de las enfermedades transmisibles. 19ª ed. Washington, D.C.: OPS; 2011. p. 42-6.
62. Godfroid J, Al Dahouk S, Pappas G, Roth F, Matope G, Muma J, *et al.* A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36: 241–8. doi: 10.1016/j.cimid.2012.09.001.

63. Godfroid J, Scholz H, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, *et al.* Brucellosis at the animal ecosystem human interface at the beginning of the 21st century. *Prev. Vet. Med.* 2011; 102: 118-31.
64. Gold MR. Cost effectiveness in health and medicine. New York: Oxford University Press; 1996.
65. Gupte S, Kaur T. Diagnosis of Human Brucellosis. *J Trop Dis* 2015; 4: 185. doi:10.4172/2329-891X.1000185.
66. Haddix A, Teutsch SA. Practical Guide to Prevention Effectiveness: decision and economic analysis. 2003. 2da ed. New York: Universidad de Oxford.
67. Hajia M, Fallah F, Angoti G, Karimi A, Rahbar M, Gachkar L, *et al.* Comparison of methods for diagnosing brucellosis. *Lab Medicine* 2013; 44 (1): 29-33.
68. Hammerl JA, Cöllner C, Jäckel C, Scholz HC, Nöckler K, Reetz J, *et al.* Genetic Diversity of Brucella Reference and Non-reference Phages and Its Impact on Brucella-Typing. *Front. Microbiol.* 2017; 8:408. doi: 10.3389/fmicb.2017.00408.
69. Hincapié M, Castillo C, Rodríguez VM, Rodríguez AJ. Impacto potencial de la variabilidad climática sobre la Brucelosis Humana en siete países suramericanos. *Rev. Méd. Evidencias* 2014; 3 (2):23-3.
70. Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1998; 17 (2): 507-
71. Johns B, Baltussen R, Hutubessy R. Programme costs in the economic evaluation of health interventions. *Cost Eff Resour Alloc*; 2003: 45-67.
72. Kaltungo BY, Saidu SN, Sackey AK, Kazeem HM. A review on diagnostic techniques for brucellosis. *Afr. J. Biotechnol.* 2014; 13 (1): 1-10.
73. Kassiri H, Amani H, Lotfi M. Epidemiological, laboratory, diagnostic and public health aspects of human brucellosis in western Iran. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013; 3(8): 589–94.
74. kuila P, Dutta D, Chakrabarty U, Chatterjee D, Sas D. Comparison of serological tests and PCR for diagnosis of human brucellosis suffering from fever. *Asian J Pharm Clin Res* 2017; 10 (5): 109-11.
75. Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 45-51.

- 76.Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977 Mar; 33:159-74.
- 77.Lapaque N, Moriyón I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8:60-6.
- 78.Laval E. Contribución al estudio histórico de la brucelosis en Chile. *Rev Chil Infect.* 2006; 23 (4): 362-66.
- 79.Leal-Klevezas DS, Martínez IO, Lopez A., Martínez JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 3087-90.
- 80.Ledwaba B, Mafofo J, Heerden H. Genome sequences of *Brucella abortus* and *Brucella suis* strains isolated from bovine in Zimbabwe. *Genome Announcements* 2014; 2 (5): e0 1063-14. Doi-10.1128/genome A. 01063-14.
- 81.López P. Estudio descriptivo de la presentación de brucelosis humana en Colombia desde 2000 hasta 2012. *Rev Med Vet.* 2014; (28):67-79.
- 82.Lowe CF, Showler AJ, Perera S, McIntyre S, Qureshi R, Patel SN, *et al.* Hospital-Associated Transmission of *Brucella melitensis* outside the Laboratory. *Emerging Infectious Diseases* 2015; 21(1): 150-2.
- 83.Lozano F, Engel P, Rodríguez de Córdoba S, Jaraquemada D, Gallart MT. Introducción al sistema inmunológico, sus principales elementos y la respuesta inmunitaria. En: Rozman C, Cardellach F, Agustí A, *et al.*, editores. Tratado de Medicina Interna Farreras-Rozman. Vol 2. 17ª ed. España: Elviesier; 2012. p. 2453- 89.
- 84.Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Hasan DB. Manual de Procedimientos. Técnicas para el Diagnóstico de Brucelosis Humana. Servicio de Brucelosis. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 2008; 78p.
- 85.Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2007; 25(3): 188-202.

86. Martínez P. Brucelosis humana: situación epidemiológica en Chile, 2001-2010. *Rev Chilena Infectol.* 2013; 30 (6): 653-9.
87. Martirosyan A., Gorvel JP. *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol.* 2013; 8(2): 147-54. PMID: 23374122.
88. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 477-8.
89. Mejía A, Moreno M. Evaluación económica para la toma de decisiones en salud en Colombia. *Monitor estratégico* 2014; 5: 70 – 6.
90. Memish ZA, Almuneef M, Mah MW., et al. Comparison of the Brucella Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with Brucella bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 44: 129–32.
91. Méndez M, Rodríguez EJ, Sánchez LM, Brucelosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *Salud Pública Mex.* 2015; 57:519-27.
92. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Dirección de Registros médicos y estadísticas de salud. Sistema de información estadística. Enfermedades de declaración obligatoria. 2013.
93. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A: Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4):1211–8.
94. Mohamed J, Yong TB, Hashim R, Noor AM, Hamzah SH, Ahmad N. Identification of *Brucella* spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2015; (81): 227–33.
95. Morales MR, García N, Regalado SD, López A, Contreras A. Seguimiento clínico, serológico y mediante la reacción de polimerasa en cadena de una familia con brucelosis. *Rev Chilena de Infectol.* 2014; 31(4): 425-33.
96. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Brucella* y *Francisella*. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 7ª ed. España: Elsevier; 2013. p. 383-90.

97. Nimri LF. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC Infect. Dis.* 2003; 3 (5).
98. Obregón AM (A), Cabrera A, Echevarría E, Rodríguez Y, Rodríguez J. Detección de *Brucella* spp. por un sistema inmunocromatográfico comercial, en muestras ambientales cubanas. *Rev Cub Med Trop.* 2015; 67(2): 81-2.
99. Obregón AM (B), Muñoz K, Echevarría E, Rodríguez Y, Rodríguez J, Valdés Y, Baly A, Toledo M. Evaluación del sistema serológico Febrille Antigen *Brucella* para la pesquisa de anticuerpos contra brucelas, en Cuba. *Rev Cub Med Trop.* 2015; 67 (3): 92-3.
100. OIE. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. En: OIE: Manual de las pruebas diagnósticas para los animales acuáticos. 2012. Disponible en: www.oie.int.
101. OIE. Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En: OIE: Manual de las pruebas diagnósticas para los animales acuáticos. 2006. Disponible en: www.oie.int.
102. Oliveira C, Almeida JA, Feitosa A, Oliveira S, Rocha MV, da Silva-Júnior FF. Prevalence of *Brucella* spp in humans. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 2015; 23(5):919-26.
103. Özdemir M, Feyzioğlu B, Kurtoğlu MG, Doğan M, Dağı HT, Yüksekaya S, et al. A comparison of immunocapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis. *Int J Med Sci.* 2011; 8 (5):428–32.
104. Pabuccuoglu O, Ecemis T, El S, Coskun A, Akcali S, Sanlidag T. Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis. *Jpn J Infect Dis.* 2011; 64(4):272-6.
105. Padrón O, Martínez DI, Peniche A, López L. Historia de la brucelosis. *Rev de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana* 2011; 24 (2). ISSN 0187-8786.
106. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med.* 2005; 352: 2325-36.

107. Park MY, Lee CS, Choi YS, et al. A sporadic outbreak of human brucellosis in Korea. *J Korean Med Sci* 2005 Dec;20(6):941e6.
108. Park SH, Lee YH, Chu H, Hwang SD, Hwang KJ, Choi HY, Park M. Application of the Microagglutination Test for Serologic Diagnosis of Human Brucellosis. *Osong Public Health Res Perspect* 2012; 3(1), 19e23 doi: 10.1016/j.phrp.2012.01.003
109. Purwar S, Metgud S, Mutnal M, Nagamoti M, Patil C. Utility of Serological Tests in the Era of Molecular Testing for Diagnosis of Human Brucellosis in Endemic Area with Limited Resources. *J Clin Diagn Res.* 2016 Feb; 10(2): DC26–DC29. doi: 10.7860/JCDR/2016/15525.7311.
110. Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero J. Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral-Blood PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35 (11): 2927-30.
111. Radamés L. Género *Brucella*. En: Radamés L, García A, editores. Manual de teoría: Microbiología Veterinaria. Vol 2. 1a ed. Managua (Nicaragua): Universidad Nacional Agraria de la Habana; 2013. 143p.
112. Rahman A. Epidemiology of brucellosis in humans and domestic ruminants in Bangladesh. [Dissertation]. Liege (Belgica): University of Liege. Faculty of Veterinary Medicine; 2015.
113. Ramiro C, Guevara E. Actualización de la Guía Metodológica para la elaboración de Guías de Atención Integral en el Sistema General de Seguridad Social en Salud Colombiano, componente Evaluación Económica; 2013. 100 p.
114. Razzaq MS, AlSaadi MA. Molecular Study of virulence genes of *Brucella* isolated from human clinical cases in Babylon Province. *J Babylon Univ.* 2014; 22 (5): 1531-44.
115. Rigby CE, Frase AD. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Can J Vet Res.* 1989, 53:326-30.
116. Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate1 A. *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids. *Arch. Med. Vet.* 2006; 38 (1): 7-18.
117. Rodríguez M, Solera J. Brucellosis. *Medicine.* 2014; 11(52):3045-53.

118. Rodríguez MA, Vidal C. Conceptos básicos de economía de la salud para el médico general. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2007; 45 (5): 523-32.
119. Roldán P, Fachelli S. La encuesta. En: Roldán P, Fachelli S, editores. *Metodología de la Investigación Social Cuantitativa*. 1ra ed. España: Bellaterra; 2015, p. 8 – 41. Disponible en: <http://ddd.uab.cat/record/163567>.
120. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-goñi I. Specific detection of Brucella DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 615-7.
121. Santis RD, Ciammaruconi A, Pomponi A, Fillo S, Lista F. Brucella: Molecular Diagnostic Techniques in Response to Bioterrorism Threat. *J Bioterr Biodef* 2011; S2:002. doi:10.4172/2157-2526.S2-002.
122. Sathyanarayan MS, Suresh DR, Suresh BS, Krishna S, Mariraj J, Surekha YA, et al. A comparative study of agglutination tests, blood culture & ELISA in the laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int. J Biol Med Res.* 2011;2(2):569-72.
123. Sbriglio JL, Sbriglio H, Sainz S. Brucellosis. Una patología generalmente subdiagnosticada en humanos y que impacta negativamente en la producción pecuaria y desarrollo de nuestros países. *Rev bioanalisis.* 2007: 18-22.
124. Scholz HC, Pfeffer M, Witte A, Neubauer H, Al DS, Wernery U, Tomaso H. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the recA gene. *J Med Microbiol* 2008; 57: 64-71.
125. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev. Sci. Tech.* 2013; 32 (1): 149-62.
126. Schutze GE, Jacobs RF. Brucella. En: Kliegman RM, Stanton BF, Schor NF, et al., editores. Nelson. Tratado de pediatría. Vol 1. 19a ed. España: Elsevier; 2013.p. 1024-26.
127. Serrato A, Flores LL, Aportela J, Sierra E. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En: Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha MG, editores. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 1ra ed. México: México D.F.; 2014. p. 63-73.
128. Siegel S. Diseño experimental no paramétrico aplicado a las ciencias de la conducta. 1970. Edición Revolucionaria. Instituto Cubano del Libro.

129. Skalsky K, Yahav D, Bishara J, Pitlik S, Leibovici L, Paul M. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2008; 336 (7646):701-4.
130. Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect*. 2011; 13: 134-42.
131. Sycz G. Caracterización de la vía de señalización de LOVHK implicada en mecanismos de respuesta a estrés y virulencia en *Brucella* spp. [tesis doctoral]. Buenos Aires (Argentina): Universidad de Buenos Aires; 2015. 193p. Disponible en: www.digital.bl.fcen.uba.ar.
132. Tae H, Shallom S, Shluge R, Preston D, Adams LG, Garner HR, Revised genome sequence of *Brucella suis* 1330. *Journal of Bacteriology* 2011; 193 (22): 6410.
133. Tcherneva E, Rijpens N, Naydensky C, Herman L: Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. *Vet Microbiol* 1996; 51(1–2):169–178.
134. Valenzuela CR, Cosme J, Escobar N, Gálvez AM, Cárdenas JM, Fonseca G, et al. Economía de la salud. 3ra edición. Santiago de Cuba: Editorial Oriente; 2013.
135. Varian HR. Intermediate Microeconomics: a modern approach. 2004, 4th. ed. New York-London: W.W. Norton y Company.
136. Vega CA, Ariza R, Rodríguez FL. Brucelosis: Una infección vigente. *Acta Médica Grupo Ángeles* 2008; 6(4):158-65.
137. Verger JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1985; 35: 292- 5.
138. Von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Reviews* 2013; 36 (3): 533-62.
139. Wang Y, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu C, et al. Polymerase chain reaction–based assays for the diagnosis of human brucellosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014; 13:31.

140. Wyatt HV. The curious affair of the identity of Fioravanti Sammut (b.1863) and Temistocle Zammit (d.1935). *J. Med. Biogr.* 2011; 19 (3): 128–31.
141. Yohannes M, Gill JP, Ghatak S, Singh DK, Tolosa T. Comparative evaluation of the Rose Bengal plate test, standard tube agglutination test and complement fixation test for the diagnosis of human brucellosis. *Rev Sci Tech* 2012;31(3):979-84.
142. Zahidi JM, Yong TB, Hashim R, Noor AM, Hamzah SH, Ahmad N, et al. Identification of *Brucella* spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2015; 81: 227–33.
143. Zárate V. Evaluaciones económicas en salud: Conceptos básicos y clasificación. *Rev Med Chile* 2010; 138 (2): 93-97.
144. Zhong Z, Wang L, Chen Y, Wang Z, Wang Y, Cui M, et al. Complete genome sequence of *Brucella abortus* strain BCB034, a strain of biovar 2 isolated from human. *J Bacteriol.* 2012; 194 (24):6943.
145. Zwerdling A. Rol de las lipoproteínas de *Brucella abortus* en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en brucelosis. [tesis doctoral]. Buenos Aires (Argentina): Universidad de Buenos Aires; 2009. 133p. Disponible en: www.digital.bl.fcen.uba.ar.
146. Zygmunt MS, Jacques I, Bernardet N, Cloeckaert A. Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging *Brucella* species. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19 (9):1370-3.

ANEXOS

ANEXO 1

Instructivo del estuche comercial: Febrile Antigen Brucella (FAB), para la determinación de anticuerpos por aglutinación en suero humano.

DIESSE
DIESSE Diagnostica Senese SpA
Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI
Tel. ++39/0577/587111 - Fax ++39/0577/318690

INSTRUCCIONES PARA EL USO

FEBRILE ANTIGEN BRUCELLA
Para la determinación de anticuerpos anti-Brucella en suero humano, mediante aglutinación

(Español)

REF 21212/CUB Febrile Antigen Brucella (650 pruebas)

1. INDICACIONES: SUSPENSIÓN COLOREADA DE BRUCELLA PARA LA DETERMINACIÓN, EN SUERO, DE ANTICUERPOS AGLUTINANTES ESPECÍFICOS. PUEDE SER EFECTUADA LA PRUEBA DE SCREENING EN LÁMINA Y LA PRUEBA SEMICUANTITATIVA EN TUBO.

2. RESUMEN
La investigación serológica en pacientes que presentan fiebre persistente puede ayudar en el diagnóstico de la brucelosis (1)(2). Técnicamente la prueba se efectúa por medio de la observación de la aglutinación directa entre una suspensión bacteriana y anticuerpos específicos eventualmente presentes en el suero del paciente. El método es conocido como reacción de Widal-Wright y permite, probando diluciones seriadas del suero, efectuar una titulación semicuantitativa de los anticuerpos presentes en la muestra.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO
La muestra de suero examinado se hace reaccionar con la suspensión bacteriana (cepa W 99 coloreada con colorante vital estable) con una concentración optimizada para efectuar la prueba en lámina. Si se encuentran presentes anticuerpos específicos contra antígenos de brucella, con un título significativo, se producirá una aglutinación visible después de dos minutos. Las muestras positivas pueden ser tituladas por medio de la prueba en tubo utilizando una gota de la misma suspensión utilizada para la prueba en lámina.

4. COMPONENTES DEL KIT:

BACTERIAL SUSPENSION SUSPENSIÓN BACTERIANA 2 frascos x 16,5 mL
Contenido: suspensión coloreada de bacterias muertas a una concentración optimizada para efectuar la prueba en lámina. Contiene como conservante azida sódica a una concentración de 0,09 %.

BRUCELLA POSITIVE CONTROL CONTROL POSITIVO 1 frasco x 1,8 mL
Contenido: Suero de control positivo de origen animal, que contiene anticuerpos que aglutinan con la suspensión de brucella. Contiene como conservante azida sódica a una concentración de 0,09%.

OTROS MATERIALES

- 60 láminas desechables
- 700 aplicadores
- 1 cuentagotas
- 1 frasco de 5 mL

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS:

- Pipetas con puntas desechables
- Solución fisiológica

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS
Los reactivos deben ser conservados entre 2 - 8 °C.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de su apertura y/o su preparación

REACTIVOS	CONDICIONES
SUSPENSIÓN BACTERIANA	2 meses a 2 - 8 °C
CONTROL POSITIVO	2 meses a 2 - 8 °C

6. PRECAUCIONES DE USO
SOLAMENTE PARA USO DE DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Cualquier muestra de origen biológico debe ser considerada potencialmente infecciosa. Todos los reactivos y las muestras deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria del laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos infecciosos, según regulaciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear con la boca. Usar los guantes de monouso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos cuidadosamente después de terminar la prueba.
2. Los reactivos contienen azida sódica (0,09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.
3. Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con abundante agua.
4. El derrame de los materiales potencialmente infecciosos se debe retirar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser desinfectada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1%, antes de se que se continúe el trabajo. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluido los guantes, se deben tratar como residuo potencialmente infeccioso. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

	Capítulo
Cambios introducidos en la revisión actual	Aplicación - 7 - 10 - 12 Explicación de los símbolos

IO-09/075 - FA2 Ed. 29.05.2015

Precauciones analíticas

1. **Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18 – 30 °C) antes de su uso.** Inmediatamente después del uso vaciar el cuentagotas y poner los reactivos a 2 – 8 °C.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos
3. No modificar el método indicado en las presentes instrucciones de uso.

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN:

Suero fresco, si no se va a ensayar al momento puede ser conservado a 2 – 8 °C hasta un máximo de 7 días. Para conservaciones más largas, congelar a -20 °C, la muestra se puede descongelar como máximo 3 veces. Evitar el uso de congeladores autodescongelantes para la conservación de la muestra. Utilizar las muestras inmediatamente después de descongelar (1).

8. PROCEDIMIENTO

Poner el reactivo de la suspensión bacteriana a temperatura ambiente y agitar cuidadosamente. **Evitar una agitación vigorosa.** Tomar una alícuota y transferirla en el frasco cuentagotas de 5 mL.

*** PRUEBA DE SCREENING**

Dispensar 20 µL de la muestra de suero examinada en el interior de un círculo de la lámina. Añadir 50 µL de la suspensión bacteriana (una gota) y mezclar; girar la lámina y observar después de dos minutos exactos. En las muestras positivas se obtendrá aglutinación, mientras con las negativas la suspensión quedará homogénea.

*** TITULACIÓN EN TUBO**

Diluir la muestra 1:20 con solución fisiológica (0,1 mL suero + 1,9 mL de solución fisiológica). Recoger 1 mL del primer tubo y hacer diluciones seriadas en tubos conteniendo 1 mL de solución fisiológica, como se indica en el esquema. Añadir una gota de suspensión a cada tubo. Agitar. Incubar a 37 °C durante una noche (ver esquema más abajo). El blanco de prueba se efectúa mezclando la suspensión bacteriana con solución fisiológica.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Sol.Fis.mL.	1,9	1	1	1	1	1	1
Suero mL	0,1						
Mezclar y transferir mL		1	1	1	1	1	1
Dilución / Titulación	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280

9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Utilizando una gota de suero de **Control Positivo** efectuar la prueba en lámina. Se debe obtener una aglutinación evidente.

10. INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA – VALORES NORMALES

Se consideran sospechosas las titulaciones de 1/80; titulaciones superiores tienen un significado diagnóstico.

11. LIMITACIONES DE LA PRUEBA

En las aglutinaciones en lámina con suero no diluido puede observarse el fenómeno de prozona. Si se sospecha que la muestra es positiva, repetir la prueba diluyendo 1:8 con solución fisiológica. La suspensión de brucella no aglutina en presencia de anticuerpos incompletos.

12. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

Suspensión	Especificidad %	Sensibilidad %
Brucella	97,6	95,7

13. BIBLIOGRAFÍA

1. P. Nicoletti in F. Pasquinelli: Diagnostica e Tecnica di Laboratorio Vol. 2 p. 319. Rosini ed. Firenze 1981.
2. Edwards P.R., Ewing W.H. Identification of Enterobacteriaceae 3rd ed. Burgess Publishing Co.
3. Cruickshank R. Medical Microbiology 11th Ed., p. 907 (1965).
4. Huddleson I.F. and Abell E. J. Inf. Dis. 42: 242 (1928).

	Capítulo
Cambios introducidos en la revisión actual	Aplicación – 7 – 10 – 12 Explicación de los símbolos

ANEXO 2

Instructivo del estuche comercial: *Brucella* ELISA IgM

VIRCELL
MICROBIOLOGISTS

BRUCELLA ELISA IgM

M1006: Prueba inmunoenzimática indirecta para determinar anticuerpos IgM frente a *Brucella* en suero humano. 96 tests.

INTRODUCCIÓN:

Las pruebas más empleadas en el diagnóstico serológico de la brucelosis son la aglutinación, la prueba del Rosa de Bengala, el test de Coombs y las pruebas de ELISA. La detección de IgM frente a lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* es adecuada para el diagnóstico de las formas agudas de la enfermedad. La técnica de ELISA es sensible y específica para la detección de estos anticuerpos tipo IgM frente a *Brucella*.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Método de ELISA basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados; la unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

CARACTERÍSTICAS:

Todos los reactivos a excepción de la solución de lavado vienen listos para su uso.
Las soluciones de dilución de muestras y de conjugado están coloreadas como ayuda a la realización de la técnica.
No se precisa dilución previa de la muestra.
Los pocillos son individuales, por lo que sólo se consumen tantos pocillos como pruebas se van a realizar.

CONTENIDO DEL KIT:

- 1 VIRCELL BRUCELLA PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con LPS de *Brucella abortus*, cepa S-99.
- 2 VIRCELL SERUM DILUENT: 25 ml de diluyente para sueros: tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, con Proclin y coloreado de azul. Listo para su uso.
- 3 VIRCELL IgM POSITIVE CONTROL: 500 µl de suero control positivo con Proclin.
- 4 VIRCELL IgM CUT OFF CONTROL: 500 µl de suero cut off con Proclin.
- 5 VIRCELL IgM NEGATIVE CONTROL: 500 µl de suero control negativo con Proclin.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

COMPONENTE	ESTABILIDAD
Solución de lavado diluida (1x)	4 meses a 2-8°C
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8°C

ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:

Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.
No permitir el secado de la placa entre los lavados y la adición de los reactivos.
La solución de sustrato es fotosensible. Evitar la exposición directa a la luz y desechar si presenta coloración azul. La solución de sustrato no debe entrar en contacto con oxidantes como soluciones de hipoclorito ni con algunos metales. Evitar el contacto con partes metálicas o componentes metálicos de equipos o instrumentos sin antes haber comprobado su compatibilidad.
Utilizar sólo la cantidad de solución de lavado, sustrato, diluyente de sueros y conjugado necesarias para la realización de la prueba. No devolver a los viales el exceso sobrante.
VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:

1. Este producto es sólo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
2. Usar sólo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Sólo las soluciones de lavado, sustrato, parada y diluyente de sueros son compatibles con los equivalentes en otras referencias y lotes de ELISA VIRCELL.
3. Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar sólo material limpio y preferentemente desechable.
4. No utilizar en caso de deterioro del envase.
5. No pipetear con la boca.
6. El diluyente para sueros, placa, conjugados y controles de este equipo contienen material de origen animal. Los controles contienen además material de origen humano. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg y anticuerpos frente a

PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
Fabricante: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre. 18320 Santa Fe *GRANADA* SPAIN* Tel. +34.958.441264* Fax +34.958.510712
<http://www.vircell.com>

VIH y de Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos. Los pocillos contienen antígeno de Brucella inactivado, no obstante, deben manejarse con precaución. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de éstos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.

- La solución de sustrato puede ser irritante para piel y mucosas. En caso de contacto con esta solución lavar la superficie afectada con agua y solicitar asistencia médica. Para más información, solicite la hoja de seguridad del producto.
- Para la utilización del producto en sistemas automáticos de análisis se recomienda una evaluación previa. VIRCELL dispone de juegos de muestras para su ensayo en paralelo con el método manual. Estos juegos pueden ser solicitados con tal finalidad. Asimismo, es posible la consulta de un listado de sistemas automatizados aprobados para su utilización con la gama de productos ELISA VIRCELL.
- Durante los periodos de incubación, un adecuado sellado de las placas con la lámina adhesiva que se suministra evita la desecación de la muestra y garantiza la repetitividad de los resultados.
- Este producto ha sido diseñado para su uso conjunto y exclusivo con SORBENTE de IgG humana VIRCELL (ref. Vircell S001).

TOMA DE MUESTRA:

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas estériles o asépticas para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20°C, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. No utilizar sueros hiperlipémicos, hemolizados o contaminados. Los sueros que presenten partículas pueden ser clarificados por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

El único reactivo que es necesario preparar con antelación a la realización de la prueba es la solución de lavado. Para ello completar hasta 1 litro con agua destilada un vial de 50 ml de solución de lavado concentrada (20x). Si aparecen cristales durante la conservación de la solución concentrada, calentar a 37°C antes de diluirlo. Una vez preparada conservar entre 2 y 8°C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

- Ajustar una estufa/baño de agua a 37±1°C.
- Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando sacar la placa del envase.
- Agitar todos los componentes.
- Sacar el número de pocillos necesarios para el número de sueros que se van a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero cut off. Colocar el resto de los pocillos en el sobre y volver a cerrarlo.
- Añadir 25 µl de sorbente IgG (ref. Vircell S001) a todos los pocillos que se vayan a emplear, excepto a los pocillos donde se dispensen los controles. Añadir 5 µl de las muestras y seguidamente 75 µl de diluyente de muestras a todos los pocillos empleados. Para la preparación de los pocillos de los controles, añadir 100 µl de diluyente de muestras y seguidamente 5 µl del control positivo, 5 µl del suero cut off (en duplicado) y 5 µl del control negativo en los pocillos correspondientes. En el caso de la realización manual del método, se agitará la placa en un agitador (2 minutos) para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos. Si no es posible asegurar esta agitación, debe hacerse una predilución de la muestra en tubo o placa añadiendo el doble del volumen de los reactivos y de muestra. Homogenizar con la pipeta y trasvasar seguidamente 105 µl de cada muestra ya diluida a los pocillos.
- Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 45 minutos a 37±1°C.
- Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.

- Añadir inmediatamente 100 µl de conjugado IgM a todos los pocillos.
- Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 30 minutos a 37±1°C.
- Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
- Añadir inmediatamente 100 µl de solución de sustrato a todos los pocillos.
- Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.
- Añadir inmediatamente 50 µl de solución de parada a todos los pocillos.
- Valorar espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles.

La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:

Cada ensayo debe utilizar control positivo, negativo y cut off. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo.

Las densidades ópticas (D.O.) de los controles deben estar en los rangos siguientes. En caso contrario se desechará la prueba.

CONTROL	D.O.
CONTROL POSITIVO	>0,9
CONTROL NEGATIVO	<0,5
CONTROL CUT OFF	>0,55
	<1,5

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Calcular la media de las D.O. del suero cut off.

Índice de anticuerpos=(D.O. de la muestra / media de D.O. del suero cut off) x 10

INDICE	INTERPRETACIÓN
<9	Negativo
9-11	Dudoso
>11	Positivo

Las muestras con resultados dudosos deben ser vueltas a analizar y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 9 se considera que no tienen anticuerpos específicos frente a Brucella de tipo IgM.

Las muestras con índices superiores a 11 se considerará que tienen anticuerpos específicos frente a Brucella de tipo IgM.

LIMITACIONES DEL MÉTODO:

- Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
- El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, lavados y tiempos de incubación.
- Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos. El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante técnicas de aislamiento.
- El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
- La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.
- Para la determinación de IgM se debe realizar la técnica utilizando sorbente de anticuerpos IgG humanos ya que de otro modo se pueden obtener resultados falsos positivos por la presencia de factor reumatoide o resultados falsos negativos por exceso de anticuerpos IgG.

PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Fabricante: VIRCELL, S.L. Pza. Domínguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre, 18320 Santa Fe *GRANADA* SPAIN* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

PRESTACIONES

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:

Se ensayaron 102 muestras de suero/plasma con BRUCELLA ELISA IgM frente a un ensayo de aglutinación. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Nº MUESTRAS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
IgM	102	89%	100%

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales

PRECISIÓN INTRAENSAJO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente 10 veces cada uno en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

SUERO	N	% C.V.
CP	10	1,74
CN	10	5,00
CO	10	3,39

C.V. Coeficiente de variación

PRECISIÓN INTERENSAJO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

SUERO	N	% C.V.
CP	10	2,70
CN	10	7,71
CO	10	5,07

C.V. Coeficiente de variación

REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:

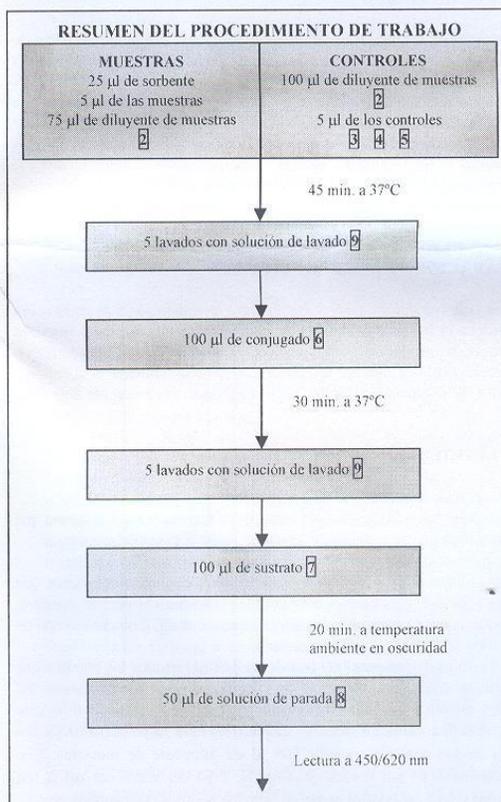
Se ensayaron 14 muestras caracterizadas positivas frente a miembros del grupo sindrómico (*Salmonella typhi* O, *Salmonella typhi* H, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr). Se realizó un ensayo IgM a 2 muestras caracterizadas positivas frente a factor reumatoide. Las muestras ensayadas dieron resultados negativos, demostrando la reacción específica del ensayo sin reacción cruzada o interferencias ocasionadas por los agentes descritos.

OTROS ESTUDIOS DE INTERFERENCIAS:

Se realizó un ensayo ELISA para determinación de anticuerpos IgG e IgM a 15 sueros con anticuerpos antinucleares y 25 sueros con factor reumatoide previamente caracterizados frente a 4 kits ELISA diferentes (3 antígenos virales y un antígeno bacteriano). Para determinación IgM los sueros fueron tratados con sorbente anti-IgG. Se demostró la eficacia del tratamiento con sorbente para evitar interferencias en IgM ocasionadas por factor reumatoide en un 100% y en un 96% para anticuerpos antinucleares. Se ha comprobado la eficacia del sorbente recomendado para evitar la aparición de falsos negativos por exceso de IgG.

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre 2-8°C
	Contiene suficiente para <X> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	<X> pocillos



PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

Fabricante: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Poligono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* SPAIN* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

BIBLIOGRAFÍA:

1. Alonso-Urmeneta, B., I. Moriyon, R. Díaz, and J. M. Blasco. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 26:2642-6.
2. Araj, G. F., A. R. Lulu, M. Y. Mustafa, and M. I. Khateeb. 1986. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J Hyg (Lond)* 97:457-69.
3. Ariza, J., T. Pellicer, R. Pallares, A. Foz, and F. Gudíol. 1992. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 14:131-40.
4. Baldi, P. C., S. E. Miguel, C. A. Fossati, and J. C. Wallach. 1996. Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella* species. *Clin Infect Dis* 22:446-55.
5. Foz, A., T. Pellicer, J. Comerma, and J. Ariza. 1985. Specificity of ELISA anti-immunoglobulin G conjugate in the diagnosis of human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol* 4:138-9.
6. Magee, J. T. 1980. An enzyme-labelled immunosorbent assay for *Brucella abortus* antibodies. *J Med Microbiol* 13:167-72.
7. Pellicer, T., J. Ariza, A. Foz, R. Pallares, and F. Gudíol. 1988. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. *J Infect Dis* 157:918-24.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:
customerservice@vircell.com

REVISADO: Julio-13

PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

Fabricante: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Poligono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe *GRANADA* SPAIN* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

ANEXO 3

Instructivo del estuche comercial: *Brucella* ELISA IgG.

vircell
MICROBIOLOGISTS

BRUCELLA ELISA IgG

Producto para diagnóstico *In vitro*

G1003: Prueba inmunoenzimática indirecta para determinar anticuerpos IgG frente a *Brucella* en suero/plasma humano. 96 tests.

INTRODUCCIÓN:
Las pruebas más empleadas en el diagnóstico serológico de la brucelosis son la aglutinación, la prueba del Rosa de Bengala, el test de Coombs y las pruebas de ELISA. La detección de IgG frente a lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* es adecuada para el diagnóstico de todas las formas de la enfermedad. La técnica de ELISA es sensible y específica para la detección de estos anticuerpos tipo IgG frente a *Brucella*.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:
Método de ELISA basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados, la unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

CARACTERÍSTICAS:
Todos los reactivos a excepción de la solución de lavado vienen listos para su uso.
Las soluciones de dilución de muestras y de conjugado están coloreadas como ayuda a la realización de la técnica.
No se precisa dilución previa de la muestra.
Los pocillos son individuales, por lo que solo se consumen tantos pocillos como pruebas se van a realizar.

CONTENIDO DEL KIT:

- 1 VIRCELL BRUCELLA PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con LPS de *Brucella abortus*, cepa S-99.
- 2 VIRCELL SERUM DILUENT: 25 ml de diluyente para sueros: tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, con Neolone y Bronidox y coloreado de azul. Listo para su uso.
- 3 VIRCELL IgG POSITIVE CONTROL: 500 µl de suero control positivo con Neolone y Bronidox.
- 4 VIRCELL IgG CUT OFF CONTROL: 500 µl de suero cut off con Neolone y Bronidox.
- 5 VIRCELL IgG NEGATIVE CONTROL: 500 µl de suero control negativo con Neolone y Bronidox.
- 6 VIRCELL IgG CONJUGATE: 15 ml de una dilución de globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa, con Neolone y Bronidox y coloreada de naranja. Lista para su uso.
- 7 VIRCELL TMB SUBSTRATE SOLUTION: 15 ml de solución de sustrato: tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.
- 8 VIRCELL STOP REAGENT: 15 ml de solución de parada: ácido sulfúrico 0,5 M.
- 9 VIRCELL WASH BUFFER: 50 ml de solución de lavado (concentrado 20x): tampón fosfatos con Tween[®]-20 y con Proclin.

Conservar entre 2 y 8°C y comprobar la fecha de caducidad.

Material necesario no contenido en el kit:
-Pipeta de precisión para dispensar 5 y 100 µl.
-Pipeta multicanal de precisión para dispensar 100 µl.
-Lavador de placas de ELISA.
-Incubador/baño termostático.
-Espectrofotómetro de placas de ELISA con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm.
-Agua destilada.
-Alternativamente procesador automático de ELISA.

CONSERVACIÓN:
Conservar entre 2 y 8°C. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La caducidad indicada será válida siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 8°C.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

Componente	Estabilidad
Solución de lavado diluida (1x)	4 meses a 2-8°C
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8°C

ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:
Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.
No permitir el secado de la placa entre los lavados y la adición de los reactivos.
La solución de sustrato es fotosensible. Evitar la exposición directa a la luz y desechar si presenta coloración azul. La solución de sustrato no debe entrar en contacto con oxidantes como soluciones de hipoclorito ni con algunos metales. Evitar el contacto con partes metálicas o componentes metálicos de equipos o instrumentos sin antes haber comprobado su compatibilidad.
Utilizar solo la cantidad de solución de lavado, sustrato, diluyente de sueros y conjugado necesarias para la realización de la prueba. No devolver a los viales el exceso sobrante.
VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:

1. Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
2. Usar solo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Solo las soluciones de lavado, sustrato, parada y diluyente de sueros son compatibles con los equivalentes en otras referencias a lotes de ELISA VIRCELL.
3. Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar solo material limpio y preferentemente desechable.
4. No utilizar en caso de deterioro del envase.
5. No pipetear con la boca.
6. El diluyente para sueros, placa, conjugados y controles de este equipo contienen material de origen animal. Los controles contienen además material de origen humano. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg y anticuerpos frente a VIH y Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos. Los pocillos

Vircell, S.L. Parque Tecnológico de la Salud, Avicena 8, 18016 Granada, España. Tel. +34 958 441 264 www.vircell.com

contienen antígeno de Brucella inactivado, no obstante, deben manejarse con precaución. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de éstos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.

7. La solución de sustrato puede ser irritante para piel y mucosas. En caso de contacto con esta solución lavar la superficie afectada con agua y solicitar asistencia médica. Para más información, solicite la hoja de seguridad del producto.

8. Para la utilización del producto en sistemas automáticos de análisis se recomienda una evaluación previa. VIRCELL dispone de juegos de muestras para su ensayo en paralelo con el método manual. Estos juegos pueden ser solicitados con tal finalidad. Asimismo, es posible la consulta de un listado de sistemas automatizados aprobados para su utilización con la gama de productos ELISA VIRCELL.

9. Durante los períodos de incubación, un adecuado sellado de las placas con la lámina adhesiva que se suministra evita la desecación de la muestra y garantiza la repetitividad de la muestra.

TOMA DE MUESTRA:

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas asépticas o estériles para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros/plasmas deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20°C, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. No utilizar muestras hiperlipémicas, hemolizadas o contaminadas. Las muestras que presenten partículas pueden ser clarificadas por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

El único reactivo que es necesario preparar con antelación a la realización de la prueba es la solución de lavado. Para ello completar hasta 1 litro con agua destilada un vial de 50 ml de solución de lavado concentrada (20x). Si aparecen cristales durante la conservación de la solución concentrada, calentar a 37°C antes de diluirlo. Una vez preparada conservar entre 2 y 8°C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

1. Ajustar una estufa/baño de agua a 37±1°C.
2. Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando sacar la placa del envase.
3. Agitar todos los componentes.
4. Sacar el número de pocillos [2] necesarios para el número de muestras que se van a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero cut off. Colocar el resto de los pocillos en el sobre y volver a cerrarlo.
5. Añadir 100 µl de diluyente de muestras [2] a todos los pocillos que se vayan a emplear. Añadir 5 µl de las muestras, 5 µl del control positivo [3], 5 µl del suero cut off [4] (en duplicado), y 5 µl del control negativo [5] en los pocillos correspondientes. En el caso de la realización manual del método, se agitará la placa en un agitador (2 minutos) para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos. Si no es

posible asegurar esta agitación, debe hacerse una predilución de la muestra en tubo o placa añadiendo el doble del volumen de diluyente de muestras [2] y de muestra. Homogenizar con la pipeta y trasvasar seguidamente 105 µl de cada muestra ya diluida a los pocillos [1].

6. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 45 minutos a 37±1°C.

7. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado [6], asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.

8. Añadir inmediatamente 100 µl de conjugado IgG [6] a todos los pocillos.

9. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 30 min. a 37±1°C.

10. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado [6], asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.

11. Añadir inmediatamente 100 µl de solución de sustrato [7] a todos los pocillos.

12. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.

13. Añadir inmediatamente 50 µl de solución de parada [8] a todos los pocillos.

14. Valorar espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles.

La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:

Cada ensayo debe utilizar control positivo, negativo y cut off. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo. Las densidades ópticas (D.O.) de los controles deben estar en los rangos siguientes. En caso contrario se desechará la prueba.

Control	D.O.
Control positivo	>0,9
Control negativo	<0,5
Control cut off	>0,55
	<1,5

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Calcular la media de las D.O. del suero cut off.

Índice de anticuerpos= (D.O. de la muestra / media de D.O. del suero cut off) x10

Índice	Interpretación
<9	Negativo
9-11	Dudoso
>11	Positivo

Las muestras con resultados dudosos deben ser vueltas a analizar y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 9 se considera que no tienen anticuerpos específicos frente a Brucella de tipo IgG. Las muestras con índices superiores a 11 se considera que tienen anticuerpos específicos frente a Brucella de tipo IgG.

LIMITACIONES DEL MÉTODO:

1. Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
2. El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, lavados y tiempos de incubación.
3. Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos. El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante técnicas de aislamiento.
4. El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
5. La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.
6. Las muestras recogidas muy pronto en el transcurso de una infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En esos casos se recomienda realizar un ensayo para determinación de IgM u obtener una segunda muestra transcurridos entre 14 y 21 días, para ser ensayado en paralelo con la muestra original con el fin de determinar una seroconversión.
7. Los resultados obtenidos en la detección de IgG en neonatos deben ser interpretados con precaución, ya que las IgG maternas son transferidas pasivamente de la madre al feto antes del nacimiento. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.
8. Los resultados de determinación de anticuerpos de una muestra única no deben ser usados para el diagnóstico de una infección reciente. Se deben recoger muestras pareadas (aguda y convaleciente) para ser ensayadas paralelamente y determinar seroconversión o un incremento significativo en el nivel de anticuerpos.

PRESTACIONES:

• SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:

Se ensayaron 113 muestras de suero/plasma con BRUCELLA ELISA IgG frente a un test de Coombs, obteniendo los siguientes resultados:

	Nº muestras	Sensibilidad	Especificidad
IgG	113	98%	100%

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales

• PRECISIÓN INTRAENSAYO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente 10 veces cada uno en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	1,11
CN	10	7,45
CO	10	4,02

C.V. Coeficiente de variación

• PRECISIÓN INTERENSAYO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	1,68
CN	10	9,38
CO	10	4,71

C.V. Coeficiente de variación

• REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:

Se ensayaron 16 muestras caracterizadas positivas frente a miembros del grupo sindrómico (*Salmonella typhi* O, *Salmonella typhi* H, citomegalovirus, *Toxoplasma* y virus de Epstein-Barr). Se realizó un ensayo IgG a 3 muestras caracterizadas positivas frente a anticuerpos antinucleares. Las muestras ensayadas dieron resultados negativos, demostrando la reacción específica del ensayo sin reacción cruzada o interferencias ocasionadas por los agentes descritos.

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-y°C
	Contiene suficiente para <X> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	<X> pocillos

BIBLIOGRAFÍA:

1. Alonso-Urmeneta, B., I. Moriyon, R. Diaz, and J. M. Blasco. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay with Brucella native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 26:2642-6.
2. Araj, G. F., A. R. Lulu, M. Y. Mustafa, and M. I. Khateeb. 1986. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J Hyg (Lond)* 97:457-69.
3. Ariza, J., T. Pellicer, R. Pallares, A. Foz, and F. Gudiol. 1992. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 14:131-40.
4. Baldi, P. C., S. E. Miguel, C. A. Fossati, and J. C. Wallach. 1996. Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and

ANEXO 4

Descripción del proceso.

ACTIVIDAD	TAREA	EJECUTA	RECURSOS	LUGAR
Recepción de la muestra y traslado hacia el LNREB.	<ul style="list-style-type: none">- Inscripción de la muestra en el libro.- Trasladar la muestra al LNREB.	Técnico de recepción de muestras.	<ul style="list-style-type: none">- Tiempo- Mesa- Silla- Libro de recepción de muestras- Bolígrafo- Guantes- Contenedor para el transporte- Ascensor	Local de recepción de muestras. Laboratorio de Microbiología IPK.
Recepción, preparación y realización de la prueba.	<ul style="list-style-type: none">- Inscripción de la muestra en el libro.- Rotular la muestra.- Agitar- Pipetear (depositar la muestra en la lámina)- Prueba cualitativa FAB- Añadir el reactivo.- Lectura visual.- Desechar.- Si la prueba cualitativa es positiva.	Técnico de laboratorio	<ul style="list-style-type: none">- Tiempo.- Meseta.- Silla.- Libro del laboratorio.- Bolígrafo.- Guantes.- Marcador permanente.- Vortex.- Pipeta semiautomática 2-20 µl.- Pipeta semiautomática 50-200 µl.- Pipeta semiautomática	LNREB

	<p>Realizar prueba semicuantitativa en tubo y en placa del FAB.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Añadir solución salina fisiológica a los tubos y placa de 96 pocillos. - Adicionar la muestra. - Realizar las diluciones. - Añadir el reactivo. - Incubar de 18 a 24 horas. - Lectura visual. - Desechar. - Anotar los resultados. 		<p>200-1000 µl.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pipeta semiautomática multicanal. <p>5-300 µl</p> <ul style="list-style-type: none"> - Puntas 200 µl. - Puntas 1000 µl. - Componentes de la prueba. - Solución salina fisiológica. - Tubos de cristal 100 X 13 fondo U. - Placas de poliestireno de fondo U de 96 pocillos. - Cinta adhesiva o papel parafim. - Incubadora de 37°C. - Contenedores para los desechos. - Modelo de resultados. 	
--	---	--	---	--

ANEXO 5

Encuesta para la recepción y el transporte de las muestras en el IPK.

1. Fecha:
2. Nombre del Paciente No.: _____ Hora de llegada: _____
3. Tiempo de demora de inscripción: _____
4. Tiempo de conservación en refrigerador _____
5. Tiempo de traslado al laboratorio de referencia: _____
6. Salario del técnico de recepción de muestras: _____
7. Materiales utilizados:

Guantes (cantidad en el día): _____

Cesta (cantidad): _____

Bolígrafo (cantidad, indagar cada qué tiempo lo cambia) _____, tiempo de uso aproximado _____

Libro de inscripción (cantidad, indagar cada qué tiempo lo cambia): _____ tiempo de uso aproximado _____.

8. Datos generales del local

Técnicos:

Número de inscripciones diarias (como promedio): _____

Sobre el local de inscripción

Mesas (cantidad): _____

Sillas para los técnicos (cantidad): _____

Aire acondicionado (cantidad y marca): _____

Ventilador (cantidad y marca): _____

Refrigerador (cantidad y marca): _____

Archivo o gavetero (cantidad): _____

Otros (describa): _____

ANEXO 6

Encuesta para la realización de la prueba cualitativa y la microtécnica de la prueba semicuantitativa del FAB en el LNREB.

Fecha: _____, número de la muestra: _____,

Marque con x si es la última que hizo en el día _____

1. Referido a la inscripción de la muestra

1.1 Fecha de llegada de la muestra: _____

1.2 Antes de inscribir la muestra que tiempo estuvo refrigerada _____, días.

1.3 Fecha de inscripción de la muestra: _____ Hora _____

1.4 Tiempo de inscripción: _____

1.5 Quién la realiza: _____ salario: _____

2. Referido a la prueba FAB.

2.1 Hora de inicio de la realización de la prueba FAB cualitativa: _____

2.2 Utilizó el Vortex u homogenizó la muestra manualmente:

Vortex (marque con x): ___ Manual (marque con x): ___

2.3 Quién la realiza: _____ salario: _____

2.4 Puntas (cantidad) _____, ¿cuántas veces se reutiliza una punta?: _____

2.5: Tiempo de anotación en el libro para la prueba: _____

2.6 Hora de terminación de la realización de la prueba cualitativa (FAB): _____

Si el resultado es negativo pase a la pregunta 2.24 (no llene de 2.7 a 2.23)

2.7 Hora de inicio de la realización de la prueba semicuantitativa del FAB en tubo _____

2.8 Quién la realiza: _____ salario: _____

2.9 Puntas (cantidad) _____, ¿Cuántas veces se reutiliza una punta?: _____

2.10 Pipetas (cantidad) _____, ¿Cuántas veces se reutiliza una pipeta?: _____

2.11 Solución salina (cantidad en ml): _____ 2.12 Suspensión bacteriana (cantidad en ml) _____

2.13 Tubos de cristal (cantidad de tubos) _____, ¿Cuántas veces se reutiliza un tubo?: _____

2.14 Hora de terminación de la prueba semicuantitativa del FAB en tubo: _____

2.15 Tiempo de lectura de la prueba al día siguiente: _____

2.16 Hora de inicio de la realización de la microtécnica de la prueba semicuantitativa del FAB _____

2.17 Quién la realiza: _____ salario: _____

2.18 Puntas (cantidad) _____, ¿Cuántas veces se reutiliza una punta?: _____

2.19 Pipetas (cantidad) _____, ¿Cuántas veces se reutiliza una pipeta?: _____

2.20 Solución salina (cantidad en ml): _____ 2.21 Suspensión bacteriana (cantidad en ml) _____

2.22 Placa de 96 pocillos (cantidad de pocillos) _____, ¿Cuántas veces se reutiliza una placa?: _____

2.23 Hora de terminación de la microtécnica de la prueba semicuantitativa del FAB: -

2.24 Tiempo de lectura de la prueba al día siguiente: _____

2.25 Tiempo de anotación en el libro el resultado de la prueba: _____

2.26 Se presilla el resultado a la orden de laboratorio: Si____, No____

2.27 Guantes (cantidad por pares en el día para brucelas) _____, ¿Cuántas veces se reutiliza el par de guantes?: _____

3. Datos generales del LNREB.

3.1 Sillas para técnicos (cantidad): _____

3.2 Refrigerador (cantidad y marca): _____

3.3 Aire acondicionado (cantidad y marca): _____

3.4 Incubadora de 37°C (cantidad y marca): _____

3.5 Freezer - 20°C (cantidad y marca) _____

3.6 Gaveteros (cantidad): _____

3.7 Meceta (cantidad): _____

3.8 Computadora (cantidad): _____

3.9 Número de luces (tubos de luz fría): _____

3.10 Vortex (cantidad) _____

3.11 Tiempo promedio del especialista dedicado a brucelas por mes: _____

Salario: _____

3.12 Tiempo promedio del Jefe del LNREB dedicado a brucelas por mes: _____

Salario: _____

3.13 Número de pruebas de brucelas utilizadas en 2016: _____

3.14 Número de pruebas de brucelas utilizadas en 2017 (hasta abril): _____

3.15 Libro de registro primario del LNREB (indague cuantas muestras se inscribieron desde 2016 y el número de hojas utilizado por año): número de muestras año 2016:

_____, número de hojas 2016: ____; número de muestras año 2017 (hasta abril):

_____, número de hojas (hasta abril) 2017: ____.

Anexo 7

Carta aval de la responsable del Laboratorio Nacional de Espiroquetas y Brucelas (LNEB) del Dpto de Bacteriología-Micología del Centro de Investigación, Diagnóstico y referencia del IPK.

La Habana, 22 de diciembre de 2015.

A quien pueda interesar:

Por medio de la presente autorizo la utilización de 15 sueros positivos por técnicas serológicas de referencia de MAT y HAT para leptospirosis, procedentes del diagnóstico técnico especializado de rutina y de la vigilancia nacional, en la investigación titulada Implementación de un ensayo molecular para el diagnóstico de la brucelosis humana en Cuba, de la autora Dra Odisney Lugo.

Atentamente,



Dra. Ana Margarita Obregón Fuentes
Responsable del Laboratorio Nacional de Espiroquetas y Brucelas.
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia.
IPK.

Anexo 8

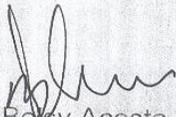
Carta aval del Jefe de Dpto de Virología del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia del IPK.

La Habana, 22 de diciembre de 2015

A quien pueda interesar:

Por medio de la presente yo, Dra Belsy Acosta, Jefa del Departamento de Virología, del Centro de Investigaciones, Referencia y Diagnóstico del IPK, autorizo al Laboratorio de Espiroquetas de Brucelas del Depto de Bacteriología-Micología, a utilizar los sueros donados por los laboratorios de ITS-virales, Enterovirus, Arbovirus, Hepatitis, en las tareas de investigación que se realizan en este laboratorio. Estas muestras no entran en conflicto ético, pues proceden del diagnóstico de rutina y la vigilancia nacional de estas enfermedades.

Atentamente,



Dra. Belsy Acosta Dr C,
Jefa del Departamento de Virología
Centro de Investigaciones, Referencia y Diagnóstico
IPK.

Anexo 9

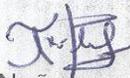
Carta aval del Jefe de Dpto de Parasitología del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia del IPK.

La Habana, 22 de diciembre de 2015

A quien pueda interesar:

Por medio de la presente yo, Dr. Fidel Nuñez, Jefe del Departamento de Parasitología, del Centro de Investigaciones, Referencia y Diagnóstico del IPK, autorizo al Laboratorio de Espiroquetas de Brucelas del Depto de Bacteriología-Micología, a utilizar los sueros donados por los laboratorios de Toxoplasma, en las tareas de investigación que se realizan en este laboratorio. Estas muestras no entran en conflicto ético, pues proceden del diagnóstico de rutina y la vigilancia nacional de esta enfermedad.

Atentamente,



Dr. Fidel Nuñez,
Jefe del Departamento de Parasitología
Centro de Investigaciones, Referencia y Diagnóstico
IPK.

Anexo 10

Carta aval del Jefe de Laboratorio SUMA del Banco de Sangre de 23 y 4.

La Habana, 22 de diciembre de 2015

A quien pueda interesar:

Por medio de la presente yo, Lic. Mabel Morales Hernández, Jefa del Laboratorio SUMA del Banco de Sangre de 23 y 4, autorizo al Laboratorio de Espiroquetas de Brucelas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), a utilizar los sueros donados por nuestra entidad, procedentes de individuos supuestamente sanos, en las tareas de investigación. Estas muestras no entran en conflicto ético, pues proceden de individuos voluntarios donantes de sangre.

Atentamente,



Lic. Mabel Morales Hernández
J' Laboratorio SUMA
Banco de Sangre 23 y 4