

Evaluación comparativa de la prueba de fluorescencia polarizada como diagnóstico confirmatorio de la brucelosis bovina en la provincia del Carchi, Ecuador

E.M. Ibarra Rosero*, H.R. Benavides Rosales, D.N. Játiva Cortez, P.H. González Chavisnan, Y.L. Fuertes Cevallos

Keywords: Brucellosis- Cattle- cELISA- Fluorescence- Ecuador

Resumen

El presente estudio, se realizó con la finalidad de evaluar comparativamente la prueba de Fluorescencia Polarizada (FPA) como prueba confirmatoria para la brucelosis bovina en la provincia del Carchi - Ecuador, comparándola con una prueba inmuno-enzimática competitiva (cELISA), prueba prescrita para el diagnóstico confirmatorio en el Programa Nacional de Control de la brucelosis bovina en el Ecuador. El estudio se llevó a cabo en la provincia del Carchi localizada al norte de Ecuador en muestras de suero sanguíneo ($n=1000$) obtenidas de bovinos hembras mayores de más de 2 años de edad con estatus sanitario y de vacunación desconocido, pertenecientes a 94 Unidades Productivas Agropecuarias (UPAs). Los sueros fueron analizados a través de la prueba Rosa de Bengala (RB). Los resultados positivos fueron confirmados a través de una prueba cELISA, y comparados con los resultados de la FPA considerando como punto de corte para esta última ≥ 89.9 mP. Mediante distribución de frecuencias se determinó que del total de muestras analizadas con RB ($n=1000$), 94 fueron positivas. De estas muestras positivas 77 se confirmaron como positivas tanto a cELISA como a FPA. Además 11 muestras que fueron positivas a RB y cELISA resultaron negativas a FPA. Asimismo 6 muestras positivas a RB fueron clasificadas como negativas tanto a cELISA como a FPA. Para el análisis de concordancia se utilizó el coeficiente Kappa que permitió observar que existe una moderada concordancia entre la prueba cELISA y la FPA con un índice de 0,472 (IC 95% 0.179-0.765) entre las dos pruebas.

Summary

Comparative Evaluation of Fluorescence Polarization Assay as Confirmatory Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Carchi Province, Ecuador

The present study was performed to evaluate and compare the Fluorescence Polarization Assay (FPA) as a confirmatory test for bovine brucellosis in the province of Carchi - Ecuador, comparing it with a immuno-enzymatic assay cELISA which is a test prescribed as confirmatory diagnosis in the National Bovine Brucellosis Control Program for Ecuador. The study was carried out in the province of Carchi, which is located in the north of Ecuador in blood serum samples ($n= 1000$) obtained from female bovines older than 2 years with unknown health status and vaccination, belonging to 94 Agricultural Production Units. The serum was analyzed by the Rose Bengal test (RB) and the positive results were confirmed through cELISA, and then compared with the FPA considering as cutoff ≥ 89.9 mP. Of the total samples analyzed with RB, 94 were positive. Of these positive samples 77 were confirmed for both cELISA and FPA. In addition, 11 samples that were positive for RB and cELISA were negative for FPA. Likewise, 6 samples positive for RB were classified as negative for both cELISA and FPA. The concordance analysis showed that there is a moderate concordance between the cELISA and the FPA with an index of 0.472 (95% CI 0.179-0.765) between the two tests.

¹State Polytechnic University of Carchi - School of Agricultural and Livestock Science (Tulcàn - Ecuador).

*Corresponding Author: Email: marcelo.ibarra@upec.edu.ec

Received on 23.03.17 and accepted for publication on 31.01.18

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial ocasionada por bacterias del género *brucella*, que afecta a las ganaderías desde el punto de vista productivo y reproductivo, en donde su signo característico es el aborto en hembras, y la orquitis y epididimitis en machos (25). Además al ser una zoonosis tiene consecuencias desde el punto de vista de salud pública (1).

Económicamente para América Latina la brucelosis bovina ocasiona pérdidas de sobre los 600 millones de dólares al año (1), mientras que la brucelosis humana causa pérdidas económicas que en Argentina fueron estimadas en 24 millones de dólares al año según García (4).

La importancia productiva, reproductiva y de salud pública que ocasiona la brucelosis a nivel mundial ha llevado a que ésta haya sido controlada y erradicada en muchas partes del mundo, pero permanece endémica en otros; como es el caso del Ecuador el mismo que en el año 1999 fue dividido en regiones epidemiológicas en función a la prevalencia de la enfermedad quedando: región de alta prevalencia con valores de 4% a 10.62%, provincias de la costa y sierra norte; regiones de baja prevalencia con valores de 1.2% y 2.6%, provincias de la sierra sur y amazonia; y Región libre de la enfermedad las Islas Galápagos (10).

Bajo esta realidad en el año 2009 el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), a través de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) implemento el Programa Nacional de Control de la brucelosis bovina, el mismo que tiene como estrategias: la sociabilización del problema, la vacunación masiva, diagnóstico e identificación de animales positivos, sacrificio de reactores positivos, y vigilancia epidemiológica (11).

Uno de los principales objetivos de las estrategias de control y erradicación de la brucelosis bovina a nivel mundial ha sido la identificación de animales reactores positivos, mediante el uso de pruebas diagnósticas. Para el caso de la brucelosis existen numerosas pruebas serológicas, sin embargo la aplicación de una sola prueba no sería apropiada para el diagnóstico, ya que se producen reacciones falso positivas por reacciones cruzadas por bacterias que comparten el mismo epítipo de *brucella* o por vacunación como es el caso de la brucelosis bovina cuando se vacuna con S19 (3, 13, 21); o también reacciones falso negativas por el uso de pruebas de baja sensibilidad, infecciones tempranas o tardías, así como también de problemas durante el muestreo, por ello la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) recomienda al menos dos pruebas serológicas para la identificación de animales seropositivos, una como tamizaje y otra como confirmatoria. Para el caso del Ecuador de manera

operativa ésta estrategia se realiza mediante la prueba Rosa de Bengala (RB) y la prueba de ELISA competitivo (cELISA) como prueba confirmatoria (11). La prueba de cELISA ha sido usada ampliamente para el diagnóstico confirmatorio de la brucelosis bovina, ya que es una prueba que tiene la capacidad de distinguir entre animales vacunados de aquellos naturalmente infectados (3). Su principio se basa en el uso de un anticuerpo monoclonal específico para uno de los epítipes (Lipopolisacárido O) de *Brucella* sp. para competir con el anticuerpo presente en el suero problema. Esta prueba presenta características de sensibilidad y especificidad de 97.5-100 % y 9.7-99.8 %, respectivamente (18, 22) pero presenta el inconveniente que es una prueba que requiere una serie de equipos, reactivos y experticia técnica para su desarrollo (12).

La prueba de fluorescencia polarizada (FPA) es una prueba homogénea de unión primaria que se fundamenta en la emisión de luz polarizada en función al tamaño de las moléculas en rotación, en donde dicho tamaño depende de la habilidad del anticuerpo de reaccionar con el antígeno, que utiliza una molécula reveladora (fluoresceína), Nielsen *et al.* (17) además que es una prueba simple y que puede ser realizada prácticamente en cualquier lugar, ya que no requiere pasos repetitivos ni lavados como otras pruebas de unión primaria (17). De igual forma que cELISA es una prueba que permite discriminar animales vacunados con S19 de aquellos naturalmente infectados (3), además que es una prueba que presenta características de sensibilidad y especificidad de 98.70% y 99,80% respectivamente (23).

El presente estudio, se realizó con la finalidad de evaluar comparativamente el FPA como prueba diagnóstica confirmatoria para la brucelosis bovina, ya que ésta es una prueba que presenta buenas características de sensibilidad y especificidad, así como también que es una prueba simple, a diferencia de la prueba cELISA, que es una prueba que igual que le FPA presenta buenas características de sensibilidad y especificidad, pero que requiere una serie de equipos, reactivos y experticia técnica para su desarrollo, y que actualmente es usada para el diagnóstico confirmatorio de la brucelosis. Además que para el caso del Ecuador se han reportado pocos estudios del uso de FPA para el diagnóstico de esta importante zoonosis. La presente investigación se realizó en la provincia del Carchi - Ecuador, ubicada en la sierra norte del Ecuador, considerada una provincia con aptitud ganadera ya que concentra el 8.74% del total de ganado lechero de la Sierra (5), bajo un sistema de manejo extensivo, y que además fue ubicada en una región de alta prevalencia para brucelosis con valores que van de 1.97 a 10.62% por el MAG-SESA (10). Desde el punto epidemiológico de la brucelosis se debe considerar que Carchi es

una provincia de frontera con el sur Colombia, en donde la brucelosis bovina también es endémica, y que al igual que el Ecuador tiene un programa implementado de control y erradicación de brucelosis bovina y bufalina, regulado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en la provincia del Carchi, localizada al norte de Ecuador, considerada como una zona de alta prevalencia de brucelosis bovina (10), en muestras de suero sanguíneo ($n=1000$) obtenidas de bovinos hembra, mayores a dos años, con estatus sanitario y de vacunación desconocido, pertenecientes a 94 Unidades Productivas Agropecuarias (UPAs).

El suero fue analizado siguiendo el proceso del Programa Nacional de Control de la brucelosis bovina del Ecuador (11) a través de la prueba Rosa de Bengala (RB) como prueba tamiz, y confirmada a través de una prueba inmuno enzimática competitiva (cELISA), que sirvió para evaluar y compararla con la prueba de fluorescencia polarizada (FPA) motivo de estudio. La prueba RB y FPA fueron realizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC), mientras que cELISA se realizó en un laboratorio externo certificado por AGROCALIDAD para el diagnóstico de brucelosis.

RB

La prueba Rosa de Bengala fue realizada según la técnica descrita por la OIE (21). El antígeno utilizado es una suspensión bacteriana de *Brucella* coloreada con rosa de bengala, distribuido en Ecuador por la casa Livexlab (lote 101). El antígeno y los sueros fueron puestos a temperatura ambiente por un lapso de 60 minutos, previo su uso. A continuación 30 μ l del suero a investigar fue colocado en una placa de vidrio, a lo cual se agregó 30 μ l del antígeno, y mezcló. La placa fue homogenizada durante 4 minutos a temperatura ambiente, para luego proceder a la lectura. La interpretación de resultados fue: resultados positivos cuando exista la presencia de aglutinación y negativo sin aglutinación..

cELISA

La prueba inmuno enzimática competitiva (cELISA) fue realizada por un laboratorio externo, que utiliza el Kit comercial "SVANOVIR® *Brucella*-Ab C-ELISA" de la casa SVANOVA, y que al ser un análisis confirmatorio realiza el diagnóstico en duplicado. Para la interpretación de resultados se consideró el porcentaje de inhibición (PI), obtenido mediante la substracción de 100 para la división del promedio de densidades ópticas (DO) de las muestras con la DO del conjugado, y su interpretación se realizó con un punto de corte ≥ 30 % de inhibición.

FPA

La prueba de fluorescencia polarizada se realizó según las especificaciones del Kit comercial "Brucella Antibody Test Kit FPA" de la casa Ellie (Lote B1001). El kit FPA utiliza un extracto de polisacárido-O (OPS) de la bacteria *Brucella abortus* conjugado con fluoresceína. Los sueros y controles (20 μ l) fueron colocados dentro de tubos de boro-silicato más un diluyente (1 ml) e incubado por tres minutos a temperatura ambiente para realizar una lectura blanca de todas las muestras y controles. Luego se adicionó 10 μ l del antígeno con fluoresceína en todos los tubos, seguida de una incubación por tres minutos a temperatura ambiente, para luego repetir la lectura y obtener los valores de mili-polarización (mP) de todas las muestras y controles. La interpretación de resultados se realizó considerando un punto de corte de ≥ 89.9 mP (6).

La evaluación comparativa de las pruebas FPA y cELISA se realizó mediante distribución de frecuencias, y también mediante el coeficiente Kappa, considerando un intervalo de confianza (IC) de 95%, que permite definir la concordancia entre las dos observaciones. El coeficiente Kappa puede tomar valores entre -1 y +1, mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia, mientras más cercano a -1, menor es el grado de concordancia. Un valor de $k=0$ refleja que la concordancia es atribuida al azar (9).

Para la interpretación de resultados de manera cualitativa se utilizó la tabla propuesta por Landis y Koch (8) para expresar la fuerza de concordancia en función al coeficiente Kappa obtenido, como lo muestra la tabla 1.

Tabla 1
Interpretación de resultados cualitativos del coeficiente Kappa.

Coefficiente Kappa	Fuerza de Concordancia
0,00	Pobre
0,01 - 0,20	Leve
0,21 - 0,40	Aceptable
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Considerable
0,81 - 1,00	Casi perfecta

Resultados

Del total de muestras de suero sanguíneo (n=1000) analizadas a través de la prueba Rosa de Bengala (RB) se obtuvieron un total de 94 (9,4%) muestras positivas, pertenecientes a 18 UPAs (19.15%), mismas que fueron confirmados a través de una prueba inmuno enzimática competitiva (cELISA), y luego sometidas a la prueba de fluorescencia polarizada (FPA), motivo del presente estudio. Para la evaluación comparativa de FPA se consideró únicamente las muestras positivas a RB (n=94) ya que bajo esta modalidad funciona el Programa Nacional de Control de la brucelosis bovina (11) en el Ecuador.

De las 94 muestras positivas (Tabla 2) a la prueba Rosa de Bengala (RB), se confirmaron como positivas 77 muestras tanto para cELISA como para FPA. Además 11 muestras que fueron positivas a RB y cELISA resultaron negativas a FPA. Asimismo 6 muestras positivas a RB fueron clasificadas como negativas tanto a cELISA como a FPA. No se presentaron resultados positivos a RB y FPA y negativos a cELISA.

Setenta y siete muestras positivas tanto a cELISA como a FPA en los valores en función al punto de corte se puede observar que las observaciones cumplieron el punto de corte establecido para cada una de las pruebas, siendo para la prueba cELISA $\geq 30\%$ de inhibición, y para la prueba FPA ≥ 89.9 mP, como indica la tabla 3.

De las 6 muestras negativas tanto a cELISA como a FPA en los valores en función al punto de corte se puede observar que las observaciones presentaron valores por debajo del punto de corte establecido para cada una de las pruebas, siendo para la prueba cELISA $\geq 30\%$ de inhibición, y para la prueba FPA ≥ 89.9 mP, como indica la tabla 4.

Once muestras positivas a cELISA pero negativas a FPA en los valores en función al punto de corte se puede observar que las observaciones presentaron valores por debajo del punto de corte establecido

para la prueba FPA ≥ 89.9 mP, mientras que para la prueba cELISA mostraron valores $\geq 30\%$ de inhibición, establecido como punto de corte para cELISA, como indica la tabla 5.

Once muestras positivas a cELISA pero negativas a FPA en los valores en función al punto de corte se puede observar que las observaciones presentaron valores por debajo del punto de corte establecido para la prueba FPA ≥ 89.9 mP, mientras que para la prueba cELISA mostraron valores $\geq 30\%$ de inhibición, establecido como punto de corte para cELISA, como indica la tabla 5.

El análisis de concordancia de la prueba cELISA y FPA según el coeficiente de Kappa (Tabla 1) se puede observar que existe una moderada concordancia entre la prueba cELISA y el FPA con un índice de 0,472 con un intervalo de confianza (IC) de 95%, de 0.179-0.765.

Discusión

La prueba de cELISA ha sido prescrita por la OIE como diagnóstico confirmatorio de la brucelosis bovina a nivel internacional, sin embargo de acuerdo a Marcin Weiner et al. (12) esta es una prueba que a pesar de ser altamente específica, tiene el inconveniente de que requiere una serie de equipos, reactivos y experticia técnica.

De las 94 muestras positivas a la prueba Rosa de Bengala (RB), se confirmaron como positivas 77 muestras tanto para cELISA como para FPA. Esto atribuido a que las pruebas RB, cELISA, FPA tiene como fundamento la detección de inmunoglobulinas tipo IgG, a pesar que la prueba RB tiene como principio la aglutinación, mientras que el cELISA y FPA se basan en ensayos de unión primaria, tal como lo describe Gall y Nielsen (3).

De las 6 muestras positivas a RB pero clasificadas como negativas tanto a cELISA como a FPA, se puede atribuir a que la prueba Rosa de Bengala (RB) es una prueba altamente sensible, pero que tienen el inconveniente de dar resultados falsos positivos, atribuido a la presencia de anticuerpos vacunales de

Tabla 2
Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas.

Pruebas Diagnósticas			Observaciones
RB	cELISA	FPA	
+	+	+	77
+	+	-	11
+	-	-	6
Total			94

RB: Prueba Rosa de Bengala; cELISA: Prueba ELISA competitivo;
FPA: Prueba de Fluorescencia Polarizada.

Tabla 3
Resultados positivos para cELISA y positivos para FPA en función a puntos de corte.

Nro. Observaciones	cELISA Positivo (%PI)	FPA Positivo (mP)	Nro. Observaciones	cELISA Positivo (%PI)	FPA Positivo (mP)	Nro. Observaciones	cELISA Positivo (%PI)	FPA Positivo (mP)
1	78,21	169,4	26	31,41	99,8	51	38,61	233,0
2	46,89	258,1	27	39,22	93,4	52	48,81	90,7
3	39,76	226,7	28	41,26	119	53	38,64	141,3
4	86,21	148,1	29	37,61	150,4	54	39,64	235,6
5	39,81	145	30	61,22	182	55	38,38	194,3
6	81,22	157,1	31	97,69	189,5	56	38,22	143,8
7	96,22	164,5	32	37,21	92,6	57	38,72	116,7
8	96,31	150,8	33	91,37	91,2	58	37,61	160,8
9	39,61	168,7	34	91,37	132,4	59	96,42	194,6
10	42,71	153,1	35	42,22	118,5	60	38,29	117,3
11	81,21	201,9	36	41,22	91,2	61	96,86	97,2
12	93,71	122,6	37	96,22	122,5	62	86,72	104,8
13	96,81	152,1	38	96,22	205,2	63	86,22	179,2
14	96,77	152,9	39	81,27	125,8	64	96,37	118,5
15	39,76	184,7	40	38,96	154,7	65	81,27	125,5
16	49,29	207,7	41	86,88	250,8	66	36,81	203,9
17	81,21	152,8	42	48,61	236,1	67	37,46	90,5
18	96,22	101,9	43	37,64	263,4	68	43,22	149,0
19	36,81	149,7	44	38,64	213,7	69	61,89	116,8
20	37,21	260,5	45	86,22	252,1	70	71,64	105,6
21	41,81	246,7	46	42,31	181,1	71	96,86	213,8
22	37,81	167,0	47	38,61	200,6	72	43,61	119,7
23	96,22	207,0	48	38,61	110,1	73	41,89	154,6
24	39,61	253,7	49	37,61	136,8	74	76,83	199,7
25	34,22	92,1	50	38,22	211,6	75	61,22	123,9
						76	96,21	252,1
						77	41,63	181,1

cELISA: Prueba ELISA competitivo; %PI: Porcentaje de inhibición; FPA: Prueba de Fluorescencia Polarizada; mP: mili-polarización.

Tabla 4
Resultados negativos para cELISA y negativos para FPA en función a puntos de corte.

Nro. Observaciones	cELISA Negativo (%PI)	FPA Negativo (mP)
1	29,72	83,0
2	29,81	89,4
3	21,22	70,8
4	19,36	84,0
5	29,41	84,2
6	29,98	39,9

cELISA: Prueba ELISA competitivo; %PI: Porcentaje de inhibición; FPA: Prueba de Fluorescencia Polarizada; mP: mili-polarización.

Tabla 5
Resultados positivos para cELISA y
negativos para FPA en función a puntos
de corte.

Nro. Observaciones	cELISA	FPA
	Positivo (%PI)	Negativo (mP)
1	37,6	89,7
2	37,8	83,8
3	38,2	87,2
4	37,8	85,4
5	42,4	73,3
6	39,2	75,8
7	36,2	67,5
8	41,4	88,4
9	31,6	86,9
10	31,6	84,4
11	31,6	88

cELISA: Prueba ELISA competitivo; %PI: Porcentaje de inhibición; FPA: Prueba de Fluorescencia Polarizada; mP: mili-polarización.

la vacuna S19, así como a reacciones cruzadas con otro tipo de bacterias que presentan como epitope dominante la cadena O del Lipopolisacárido, como lo menciona Nielsen (19). Esto denota la ventaja que tiene la prueba Rosa de Bengala (RB), para el diagnóstico tamiz de animales, por ser una prueba fácil y económica (19), así como también la necesidad de utilizar otra prueba diagnóstica más específica para el diagnóstico confirmatorio de brucelosis. Bajo esta realidad se pueden considerar como pruebas confirmatorias las pruebas cELISA y FPA que son pruebas altamente específicas, y permiten discriminar entre animales vacunados con S19 de aquellos naturalmente infectados (3, 13, 21). Las 11 muestras que fueron positivas a cELISA pero resultaron negativas a FPA. Esto imputado a que cELISA permite discriminar entre animales vacunados con S19 de aquellos infectados, pero estos resultados positivos se puede asociar a estados de vacunación previo el muestreo como lo menciona Nilesen et al. (15) o infecciones tempranas donde el cELISA presenta mejoras características de sensibilidad que el FPA, como lo describe Konstantinidis et al. (7).

La moderada concordancia entre la prueba cELISA y FPA, puede atribuirse al alto número de resultados negativos y al tamaño de la muestra de resultados positivos.

A pesar de ello es importante mencionar que considerando el resultado de los rangos del índice Kappa con un IC de 95% este puede llegar a valores 0,765, que se asemeja a estudios similares donde se comparan estas dos pruebas y se muestran valores de concordancia superiores a 0,81 denotando una concordancia casi perfecta, así como también la no existencia de diferencias estadísticas entre las dos pruebas, tal como lo demostraron Nicola et al. (14); Rojas et al. (24); y Nielsen et al. (20).

Conclusiones

Tomando como referencia los resultados presentados, así como resultados de otras investigaciones realizadas a nivel internacional la prueba de Fluorescencia Polarizada (FPA) puede ser considerada como prueba confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis bovina en la provincia del Carchi-Ecuador, por ser una prueba simple y rápida, que puede ser realizada prácticamente en cualquier lugar.

Agradecimientos

Nosotros, agradecemos a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, por el aporte realizado para la consecución de este importante trabajo de investigación.

Referencias bibliograficas

1. Acha P. & Szyfres B. 2001. *Brucellosis*. In: *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. Pan American Health Organization, Editor. Washington, p. 40-65.
2. Dajer A., Luna-Martinez E., Zapata D., Villegas S., Gutierrez E., Peña G., Gurría F., Nielsen K. & Gall D., 1999, Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Prev. Vet. Med.*, **40**, 67-73.
3. Gall D. & Nielsen K., 2004, Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **23**, 3, 989-1002.
4. Garcia Carrillo C., 1990, Animal and Human Brucellosis in the Americas. *Office International des Epizooties. OIE*.
5. Gobierno Provincial del Carchi GPC, 2013, "Carchi-Prioridades para el Desarrollo - Agenda 2013-2020", GPC, Carchi, Ecuador.
6. Ibarra M., Benavides H., Salgado R., Gutiérrez M., García J., Peña J., Herrera D., Mina J., Campos M. & Puga B., 2017, Determining a Diagnostic Cut-Off on Fluorescence Polarization Assay (FPA) for Bovine Brucellosis in Carchi, Ecuador. *OJAS*, **7**, 425-432.
7. Konstantinidis A., Minas A., Pournaras S., Kansouzidou A., Papastergiu P., Maniatis A., Stathatis N. & Hadjichristodoulou C., 2007, Evaluation and comparison of fluorescence polarization assay with three of the currently used serological tests in diagnosis of human brucellosis. *E. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **26**, 715-721.
8. Landis J. & Koch G., 1977, The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, **33**, 159-74.
9. López de Ullibarri I, Pita S., 1999, Medidas de concordancia: el coeficiente kappa. *Cad. Aten. Primaria*, **6**, 169-71.
10. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria. MAG-SESA, 1999, *Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuador*, MAG-SESA, Ecuador.
11. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), 2009, *Programa Nacional de Control de la brucelosis Bovina*, MAG-AGROCALIDAD, Ecuador.
12. Marcin Weiner, Wojciech Iwaniak, Jolanta Zlotnicka, and Krzysztof Szulowski. 2010, Diagnosis of bovine brucellosis using traditional serological techniques and fluorescence polarisation assay. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, **54**, 485-488.
13. Muñoz C., Marín D., Monreal D., González B., Garin-Bastuji R., Díaz R., Mainar-Jaime I., Moriyón and Blasco J. M., 2005, Efficacy of Several Serological Tests and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunol.*, **12**, 1, 141-151.
14. Nicola AM., Elena S., Alonso B. & Esteves Madero J., 2010, Evaluation of the Fluorescence Polarization Assay (FPA) for Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection of Goats in Argentina. *Sec. Biol. Med. Sci.*, **31**, 1, 133-143.
15. Nielsen K., Kelly L., Gall D., Nicoletti P., Kelly W., 1995, Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**, 285-291
16. Nielsen K., Gall D., Jolley M., Leishman G., Balsevicius S., Smith P., Nicoletti P. & Tho., 1996, A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, **195**, 161-168.
17. Nielsen K., Gall D., Lin M. & Massangill C., 1998, Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **66**, 3 21-329.
18. Nielsen K. & Gall D., 2001, Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: A review. *J. Immunoassay Immunochem.*, **22**, 183-201.
19. Nielsen K., 2002, Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiology*, **90**, 447-459.
20. Nielsen K., Gall D., Bermudez R., Renteria T., Moreno F., Corral A., Monroy O., Monge F. & Smith P., 2002, Field Trial of the Brucellosis Fluorescence Polarization Assay. *J. Immunoassay Immunochem.*, **23**, 3, 307-316.
21. Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. Chapter 2.1.4 .Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) [Internet]. París – Francia. OIE [update 2016 may; cited 2016 sep]. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
22. Perrett L., McGiven J., Brew S. & Stack J., 2010, Evaluation of Competitive ELISA for Detection of Antibodies to Brucella Infection in Domestic Animals. *CMJ*, **51**, 314-319.
23. Praud A., Durán-Ferrer M., Fretin D., Jaý M., O'Connor M., Stournara A., Tittarelli M., Travassos Dias I. & Garin-Bastuji B., 2016, Evaluation of three competitive ELISAs and a fluorescence polarisation assay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, **216**, 38-44.
24. Rojas X., Muñoz S., Otto B., Pérez B. & Nielsen K., 2014, Utilización de los test de Fluorescencia Polarizada (FP) y ELISA de Competencia (cELISA) en el diagnóstico de brucelosis de camélidos. *Arch. Med. Vet.*, **36**, 1.
25. Spickler, A., 2009. Brucellosis. Factsheet, *The Health Center for Food Security and Public Health*. URL <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>
- Smale M., Byerlee D. and Jayne T., 2011. Maize revolution in sub-Saharan Africa. Policy Research Working Paper 5659. Egerton University / WPS 40 - © Tegemeo Institute of Agricultural Policy & Development
26. SP/CONEDD., 2006. *Revue scientifique sur l'état de la dégradation des sols du Burkina Faso*. Étude réalisée dans le cadre du programme de gestion durable des terres, 106 p.
27. Wang X., Wang F., Chen B., Sun F., He W., Wen D., Liu X. and Wang Q., 2012. Comparing the health risk of toxic metals through vegetable consumption between industrial polluted and non-polluted fields in Shaoguan, south China. *J. Food Agr. Environ.*, **10**, 2, 943-948.
28. Wuana R.A. & Okieimen F.E., 2011, Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 10197-10228.

45. Youenou B., Hien E., Deredjian A., Brothier E., Favre-bonté S. and Nazaret S., 2016. Impact of untreated urban waste on the prevalence and antibiotic resistance profiles of human opportunistic pathogens in agricultural soils from Burkina Faso. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **23**, 25299-25311.
 46. Yu H. and Huang G.H., 2009. Effects of sodium acetate as a pH control amendment on the composting of food waste. *Bioresour. Technol.*, **100**, 2005-2011.
-

E.M. Ibarra Rosero, Ecuadorian, Msc., Teacher and Researcher, State Polytechnic University of Carchi, Tulcán - Ecuador.

H.R. Benavides Rosales, Ecuadorian, PhD Candidate, Teacher and Researcher, State Polytechnic University of Carchi, Tulcán - Ecuador.

D.N. Játiva Cortez, Ecuadorian, Student and research assistant, State Polytechnic University of Carchi, Tulcán - Ecuador.

Y.L. Fuertes Cevallos, Ecuadorian, Student and research assistant, State Polytechnic University of Carchi, Tulcán - Ecuador.

P.H. González Chavisnan, Ecuadorian, Student and research assistant, State Polytechnic University of Carchi, Tulcán - Ecuador.