

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Las pruebas de Fluorescencia Polarizada y ELISA-I poseen mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de Rosa de Bengala y Rivanol en el diagnóstico de brucelosis en bovinos Holstein.

Por:

MIGUEL ANGEL ONTIVEROS NIAVE

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Noviembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Las pruebas de Fluorescencia Polarizada y ELISA-I poseen mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de Rosa de Bengala y Rivanol en el diagnóstico de brucelosis en bovinos Holstein.

Por:

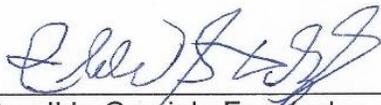
MIGUEL ANGEL ONTIVEROS NIAVE

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


Dra. Ilda Graciela Fernández García
Presidente


Dr. Gerardo Duarte Moreno
Vocal


MVZ. EPAB. Alma Taurina Luna De Anda
Vocal


Dr. José Moncebáez y Pérez
Vocal Suplente


MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Noviembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Las pruebas de Fluorescencia Polarizada y ELISA-I poseen mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de Rosa de Bengala y Rivanol en el diagnóstico de brucelosis en bovinos Holstein.

Por:

MIGUEL ANGEL ONTIVEROS NIAVE

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dra. Ilda Graciela Fernández García
Asesor Principal

Dr. Gerardo Duarte Moreno

Coasesor

MVZ. EPAB. Alma Taurina Luna De Anda

MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coasesor
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A los MVZ EPAB J. Jesús Quintero Cedeño y Alma Taurina Luna De Anda por haberme dado la oportunidad de aprender más en el laboratorio de diagnóstico y en el campo, por su apoyo y por permitirme ser parte de su proyecto para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ilda Graciela Fernández García por ser una excelente catedrática durante mi estancia en la UAAAN-UL, así como su gran apoyo y confianza para asesorarme en la realización de mi tesis.

Al Dr. Gerardo Duarte Moreno por haberme enseñado tanto durante la carrera y por ser parte de este proyecto.

A la MVZ Diana Elizabeth Salazar Nevárez por todo lo que aprendí con ella, por su amistad, por sus consejos y por su tiempo.

A los coaches, Federico Antonio Miñana del Castillo y Alejandro Gallegos Torres por su apoyo, la amistad que me brindaron y por ayudarme a ser mejor persona tanto académica como deportivamente.

A mi *Alma Mater* por todos los conocimientos adquiridos que han contribuido en mi formación profesional

DEDICATORIA

A mis padres, Andrea Niave Sánchez y Primitivo Ontiveros Salazar porque gracias a ellos, por su apoyo, dedicación y esfuerzo que me han brindado para que salga adelante y ahora esté a un paso de ser Médico Veterinario Zootecnista.

A la Dra. Ilda Graciela Fernández García por todo su esfuerzo, tiempo y dedicación que me brindó en mi formación académica y para obtener mi título profesional.

A los MVZ EPAB J. Jesús Quintero Cedeño y Alma Taurina Luna De Anda por ser parte de este proyecto y por su apoyo incondicional.

RESUMEN

La brucelosis bovina es una zoonosis causante de grandes pérdidas económicas debido principalmente a los abortos que se presentan en el último tercio de la gestación en las vacas. El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar que las pruebas de FPA y ELISA-I tienen una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de rosa de bengala y rivanol en el diagnóstico de la brucelosis en ganado bovino Holstein de la Comarca Lagunera. Se utilizaron sueros sanguíneos (n=30) de bovinos sospechosos a brucelosis en establos localizados en la Comarca Lagunera de México. Los sueros sanguíneos se analizaron con las pruebas rosa de bengala, rivanol, FPA y ELISA-I, determinando su sensibilidad y especificidad en cada prueba diagnóstica. Los resultados indicaron que las pruebas de rosa de bengala, rivanol y FPA mostraron sensibilidad del 100%, mientras que ELISA-I fue del 20%. En cuanto a la especificidad en las pruebas de rosa de bengala, rivanol y ELISA-I fue del 100%. En cambio, la especificidad en la prueba de FPA fue del 20%. Los resultados del presente estudio indican que la FPA y ELISA-I, no mostraron concordancia en la sensibilidad y especificidad. Se concluye que la prueba de FPA fue la que mostró una sensibilidad y especificidad semejante a las pruebas convencionales en el diagnóstico de brucelosis en bovinos lecheros Holstein de la Comarca Lagunera.

Palabras clave: *Brucella abortus*, Brucelosis, Rosa de bengala, Rivanol FPA, ELISA-I, Bovinos.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVO	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 Historia de la brucelosis.....	4
4.2 Transmisión	5
4.3 Etiología.....	6
4.4 Clasificación.....	8
4.5 Componentes de la membrana de la Brucella	9
4.5.1 Proteínas de la membrana externa (Omp):.....	9
4.5.2 Lipopolisacárido (LPS).....	9
4.6 Epidemiología.....	11
4.7 Respuesta inmune.....	11
4.7.1 Inmunógenos y antígenos.....	12
4.7.2 Inmunidad innata	12
4.7.3 Inmunidad humoral.....	13
4.7.4 Sistema de complemento.....	13
4.7.5 Inmunidad adaptativa.....	14
4.7.6 Inmunidad mediada por células (IMC)	14
4.7.7 Haptenos.....	15
4.8 Vacunación.....	16
4.8.1 Cepa 19 (S19).....	16
4.8.2 Cepa RB51	17
4.9 Diagnóstico de la brucelosis bovina	18
4.9.1 Rosa de Bengala, Tarjeta o Card Test	20
4.9.2 Rivanol.....	21
4.9.3 Fluorescencia polarizada (FPA).....	21
4.9.4 ELISA (Enzyme-Linked Inmunosorbent Assay)	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24

5.1	Área de estudio	24
5.2	Metodología	24
5.2.1	Muestreo sanguíneo	24
5.2.2	Características generales de la obtención y envío de muestras al laboratorio.....	25
5.2.3	Materiales	25
5.2.4	Toma de muestra sanguínea de la vena coccígea	26
5.3	Prueba de Rosa de Bengala	27
5.4	Prueba de Rivanol	28
5.5	Fluorescencia Polarizada	29
5.5.1	Lectura de muestras	30
5.6	ELISA-I	31
5.7	Análisis de datos	32
5.7.1	Variables a determinar.....	32
5.7.2	Clasificación de la prueba diagnóstica	33
6.	RESULTADOS	34
7.	DISCUSIÓN	35
8.	CONCLUSIONES.....	38
9.	LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas indirectas en el diagnóstico de la brucelosis del ganado bovino.	19
Cuadro 2. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.....	33
Cuadro 3. Comparación de resultados obtenidos en el diagnóstico de brucelosis mediante las pruebas rosa de bengala, rivanol, fluorescencia polarizada y ELISA-I en muestras de suero de bovinos de la Comarca Lagunera.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo propuesto de la membrana externa de <i>Brucella</i> : 1) Hapteno nativo (AN), 2) lípido de ornitina (LO), 3) lipopolisacárido (LPS), 4) hapteno ligado (AN-L), 5) ácido 3-deoxy-d-nanno octulosónico (Kdo) 6) proteínas de membrana externa tipo 3 (OMP3), 7) fosfatidilcolina (PC), 8) lipoproteína (LP), 9) ácido graso saturado con cadena alifática de 30 carbonos con OH en carbono 28, OH-C 28: O.....	7
Figura 2. Estructura externa de <i>B. abortus</i> con el Lipopolisacárido exhibiendo el lípido A, el oligosacárido intermedio y el polisacárido O.....	10

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una zoonosis causante de grandes pérdidas económicas debido principalmente a los abortos que se presentan en el último tercio de la gestación. Así como, por disminución en la producción de leche, por el desecho de animales, por el nacimiento de becerras débiles que son aparentemente normales y son positivas a *Brucella abortus* (*B. abortus*, Carrisoza *et al.*, 2014).

A nivel mundial la brucelosis es una de las enfermedades más importantes, aunque actualmente no es considerada como prioridad en los sistemas de salud nacional e internacional en diversas regiones endémicas del mundo, siendo considerada como una zoonosis profesional que no es atendida (Adone y Pasquali, 2013). En América Latina, México es uno de los principales países ganaderos con mayor prevalencia de brucelosis, en particular en aquellas especies como son los bovinos, ovinos y caprinos (López *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 2014).

México cuenta con 24, 163 350 cabezas de ganado bovino adulto (INEGI, 2017). En particular la Comarca Lagunera tiene una población de bovinos productores de leche de 464,086 del cual 227,142 son vacas Holstein en producción (SIAP, SAGARPA 2015).

La Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 fue publicada el 8 de septiembre de 1995 en el Diario Oficial de la Federación (DOF), donde la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales definió como objetivo establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas para el control y eventual erradicación de la brucelosis en las especies susceptibles

en todo el territorio nacional. La norma establece tres pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de la brucelosis que son la prueba rosa de bengala, prueba de rivanol y la prueba de fijación de complemento, donde las pruebas: rosa de bengala y fijación de complemento son las recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Sin embargo, estudios previos han demostrado que el ELISA-I (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), el ELISA por Competencia (ELISA-C), y la fluorescencia polarizada (FPA) son nuevos procedimientos que actualmente son los más utilizados en el diagnóstico de la brucelosis debido a su alta sensibilidad y especificidad (Muñoz *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2010; OIE, 2016). En el presente trabajo de investigación se utilizó el ELISA-I como prueba en el diagnóstico de brucelosis en bovinos, y se usó el antígeno hapteno nativo (HN) en el procedimiento.

A pesar de la campaña contra brucelosis se lleva a cabo actualmente por el Comité de Erradicación de la Brucelosis en la Comarca Lagunera, no hay información disponible en relación a qué porcentaje o cuántas vacas Holstein son diagnosticadas positivas a brucelosis bovina.

El presente trabajo de investigación fue diseñado para determinar que las pruebas de FPA, y ELISA-I tienen una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de rosa de bengala y rivanol en el diagnóstico de la brucelosis en ganado bovino Holstein de la Comarca Lagunera.

2. HIPÓTESIS

Las pruebas de FPA y el ELISA-I poseen mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de rosa de bengala y rivanol en el diagnóstico de la brucelosis en ganado bovino Holstein.

3. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar que las pruebas de FPA y ELISA-I tienen una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de rosa de bengala y rivanol en el diagnóstico de la brucelosis en ganado bovino Holstein.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

La brucelosis bovina es una enfermedad causada por *B. abortus*, que ocasiona pérdidas significativas en la producción pecuaria debido a los abortos en el último tercio de gestación, por la metritis, la infertilidad y por el nacimiento de animales débiles. Además, es causante de grandes pérdidas económicas en la industria pecuaria debido al incremento en los costos de producción de leche (Estein, 2006; Peña *et al.*, 2014).

La brucelosis se encuentra ubicada en el Grupo 2, según el listado de enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos el cual fue publicado en el Diario Oficial de la Federación el 21 de septiembre de 1994 (DOF, 2018).

4.1 Historia de la brucelosis

La brucelosis en humanos fue denominada inicialmente como *fiebre ondulante* debido al incremento en la temperatura en las personas afectadas. En estas personas la temperatura corporal se incrementaba al atardecer, superando los 40°C. En 1810, un médico de la armada británica, Sir William Burnett fue el primero en diferenciar varios tipos de fiebre que afectaban a los marinos en el Mediterráneo. Mientras que Martson en 1859 describió la brucelosis en la isla de Malta que se ubica en el mar Mediterráneo a partir de relatar sus propios padecimientos, donde sufrió fiebre irregular en un lapso comprendido entre los 30 y 90 días, síntomas gastrointestinales, dolores articulares y musculares. En esa isla se presentó una epidemia que era conocida como *fiebre del Mediterráneo*, también se le conoció como *fiebre del Peñón de Gibraltar*, *fiebre*

del Danubio, fiebre de Chipre y fiebre de Malta entre la población civil, así como, en los miembros de la armada británica donde destacaba la isla por algunos casos fatales (Margni, 2006; Merchant y Packer, 1975; Rodríguez *et al.*, 2005; Stanchi *et al.*, 2007).

Sir David Bruce logró el aislamiento de una bacteria, que denominó *Micrococcus melitensis* a partir del bazo de un soldado británico muerto por la enfermedad en 1887. Posteriormente, en 1905, Horrocks demostró la presencia de *Micrococcus melitensis* en leche de cabras consumida por personas donde se contraía la enfermedad. De manera independiente, en Dinamarca, Bang en 1897 aisló una bacteria en vacas que se asoció con abortos y se denominó *Bacterium abortus*, en aquellos años se le conocía como *enfermedad de Bang*. También Bang encontró que ese microorganismo afectaba a caballos, ovejas y cabras. Por su parte Evans en 1918 comprobó las estrechas relaciones morfológicas, fisiológicas y serológicas existentes entre *B. abortus* y *Brucella melitensis* (*B. melitensis*), pero demostró que la reacción de absorción de aglutininas permitió, hasta cierto punto, la diferenciación. Fue en 1920 cuando Meyer y Shaw propusieron la creación del género *Brucella*, para denominar a los organismos que provocan fiebre y de brucelosis para designar a la enfermedad (Margni 2006; Álvarez *et al.*, 2015).

4.2 Transmisión

Los fluidos vaginales, membranas fetales, leche, fetos, terneros recién nacidos y demás material contaminado expulsado por la vaca recién parida e infectada por *B. abortus* transmite de forma horizontal a otros bovinos durante el

post-parto, o en el post-aborto que ocurre en el 5° mes de gestación. Después de producirse el aborto en la vaca, se excretan grandes cantidades de la bacteria en los líquidos fetales durante un periodo de 2 a 4 semanas. La infección en el feto es por vía vertical siendo en el interior del útero a través de la deglución del líquido amniótico. En los toros, las vesículas seminales, ampollas deferentes, testículos y los epidídimos son estructuras diana para la infección (Rodríguez, 2005; Querol, 2011). La transmisión también puede realizarse por ingestión, por vía cutánea, o por medio de las membranas mucosas, ocular, digestiva, oronasal, respiratoria y genital (Querol, 2011). Los carnívoros pueden ser portadores de la bacteria, en algunas especies se produce la infección, mientras que en otras se deposita en la materia fecal, y posteriormente contaminan los alimentos (Quinn y Markey, 2003).

La *Brucella spp.* en humanos afecta particularmente a individuos que consumen productos lácteos sin pasteurizar, a trabajadores de rastros, a Médicos Veterinarios, a granjeros, y a personas que manejan rutinas de laboratorio donde hay animales susceptibles. Como se mencionó anteriormente, la brucelosis provoca fiebre ondulante, así como, endocarditis, artritis y osteomielitis (Stevens *et al.*, 1994; Padilla *et al.*, 2010).

4.3 Etiología

El microorganismo bacterial causante de la enfermedad es del género *Brucella spp.*, siendo un cocobacilo intracelular, gram-negativo, aerobio estricto, inmóvil, sin cápsula y no esporulado que es patógeno para los animales domésticos y los humanos (Weiner *et al.*, 2010). Estas bacterias poseen

metabolismo de tipo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares (Castro *et al.*, 2005). Poseen envoltura celular formada por membrana externa, membrana interna y un espacio periplasmático intermedio. Éste contiene algunas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos, además posee un gel glucopéptico denominado péptidoglucano responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) que es considerado el principal antígeno (Stanchi *y et al.*, 2007).

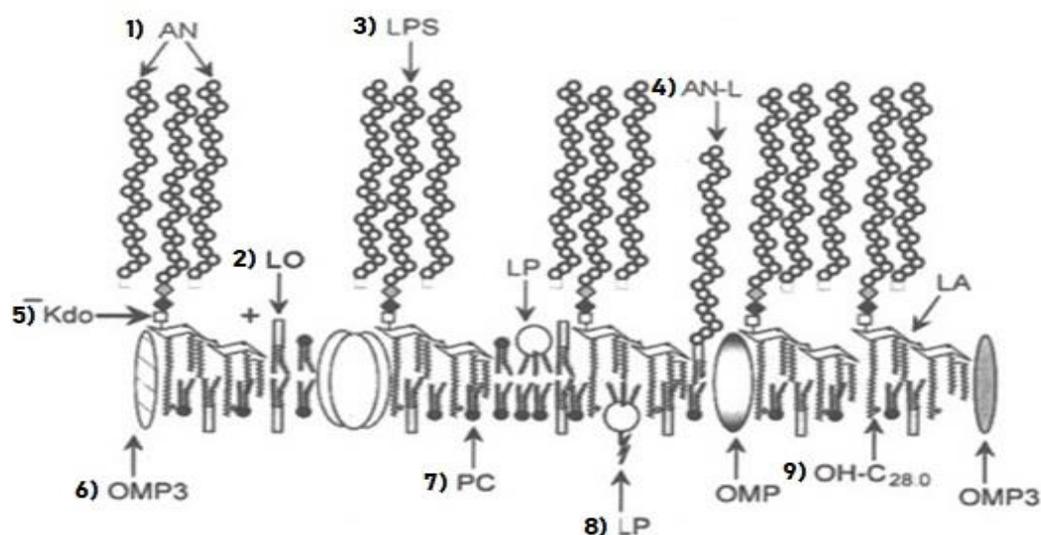


Figura 1. Modelo propuesto de la membrana externa de *Brucella*: 1) Hapteno nativo (AN), 2) lípidos de ornitina (LO), 3) lipopolisacárido (LPS), 4) hapteno ligado (AN-L), 5) ácido 3-deoxy-d-nanno octulosónico (Kdo) 6) proteínas de membrana externa tipo 3 (OMP3), 7) fosfatidilcolina (PC), 8) lipoproteína (LP), 9) ácido graso saturado con cadena alifática de 30 carbonos con OH en carbono 28, OH-C 28:0. Tomado de Freer *et al* (1996).

4.4 Clasificación

Las especies conocidas de la bacteria se diferencian por su hospedador natural preferido, su forma de utilización de los sustratos de aminoácidos y carbohidratos, y por su susceptibilidad a la lisis en las células fagocíticas de *Brucella*. Se reconocen 5 especies dentro del género *Brucella*: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. suis* (porcinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos). Ésta clasificación está principalmente basada en las diferencias encontradas en su patogenicidad, así como, en el hospedador. Las cepas se clasifican en lisas y rugosas por su apariencia morfológica; *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* pertenecen a las cepas lisas (S), y *B. ovis* y *B. canis*, a las cepas rugosas (R; Fernández *et al.*, 1982; Castro *et al.*, 2005; Rodríguez, 2005; Méndez *et al.*, 2015). En general los rumiantes son susceptibles a *B. abortus*, lo cual tiene mayor relevancia en zonas donde se practican programas de erradicación. También los búfalos, camélidos, cévidos, caprinos y ovinos son muy susceptibles a la infección. Las especies clásicas de *Brucella* han sido aisladas en una gran variedad de fauna silvestre como el bisonte, alce, cerdos salvajes, jabalí, zorro, liebre, búfalo africano, reno, y el caribú (Godfroid *et al.*, 2010; Díaz, 2013).

Todas las especies del género *Brucella* pueden sobrevivir y multiplicarse en una gran variedad de tipos celulares, inclusive fagocitos polimorfonucleares y mononucleares en animales susceptibles. La *Brucella* es una bacteria quimio-organotrófica que tiene predilección por el útero, el aborto espontáneo ocurre probablemente por la liberación de la endotoxina de la *Brucella* en la placenta al momento de la replicación de la bacteria a niveles altos en el tejido uterino

(Rodríguez, 2005). Este alto nivel de bacterias es el resultado de la presencia de un factor de crecimiento estimulador en los tejidos fetales, el cual posteriormente fue identificado como el azúcar eritriol (Petersen *et al.*, 2013). Las especies de *Brucella* utilizan el eritriol en los tejidos como fuente de energía, encontrándose también en los cotiledones de la placenta, tejido mamario, órganos reproductivos del macho, el sistema retículo-endotelial, articulaciones y huesos (Rodríguez, 2005; Petersen *et al.*, 2013).

4.5 Componentes de la membrana de la Brucella

4.5.1 Proteínas de la membrana externa (Omp):

Las proteínas de la membrana externa se encuentran en estrecha asociación con los LPS y algunas se encuentran fuertemente unidas al lípido A. De acuerdo con su peso molecular estas proteínas se dividen en 3 grupos, que son: grupo 1, proteínas de peso molecular de entre 89 y 94 kDa (kiloDalton); grupo 2, con peso molecular comprendido entre 35 y 40 kDa, y el grupo 3, con pesos moleculares entre 25 y 30 kDa. Las proteínas de los grupos 2 y 3 son conocidas como Omp mayores, mientras que las del grupo 1 se denominan Omp menores (Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006; Álvarez *et al.*, 2015).

4.5.2 Lipopolisacárido (LPS)

El LPS de la *B. abortus* está constituido por 3 regiones: el lípido A, el oligosacárido intermedio (núcleo o “core”) y el polisacárido O, también conocido como cadena O (PSO; Rojas *et al.*, 1994; Urmeneta *et al.*, 1998; Álvarez *et al.*, 2015). El LPS es la molécula mayor de la superficie celular siendo de particular importancia diagnóstica, ya que la mayoría de los anticuerpos poseen afinidad

sobre el LPS dirigiéndose hacia éste para producir una respuesta medible (Urmeneta *et al.*, 1988; Adone y Pasquali, 2013).

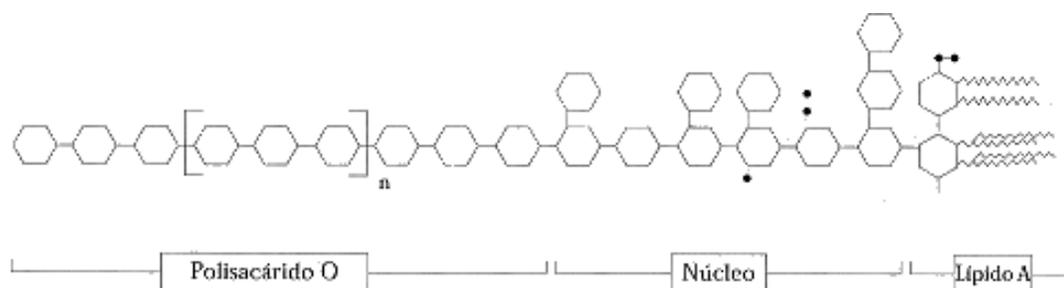


Figura 2. Estructura externa de *B. abortus* con el Lipopolisacárido exhibiendo el lípido A, el oligosacárido intermedio y el poliacárido O. Tomado de Freer y Castro (2001).

Se sabe que la *Brucella* contiene otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), químicamente idéntico al PSO el cual no está unido al núcleo (Urmeneta *et al.*, 1988; Urmeneta *et al.*, 1998; Álvarez *et al.*, 2015). Además, se ha descrito un tercer polisacárido conocido como poly B; se hace mención que para algunos autores este polisacárido es químicamente equivalente al HN, aunque el poly B es un polisacárido que ha sido aislado solamente de la cepa *B. melitensis* B115 (Fernández *et al.*, 1982; Aragón *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2015).

En pruebas de laboratorio la prueba serológica puede mostrar reacciones inmunológicas cruzadas con otras bacterias como son la *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Salmonella godesburg*, *Escherichia coli* O:1577h7 y *Pseudomonas maltophilia* 555. Esa carga antigénica se debe a la similitud de las cadenas de PSO. Estudios realizados por Díaz *et al.* (1974), reportan que en agua de fenol conteniendo extractos de *Yersinia enterocolitica* 0:9

puede remover los precipitados del HN y poly B en sueros de ganado infectado con *B. abortus*. Estos resultados sugieren que *Yersinia enterocolitica* 0:9 podría contener algún determinante antigénico similar al del HN y al poly B (Fernández *et al.*, 1982; Urmeneta *et al.*, 1998; Adone y Pasquali, 2013; OIE, 2016).

4.6 Epidemiología

La brucelosis bovina es una zoonosis global, siendo la más frecuente a pesar de la vacunación masiva. A nivel mundial las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, al oeste de Asia, en algunas zonas de África y en toda América Latina, principalmente en México, Brasil y Colombia. En varios países de Sudamérica la enfermedad se encuentra en forma endémica, por lo que representa un problema sanitario de consideración (Rodríguez *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2014).

En México la brucelosis es considerada como una de las zoonosis más importantes. A partir de 1905 ha causado grandes pérdidas a la ganadería y es uno de los problemas de mayor relevancia en salud pública (Aguilar *et al.*, 2011; Martínez y *col.*, 2011). La brucelosis está extensamente distribuida en todo el territorio nacional, desde el sureste con la más alta incidencia, le sigue el área central como el estado de México, Querétaro, Guerrero, Hidalgo y Michoacán (Herrera *et al.*, 2010).

4.7 Respuesta inmune

La respuesta del hospedador a la infección por *Brucella* es variable ya que influyen varios factores: 1) en el hospedador: edad, sexo, estado reproductivo (gestante o no), estado inmunológico (exposición previa, vacunación), y 2) el

agente infectante: dosis y virulencia de la cepa (Stanchi *et al.*, 2007). La *Brucella* en el bovino induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el sistema de complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos (Castro *et al.*, 2005).

4.7.1 Inmunógenos y antígenos

Los antígenos son sustancias que reaccionan con los anticuerpos mediante receptores específicos de antígenos denominados receptores de la célula T (TCRs) que se encuentran en los linfocitos T. La mayoría de los antígenos son inmunógenos, esto es, sustancias que inducen una respuesta inmunitaria. Todos los inmunógenos tienen en común ciertas propiedades como el peso molecular, el tamaño, complejidad espacial y la forma (Merchant y Packer, 1975; Madigan *et al.*, 2006).

4.7.2 Inmunidad innata

Los mecanismos de la inmunidad innata son los primeros en activarse ante la entrada de los agentes infecciosos. Este tipo de inmunidad reduce el número inicial de bacterias y prepara el ambiente para la activación de los mecanismos de la inmunidad adaptativa (Estein, 2006). Los neutrófilos son las células que participan en la inmunidad innata y que establece contacto con la *Brucella*. La opsonización (recubrimiento) de las bacterias por los anticuerpos y por el sistema de complemento facilita la fagocitosis; sin embargo, para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la liberación de enzimas por los neutrófilos, como la mieloperoxidasa. La *Brucella* como bacteria intracelular

posee mecanismos que inhiben dicha actividad enzimática evitando su destrucción. Otra de las células blanco en la infección *Brucella* es el macrófago, estas células realizan trabajo de fagocitosis y son células presentadoras de antígenos (CPA), poseen alta capacidad de modular el sistema inmune mediante la secreción de citoquinas (Saldarriaga y Rugeles, 2002; Castro *et al.*, 2005).

4.7.3 Inmunidad humoral

Se caracteriza por una producción inicial de la inmunoglobulina M (IgM) y la inmunoglobulina G (IgG), que son anticuerpos específicos a antígenos de *Brucella*. La IgM es la primera línea de defensa ante la infección y está activa por semanas o meses, cuando inicia su disminución se incrementan las IgG (de la cual derivan los subisotipos IgG1 e IgG2), manteniéndose en el plasma en bajas cantidades por meses o años. La infección crónica de la *Brucella* en el bovino realiza síntesis prolongada de anticuerpos IgG1. Aunque los niveles de anticuerpos IgG2 pueden variar de acuerdo con el individuo, mientras que la IgG1 disminuye en la fecha próxima al parto, lo cual se debe a producción de calostro propio de esta IgG1 en el ganado bovino. En la leche de los animales infectados pueden aparecer la IgG1, así como, las IgM e IgA (Smits *et al.*, 2003; Estein, 2006).

4.7.4 Sistema de complemento

El sistema de complemento tiene un papel importante en la defensa contra la *Brucella*, el sistema de complemento se encuentra en el compartimiento extracelular. Estudios realizados en bovinos indican que *B. abortus* puede ser destruida por el sistema de complemento en ausencia de anticuerpos

específicos, o en suero sanguíneo en etapas tempranas de la infección (Fernández *et al.*, 2001; Estein, 2006). La activación de la vía clásica del sistema de complemento puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana; sin embargo, el LPS de *Brucella* se caracteriza por ser un activador del sistema de complemento más débil que el LPS de las enterobacterias, por ello hay mayor resistencia de la *B. abortus* a los componentes del sistema de complemento (Orduña *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2005).

4.7.5 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa involucra una respuesta donde participan 3 mecanismos que actúan en diferentes etapas durante la infección: 1) generación de una respuesta humoral con producción de anticuerpos, 2) activación de la función bactericida de los macrófagos por acción del interferón gamma (IFN- γ) el cual es producido por linfocitos TCD4+ y TCD8+, y 3) la lisis de células blanco por linfocitos T CD8+ (Estein, 2006; Stanchi *et al.*, 2007).

4.7.6 Inmunidad mediada por células (IMC)

El ingreso de la bacteria al macrófago se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS. Esta interacción induce también la producción de interleucina 12 (IL-12) que estimula a las células natural killer (NK) y a los linfocitos T CD4+ llamados colaboradores o *helper*, que secretan IFN- γ , favoreciendo el desarrollo de la respuesta inmune predominante mediada por el linfocito T CD4+ tipo 1. Este subgrupo de linfocitos T estimulan principalmente la respuesta de tipo celular y participa en forma directa en la protección contra

microorganismos intracelulares, el alto número de citoquinas que participan son IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, TNF- α (factor de necrosis tumoral), y sobre todo el IFN- γ , el cual es esencial para la activación de macrófagos. La IL-1, IL-12, y el TNF- α participan en las etapas tempranas de la infección y son capaces de activar las células NK que, aunque tienen actividad inespecífica, contribuyen con los linfocitos T siendo capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas por la *Brucella*. Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro del macrófago y sus péptidos están asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) clase I y II, que son presentados a los linfocitos TCD4+ y linfocitos T CD8+ citotóxicos, que destruyen macrófagos y otras células infectadas con *Brucella*. El LPS es considerado un antígeno independiente que es capaz de activar a los linfocitos B sin la participación de los linfocitos TCD4+ (Saldarriaga y Rugeles, 2002; Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006).

4.7.7 Haptenos

Las bacterias, células nucleadas y eritrocitos, son microorganismos con mezclas complejas de proteínas, glucoproteínas y nucleoproteínas. Estos microorganismos tienen regiones específicas frente a las que se dirigen las respuestas inmunes las cuales se ubican en su superficie denominándose epítomos o determinantes antigénicos. Las moléculas pequeñas, denominadas haptenos, pueden funcionar como epítomos solo cuando están ligados a moléculas grandes. Cuando el hapteno se asocia a una proteína grande portadora (carrier), son unos inmunógenos más eficaces, pero este hapteno es incapaz de inducir la respuesta inmune si no se une a una molécula portadora,

aunque si es capaz de reaccionar con las células de la respuesta inmune generando una variedad extremadamente grande de anticuerpos (Biberstein y Chung, 1994; Tizard, 2009).

4.8 Vacunación

Las vacunas que se han utilizado en los últimos años para el control de la brucelosis bovina son la vacuna de la cepa 19 (S19) de *B. abortus* y la vacuna RB51 (Martínez y *et al.*, 2011). En México se utiliza la cepa de *B. abortus* S19, utilizando exitosamente la dosis reducida en vacas adultas. Esta vacuna induce una protección efectiva en el ganado, y no ocasiona abortos en más del 1 % de los animales vacunados (Bustamante *et al.*, 2000; González *et al.*, 2006).

4.8.1 Cepa 19 (S19)

La cepa 19 fue aislada como cepa virulenta por Buck (1930), a partir de leche de vaca. La bacteria es incapaz de crecer en presencia de eritriol, por que ha perdido entre sus loci el gen *Eri* que le sirve para codificar la enzima necesaria para su utilización. Esta vacuna es de baja patogenicidad posee alta inmunogenicidad y buena antigenicidad (Martínez *et al.*, 2011). La administración de la vacuna S19 en vacas jóvenes es generalmente entre los 3-8 meses de edad. De esta manera los anticuerpos post-vacunales evitarán problemas en el diagnóstico de brucelosis, en los bovinos adultos (Padilla *et al.*, 2010).

Una de las principales desventajas de la cepa S19 de *B. abortus* es el desarrollo de anticuerpos post-vacunales que interfieren con la interpretación de las pruebas serológicas. Por tanto, no es recomendable realizar la vacunación simultánea con el diagnóstico serológico de brucelosis bovina (Palmer y Douglas,

1989; Bustamante *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2006; Padilla *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011).

Asimismo, se destaca que, aunque se trata de una cepa vacunal, la S19 es una cepa viva atenuada de *B. abortus* capaz de causar enfermedad. Estudios previos han demostrado que la S19 puede ser excretada en la leche de las vacas vacunadas. También se ha observado que la excreción de la S19 es por un tiempo máximo de 1 año (Martínez *et al.*, 2006).

4.8.2 Cepa RB51

La cepa RB51 es un mutante rugoso estable que induce buena protección contra la brucelosis bovina sin estimular una respuesta serológica detectable en los programas convencionales de vigilancia de la brucelosis. El descubrimiento de la vacuna RB51 representó la posibilidad de agregar un arma más al difícil combate contra esta enfermedad (Schurig, 2001). La cepa RB51 se desarrolló a principios de la década de los 80's en los EE.UU. Una vez desarrollada, los estudios indicaron que: 1) la cepa tiene la capacidad de proteger a los animales contra la infección con *B. abortus*, 2) no induce respuestas serológicas que interfieren con el diagnóstico de la enfermedad, incluso cuando se aplicaba múltiples veces a los animales, 3) es más atenuada que la S19, y 4) es estable, lo cual no regresó a las formas más virulentas, incluso cuando se hicieron pasajes de un animal a otro (Quinn y Markey, 2003). Un estudio mostró los beneficios económicos que se obtuvieron con su uso en el United States Department of Agriculture (USDA) decidiéndose optar por la vacuna como oficial en marzo de 1996 en los EE.UU., prohibiendo el uso de la cepa S19 así como se recomienda

la no revacunación si se vacuna primeramente con S19 en terneras, a menos que sean establos que van a cambiar a vacunación con cepa RB51. También se recomendó vacunar a las vacas adultas que fueron vacunadas como terneras con la S19, y luego continuar el programa vacunando todas las terneras nuevas con la cepa RB51 seguido de revacunación entre los 12-16 meses con esa cepa, para revacunar cada 2 años (Schurig, 2001).

4.9 Diagnóstico de la brucelosis bovina

Aunque el aislamiento de *Brucella* a partir de tejidos o fluidos corporales es la prueba más certera en el diagnóstico de la enfermedad, indicando que el animal está infectado; la serología es el recurso más utilizado en el diagnóstico de la brucelosis, y se basa por lo general en las pruebas convencionales como rosa de bengala y rivanol (Martínez *et al.*, 2011). El primer trabajo publicado sobre el diagnóstico de brucelosis utilizando una prueba de aglutinación fue por Wright y Smith (1897). Desde entonces, el diagnóstico de brucelosis se ha logrado utilizando varias pruebas cada una con cierta habilidad para detectar anticuerpos de *B. abortus* y como consecuencia, su sensibilidad y especificidad (Gall *et al.*, 2000; Padilla *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas indirectas en el diagnóstico de la brucelosis del ganado bovino.

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Rosa de Bengala	100	86
ELISA-I	97.2	97.1-99.8
ELISA-C	95.2	99.7
FPA	96.6	99.1

ELISA-I: ELISA Indirecto, ELISA-C: ELISA por Competencia, FPA: Fluorescencia Polarizada. Modificado de Godfroid *et al* (2010).

El diagnóstico de brucelosis generalmente se realiza mediante la combinación de varias pruebas. Una sola técnica para llevar a cabo un diagnóstico definitivo aún no está disponible. Las pruebas convencionales y otras pruebas serológicas miden la respuesta entre los anticuerpos y el antígeno del PSO, basándose en el resultado de 2 o más pruebas (Stevens *et al.*, 1994; *et al.*, 2000; Padilla *et al.*, 2010; Adone y Pasquali, 2013; Álvarez *et al.*, 2015).

La semejanza antigénica, sobre todo a nivel del LPS, entre las vacunas y las cepas infecciosas explica en parte las respuestas séricas similares provocadas en el animal a la vacunación o por una infección. Frecuentemente es difícil saber si un resultado positivo en alguna prueba se debe a la infección o a la vacunación con la cepa S19, complicando la diferenciación por serología entre los animales infectados y los sanos vacunados, produciendo resultados falsos positivos. Es por ello que los parámetros a considerar respecto al desempeño de una prueba serológica son la detección del mayor número posible de animales infectados, la sensibilidad, y la diferenciación entre infectados y vacunados sanos que

presentan como positivos, siendo la especificidad (Muñoz *et al.*, 2005; Stanchi *et al.*, 2007). Estudios previos han demostrado que el ELISA-I, ELISA-C, y la FPA podrían ser los más utilizados como nuevos procedimientos de las pruebas por su alta sensibilidad y especificidad, con ello se mejoraría significativamente el diagnóstico de la brucelosis. A pesar de su alta sensibilidad, el ELISA-I tiene una relativa ausencia de especificidad, y una interferencia que podría surgir con los anticuerpos de reacción cruzada. Esta desventaja es superada en gran medida con el desarrollo del ELISA-C y la FPA, ya que los ELISAs y la FPA no son significativamente afectados por los anticuerpos resultantes por la inmunización (Ramírez *et al.*, 2008).

4.9.1 Rosa de Bengala, Tarjeta o Card Test

La prueba de rosa de bengala es una prueba convencional capaz de detectar una mínima cantidad de sueros falsos negativos, ya que si ésta da negativa ya no se pasa a las pruebas de confirmación como la prueba de rivanol y fluorescencia polarizada. Esta prueba se basa en la identificación de anticuerpos circulantes los cuales pueden ser de 2 tipos: el IgM un generado por vacunación, y los subisotipos IgG1 e IgG2 que se producen por una infección y éstos se mantienen por largos periodos de tiempo (Garry *et al.*, 1999; Padilla *et al.*, 2010). Esta prueba presenta alta sensibilidad relativa (100%) al compararla con la fluorescencia polarizada y baja especificidad (86%), lo cual la hace solamente útil como prueba tamiz (Dájer *et al.*, 2003; Mejía y Lemus, 2012).

4.9.2 Rivanol

La prueba de rivanol se realiza a los sueros de animales positivos a la rosa de bengala con la finalidad de diferenciar la respuesta post-vacunal de una respuesta de tipo infeccioso, teniendo una especificidad relativa alta (100 %) que al compararla con la fluorescencia polarizada, posee una sensibilidad relativa (86 %), lo que la hace útil como prueba confirmativa de la enfermedad (Díaz *et al.*, 2000; Dájer *et al.*, 2003). El rivanol es un colorante de acridina que tiene la capacidad de sedimentar las proteínas del suero, entre ellas los anticuerpos de tipo IgM que predominan en el caso de una vacunación o infección primaria, quedando los de IgG que se encuentran en mayor cantidad sólo en estimulaciones inmunogénicas posteriores. Para lograr una buena aglutinación se utiliza una solución de rivanol al 1% junto con el suero del animal a probar, en una proporción de 1:1; esta reacción provocará la sedimentación de IgMs y un sobrenadante rico en IgGs, donde se emplea un antígeno de *B. abortus* especialmente sensible para compensar el efecto de la dilución de los anticuerpos reaccionando sólo aquellos sueros con anticuerpos de la infección (Díaz *et al.*, 2000).

4.9.3 Fluorescencia polarizada (FPA)

La FPA es un inmunoensayo homogéneo de unión primaria utilizado para la detección de anticuerpos anti-PSO. La prueba se basa en la unión de un antígeno específico para una enfermedad marcado con fluoresceína y se pone en contacto con el anticuerpo de la muestra biológica, por lo que la velocidad de rotación de la molécula se reduce por la unión antígeno-anticuerpo produciendo

una señal que es traducida por un espectrofotómetro a variables que se pueden medir (Lucero *et al.*, 2003; Padilla *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2014). Nielsen *et al.* (1996), desarrollaron la FPA utilizando un conjugado del PSO de *B. abortus* con isotiocianato de fluoresceína como un trazador para la detección del anticuerpo de *B. abortus* en suero de bovino (Gall *et al.*, 2000; Lucero *et al.*, 2003). La FPA mide los grados de despolarización en unidades de milipolarización (mP). La sensibilidad de la prueba parece ser ligeramente menor que el ELISA-I, mientras que la especificidad es del 99.0 % (Godfroid *et al.*, 2010).

4.9.3.1 Ventajas de la fluorescencia polarizada

Las principales ventajas de la FPA es su rapidez, simplicidad, especificidad, sensibilidad, objetividad de resultados, y su habilidad temprana de distinguir los anticuerpos de *B. abortus* como resultado de la infección de campo en sueros bovinos sin detectar anticuerpos vacunales (Gall *et al.*, 2000; Samartino *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2014). Las desventajas de esta prueba consisten en el tamaño del antígeno y de sus habilidades para estar unido de manera covalente con un fluorocromo, y para inducir una respuesta de anticuerpos en los animales expuestos (Rodríguez, 2005).

4.9.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La técnica utilizada para el ELISA fue el método indirecto inicialmente descrito por Engvall y Perlmann (1971) y Veemen y Schurs (1971), utilizando la microtécnica propuesta por Ruitenberg *et al.* (1975), con algunas modificaciones introducidos para la adaptación del método antígeno-anticuerpo bajo estudio (Fernández y Díaz, 1986). Las pruebas de ELISA poseen alta sensibilidad y

especificidad, es simple de realizar con un mínimo equipamiento y fácilmente disponible en un número de presentaciones comerciales en forma de equipo (Manish *et al.*, 2013). La mayoría de los ELISAs-I detectan principalmente IgGs o subisotipos de IgG. Su principal cualidad es su alta sensibilidad, pero también es vulnerable a reacciones no específicas. Las reacciones cruzadas en el ELISA-I fueron razón del desarrollo del ELISA-C, en el que se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo-O del LPS compitiendo con los anticuerpos del suero por la unión del anticuerpo fijado en la placa (Godfroid *et al.*, 2010; Padilla *et al.*, 2010).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Patología Veterinaria de la Laguna, S.C., ubicado en avenida Trujano # 1024 sur, Gómez Palacio, Dgo, México.

5.2 Metodología

5.2.1 Muestreo sanguíneo

Es importante hacer siempre una adecuada identificación de las muestras que se envíen a cualquier laboratorio de diagnóstico. Para ello debe utilizarse material que resista el manejo, como: tintas permanentes que no desaparezcan con el agua, cintas engomadas o etiquetas que se adhieran apropiadamente y que no corran el riesgo de que durante el transporte se desprendan. Es necesario acompañar las muestras con un protocolo con los datos de identificación, tanto del propietario, el MVZ o el responsable de dichas muestras, que incluya un número de teléfono o dirección donde se les pueda localizar con prontitud en caso necesario; como del animal al que corresponden (Núñez y Bouda, 2007).

Se tomaron en total 30 muestras sanguíneas de vacas adultas que presentaron aborto espontáneo indicativo a brucelosis de 5 establos localizados en la Comarca Lagunera. Los sueros se analizaron con las pruebas: rosa de bengala, rivanol, FPA y ELISA-I.

5.2.2 Características generales de la obtención y envío de muestras al laboratorio

- 1) Reseña y anamnesis completas.
- 2) Obtención de muestras antes de cualquier administración de medicamentos o líquidos a los bovinos utilizados para el experimento.
- 3) Colección y cantidad de muestra adecuada.
- 4) Identificación de la muestra.
- 5) Conservación de las muestras a temperatura ambiente protegiendo del frío o calor excesivo durante 1 a 2 h y luego mantener en refrigeración a 4°C para su envío al laboratorio (Núñez y Bouda, 2007).

5.2.3 Materiales

- ✓ Agujas de seguridad para extracción de sangre venosa por sistema de vacío calibre 20 G.
- ✓ Tubos de recolección de sangre o vacutainers estériles sin anticoagulante (tapa roja).
- ✓ Guantes desechables.
- ✓ Contenedor de objetos punzantes.
- ✓ Bolsa para desechos biológicos.
- ✓ Marcador indeleble.
- ✓ Formato con identificación de animales para recolección de muestra.
- ✓ Hielera o contenedor con refrigerantes para el transporte de muestras.

5.2.4 Toma de muestra sanguínea de la vena coccígea

- 1) Identificación del tubo.
- 2) Sujetar la cabeza del animal en una base con ayuda de un cabezal o lazo.
- 3) Colocación de los guantes.
- 4) Levantar la cola del animal con suavidad hasta colocarla en una posición vertical sin lastimar al animal, sujetarla del tercio medio.
- 5) Limpiar la zona de trabajo con papel para eliminar los residuos de materia fecal.
- 6) Localizar por palpación con la mano libre la vena en la línea media, justo caudal de la inserción de los pliegues de la piel de la cola a nivel de entre las vértebras coccígeas 6-7.
- 7) Realizar antisepsia con alcohol al 70 % o yodo povidona al 10 % desde el sitio de punción hasta 10 cm de diámetro haciendo círculos concéntricos hacia el exterior. Se deja secar completamente el área y se procede a tomar la muestra.
- 8) Encajar el tubo en la funda sin perforarlo.
- 9) Insertar la aguja cranealmente a la protuberancia ósea en la línea media, a una profundidad de 8-12 mm en ángulo recto hasta que la sangre empiece a brotar. Si no es posible obtener la muestra en este sitio, extraer un poco la aguja para ver si hay sangre, de no ser así, intentar extraer entre las coccígeas 5-6.
- 10) Estabilizar la funda y la aguja con la mano, colocar el pulgar en la parte inferior del tubo y los dedos índice y medio en las aletas de la funda.

Presionando con el pulgar y el dedo índice el uno contra el otro, se forzar  el tapón de goma, introduciendo la aguja en el tubo. La sangre fluirá dentro del mismo.

11) Mantener la funda estable, hasta haber obtenido 5 ml de muestra y retirar el tubo.

12) Retirar la aguja suavemente y ejercer presión sobre la zona de puncci n con una gasa por unos segundos.

13) Desechar las agujas en el contenedor, y el resto de los materiales en la bolsa de desechos biológicos.

14) Quitarse los guantes y desecharlos

15) Dejar reposar la muestra colocando el tubo en forma horizontal a temperatura ambiente hasta que se forme el coágulo.

16) Se coloca la muestra en refrigeración para su traslado al laboratorio (Aguilar y *col.*, 2011; Zambrano y Díaz, 2012).

5.3 Prueba de Rosa de Bengala

1) Se utilizó un antígeno con una concentración del 8% que junto con las muestras sanguíneas se dejaron a una temperatura óptima (22-25  C) antes de comenzar a trabajar.

2) Las muestras fueron centrifugadas para separar el suero del paquete celular a una velocidad de 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante un tiempo de 4 minutos.

3) Se colocó una gota de 30 microlitros (μ l) con una puntilla diferente para cada muestra de suero en un cuadro sucesivo de la placa de vidrio, siguiendo un orden de izquierda a derecha y de arriba abajo.

- 4) Se agita el antígeno y con la micropipeta se colocó una gota de 30 μl a un lado del suero cuidando de no contaminar la puntilla.
- 5) Inmediatamente después de que se agregó la última gota de antígeno se mezcló el suero y el antígeno por rotación con un palillo por cada suero, a fin de obtener una mezcla homogénea.
- 6) Se mezcló durante 4 minutos por rotación manual suave de la placa de vidrio, evitando que las muestras de los cuadros adyacentes se pongan en contacto entre sí.
- 7) Se procedió a realizar la lectura sobre el aglutinoscopio.
- 8) Las muestras que presentaron aglutinación se consideraron positivas, y la que no aglutinaron se consideran negativas.
- 9) Las muestras positivas se reconfirmaron mediante la prueba de rivanol.

5.4 Prueba de Rivanol

- 1) El antígeno y los reactivos se dejaron a una temperatura óptima (22-25 $^{\circ}\text{C}$) antes de comenzar a trabajar. La prueba se realizó terminando la prueba de rosa de bengala.
- 2) Con la micropipeta se depositaron 400 μl de solución de rivanol en un tubo por cada muestra.
- 3) Utilizando una puntilla por cada suero problema, se agregó a cada tubo 400 μl de suero.
- 4) Se mezcló de inmediato por agitación cada tubo.
- 5) Se dejaron reposar los tubos a temperatura ambiente por 20 a 30 minutos.
- 6) Se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos para obtener un paquete a partir del precipitado.

- 7) Con la micropipeta se tomó del sobrenadante 80, 40, 20, 10, y 5 μl con una puntilla diferente para cada muestra de suero, y se colocó cada una de dichas cantidades en un cuadro de la placa de vidrio, procurando llevar un orden de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.
- 8) Con la micropipeta, se agregó 30 μl del antígeno de rivanol a cada una de las gotas de la mezcla sobre la placa.
- 9) Se mezcló con un palillo para cada muestra con el antígeno extendiéndolas dos centímetros de diámetro aproximadamente.
- 10) Se mezclaron las muestras por rotación, inclinando la placa suavemente hacia un lado y hacia otro 4 veces, dejando reposar 6 minutos.
- 11) Se mueve la placa nuevamente por rotación suave 4 veces y se dejó reposar otros 6 minutos.
- 12) al término del tiempo, se agitó la placa por rotación 4 veces más para proceder a realizar la lectura sobre el aglutinoscopio.
- 13) El resultado positivo será hasta donde haya llegado a aglutinarse cada muestra dependiendo de la dilución.

5.5 Fluorescencia Polarizada

- 1) Los reactivos y las muestras se dejaron a una temperatura ambiente (22-25 $^{\circ}\text{C}$) antes de comenzar a trabajar. La prueba se realizó después de haber terminado el diagnóstico con la prueba de rivanol.
- 2) Se agitó la solución de dilución y luego se mezcló una parte de solución de dilución en 24 partes de agua destilada.
- 3) En una tira de la placa de borosilicato de 10 x 75 mm de 8 pocillos, se colocaron 180 μl de solución para diluir en cada pocillo.

- 4) Se colocó 20 μ l de control negativo (CN) en 3 pocillos.
- 5) Se colocó 20 μ l de control positivo (CP) en 1 pocillo.
- 6) Se colocó 20 μ l de las muestras en los 4 pocillos restantes utilizando una puntilla diferente para cada muestra.

5.5.1 Lectura de muestras

Para la lectura de muestras se utiliza el aparato Sentry 2000S el cual transfiere estos resultados a una hoja de trabajo de Excel en una computadora.

- 1) En la hoja de trabajo de Excel, se selecciona la primera columna de 8 recuadros (3 CN, 1 CP y las 4 muestras).
- 2) Seleccionamos "Test" en la computadora y se revisa que el protocolo sea el correcto (incubación de 10 segundos).
- 3) Se introduce la placa de borosilicato en el riel en el aparato Sentry 2000S.
- 4) Se selecciona "Run" en la computadora, donde aparece una leyenda para asegurar que la placa está correctamente insertada en el riel, a la que se le selecciona "OK".
- 5) El aparato comienza a hacer la lectura de las muestras.

Nota: Cuando la hoja de trabajo de Excel está llena, se eliminan las cuatro primeras columnas, seleccionando las celdas y oprimiendo la tecla "delete" en la computadora.

Las medidas de lectura se expresan en unidades de milipolarización (mP).

Los resultados negativos deberán tener un valor entre 70-95 mP aproximadamente, mientras que el resultado positivo será arriba de 95 mP.

Al terminar de correr las muestras se realiza la limpieza del aparato Sentry 2000S.

5.6 ELISA-I

La prueba se realizó al siguiente día de acuerdo al protocolo que marca el kit comercial *BruPlus anti-HN* mediante el aparato Thermo Scientific Evolution 201.

- 1) El antígeno, las soluciones y las muestras se dejaron a temperatura ambiente (22-25 °C) antes de comenzar a trabajar.
- 2) En una placa de 96 pocillos de poliestireno, se agregaron 2 controles negativos, 2 positivos y las 30 muestras en cada uno de los pocillos para hacer una pre-dilución (una puntilla diferente para cada muestra).
- 3) Una vez diluidos los controles y las muestras, estos se pasan a una placa tapizada con antígenos específicos.
- 4) La placa con antígenos específicos se sella con una lámina de acetato para evitar cualquier tipo de contaminación y se pone a incubar en una estufa bacteriológica a 37°C por 1 hora.
- 5) Al terminar el periodo de incubación, se eliminó el contenido de los pocillos y se agregó una solución de lavado a cada pocillo para eliminar los anticuerpos que no se lograron unir a los antígenos.
- 6) Se realizó 4 lavados de la placa.
- 7) Se agregó el conjugado a cada pocillo, el cual contiene anticuerpos marcados con una enzima que se unen al complejo antígeno-anticuerpo.
- 8) Se volvió a incubar por otra hora en la estufa bacteriológica a 37°C.
- 9) Se volvió a realizar 4 lavados de la placa.

10) Se agregó el sustrato a cada pocillo, siendo el sustrato un cromógeno que se une al conjugado desarrollando un color proporcional a la cantidad de anticuerpo presentes en el suero.

11) Se volvió a incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos en un cuarto oscuro.

12) Al terminar la última incubación, se pasó la placa al aparato Thermo Scientific Evolution 201 para la interpretación de resultados el cual las manda a una computadora en un archivo de PDF mostrando las muestras positivas y negativas.

5.7 Análisis de datos

Se comparó la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de rosa de bengala, rivanol, FPA y ELISA-I para el diagnóstico de brucelosis en bovinos lecheros Holstein de la Comarca Lagunera.

5.7.1 Variables a determinar

La sensibilidad de una prueba, también conocida como fracción de verdaderos positivos (FVP), es la probabilidad de clasificar a un animal enfermo, es decir, la probabilidad de que en un animal enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo.

$$Sensibilidad = \frac{VP}{(VP + FN)} \times 100$$

La especificidad de una prueba, también conocida como fracción de verdaderos negativos (FVN), es la capacidad de una prueba para detectar a los animales sanos, es decir, la probabilidad de que para un animal se obtenga un resultado negativo.

$$Especificidad = \frac{VN}{(VN + FP)} \times 100$$

5.7.2 Clasificación de la prueba diagnóstica

La interpretación se clasificó tomando en cuenta la siguiente información.

Cuadro 2. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.

	Enfermedad	
Diagnóstico	Ausente	Presente
Negativo	Verdadero negativo (diagnóstico negativo, enfermedad ausente)	Falso Negativo (diagnóstico negativo, enfermedad presente)
Positivo	Falso positivo (diagnóstico positivo, enfermedad ausente)	Verdadero positivo (diagnóstico positivo, enfermedad presente)

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las pruebas diagnósticas se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados obtenidos en el diagnóstico de brucelosis mediante las pruebas rosa de bengala, rivanol, fluorescencia polarizada y ELISA-I en muestras de suero de bovinos Holstein de la Comarca Lagunera.

Prueba	Rosa de bengala %	Rivanol %	FPA %	ELISA-I %
Sensibilidad	25 (+) 100	25 (+) 100	25 (+) 100	5 (+) 20
Especificidad	5 (-) 100	5 (-) 100	5 (-) 20	25 (+) 100

(+): Muestras positivas, (-) Muestras negativas.

7. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo de investigación indican que se obtuvo una sensibilidad del 100 % en 25 muestras positivas en las pruebas de rosa de bengala, rivanol y FPA, mientras que en la prueba de ELISA-I solo 5 muestras mostraron sensibilidad del 20 %. Estos resultados indican que las pruebas de rosa de bengala, rivanol y FPA diagnosticaron 25 animales positivos a brucelosis bovina, en cambio ELISA-I los diagnosticó como negativos.

Respecto a la especificidad, los resultados indicaron que 25 muestras analizadas mediante las pruebas de rosa de bengala, rivanol y ELISA-I registraron una especificidad de 100 % en cada una, mientras que para la FPA se observó el 20 %. Estos resultados indican que los 25 animales que ELISA-I diagnostica como falsos positivos, la FPA los diagnostica como falsos negativos a brucelosis bovina. Entonces, los presentes resultados sugieren falta de concordancia en el diagnóstico de brucelosis entre la FPA y el ELISA-I. Sin embargo, de acuerdo con la NOM-041-ZOO-1995, las pruebas convencionales para el diagnóstico de brucelosis son la rosa de bengala y rivanol.

El diagnóstico de la brucelosis bovina requiere la implementación de pruebas serológicas sencillas y confiables que contribuyan a discriminar los animales infectados con *B. abortus* de aquellos infectados con bacterias que reaccionan en forma cruzada, así como con los animales vacunados con la cepa 19 de *B. abortus* (Dájer *et al.*, 2003). Las pruebas de ELISA-I y FPA son simples de interpretar y es posible obtener un diagnóstico similar al realizado con las pruebas convencionales (Adone y Pasquali, 2013).

Otra técnica para la detección del gen de *Brucella spp* es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), esta prueba puede ser una excelente alternativa después de la prueba tamiz como son la rosa de bengala y rivanol (Rentería *et al.*, 2005; Godfroid *et al.*, 2010; Córdova *et al.*, 2016).

Las diversas comparaciones de las nuevas pruebas serológicas en relación a las pruebas convencionales han demostrado que su aplicación podría agilizar los programas de control y erradicación de la brucelosis, así como garantizar el comercio internacional, sugiriendo la utilización del ELISA-I como prueba de tamiz por su elevada sensibilidad con respecto a la rosa de bengala y al ELISA-C (Mejía y Lemus, 2012).

Se hace mención que en la Comarca Lagunera actualmente algunos laboratorios realizan el diagnóstico de brucelosis en bovinos de leche mediante el ELISA-I utilizando el antígeno de HN. Asimismo, otros laboratorios realizan el diagnóstico de brucelosis en bovinos mediante la FPA, de hecho, uno de estos laboratorios es el que se encuentra en el Comité de Erradicación de la Brucelosis en la Comarca Lagunera, este laboratorio realiza el diagnóstico de brucelosis mediante la FPA, como se mencionó anteriormente dicha técnica fue una de las utilizadas en el presente trabajo de investigación; los resultados obtenidos con la referida técnica mostraron más concordancia con las técnicas oficiales. Sin embargo, es evidente la falta de actualización en tecnologías de vanguardia en el diagnóstico de brucelosis por parte de las instituciones oficiales quienes son los responsables en la definición de la o las técnicas que presenten mayor sensibilidad y especificidad con la finalidad de realizar un diagnóstico correcto. Entonces mientras no sean oficiales las nuevas tecnologías que poseen mayor

precisión y exactitud, seguirá la controversia en el diagnóstico de brucelosis bovina.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo de investigación indican que las pruebas de rosa de bengala y rivanol mostraron alta sensibilidad y especificidad. En cambio, el ELISA-I y la FPA no mostraron concordancia en la sensibilidad y especificidad. Interesantemente, la diferencia en la sensibilidad entre la FPA y el ELISA-I indica que los animales positivos a brucelosis en las pruebas rosa de bengala, rivanol y la FPA son verdaderos positivos. En cambio, los animales diagnosticados como negativos en el ELISA-I son falsos negativos.

Finalmente, los resultados del presente trabajo de investigación indican que basándonos en las pruebas oficiales que son la rosa de bengala y rivanol, la FPA es la prueba que mostró una sensibilidad y especificidad semejante a las pruebas convencionales en el diagnóstico de brucelosis en bovinos lecheros Holstein de la Comarca Lagunera.

9. LITERATURA CITADA

- Adone, R., Pasquali, P. 2013. Epidemiology of Brucellosis. Journal Revue Scientifique et technique (International Office of Epizootics). 32:199-205.
- Álvarez, E., Díaz, M., Ortiz, M. 2015. Brucellosis, una zoonosis frecuente. Medicina e Investigación. 3: 129-133.
- Aguilar, F., Cantú, A., Díaz, E., Favila, L., Herrera, E., Morales, J., Palomares, E., Santillán, M. 2011. Prevención de Brucellosis en rumiantes. INIFAP. Folleto Técnico N° 2. Cuajimalpa, Distrito Federal. p.46.
- Biberstein, L., Chung, Y. 1994. Tratado de Microbiología Veterinaria. Acribia. Zaragoza, España. p. 285-288.
- Bustamante, J., Salazar, F., Díaz, E., Manzano, C., Pérez, R., Hernández, L. 2000. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. Técnica Pecuaria en México. 38: 35-42.
- Carrisoza, I., Medina, M., Palomares, E., Díaz, E. 2014. Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro. Veterinaria México. 45: 11-18.
- Castro, H., González, S., Prat, M. 2005. Brucellosis: Una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 39: 203-216.
- Córdova, A., Iglesias, A., Espinosa, R., Guerra, J., Inzunza, J., Villa, E., Méndez, M., Huerta, R., Juárez, M., Gómez, A., Cancino, G., Méndez, W., Olivares, J., Velázquez, V., Sánchez, P. 2016. Importancia de la brucelosis bovina y consecuencias económicas para el ganadero. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/305046627_IMPORTANCIA_D_E_LA_BRUCELOSIS_BOVINA_Y_CONSECUENCIAS_ECONOMICAS_PARA_EL_GANADERO Fecha de acceso: 22 agosto del 2018.

Dájer, A., Gutiérrez, E., Zapata, D., Sierra, E., Cámara, E. 2003. Evaluación de una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de competencia (ELISA-C) para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. *Revista Biomédica*. 14: 23-28.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2018. Disponible en; http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5001157&fecha=20/09/2007
Fecha de acceso: 28 de junio del 2018.

Díaz, E. 2013. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 32 (1): 43-51.

Díaz, E., Hernández, L., Ochoa, V., Blasco, J., Suárez, F. 2000. Evaluación de la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis en caprinos. *Veterinaria México*. 31: 53-58.

Díaz, R., Jones, L., Leong, D., Wilson, J. 1968. Surface antigens of smooth brucellae. *Journal of Bacteriology*. 96: 893-901.

Estein, S. 2006. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). *Revista Electrónica de Veterinaria*. 7: 1-25.

Fernández, L., Moriyon, I., Toyos, J., Díaz, R. 1982. Immunological identity of *Brucella* native hapten, polysaccharide B, and *Yersinia enterocolitica* serotype 9 native hapten. *Infection and Immunity*. 38: 778-780.

- Fernández, L., Díaz, R. 1986. Demonstration of antibodies against *Brucella melitensis* 16M lipopolysaccharide and native hapten in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 24: 76-80.
- Fernández, C., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S., Schurig, G., Hadfield, T., Hoover, D. 2001. Deletion of who enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Journal of Infection and Immunity*. 69: 4407-4416.
- Freer, E., Castro, R. 2001. Brucella: Una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 22: 73-82. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482001000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es Fecha de acceso: 02 de enero de 2018.
- Gall, D., Nielsen, K., Forbes, L., Davis, D., Elzer, P., Olsen, S., Balsevicius, S., Kelly, L., Smith, P., Tan, S., Joly, D. 2000. Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. *Journal of Wildlife Diseases*. 36: 469-476.
- Garry, L., Cantú, A., Díaz, E., Suárez, F. 1999. Memoria del XVII día del ganadero. INIFAP. Publicación especial N° 9. Victoria, Tamaulipas. p. 44.
- Godfroid, J., Nielsen, K., Saegerman, C. 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*. 51: 296-305.

- González, E., Hernández, L., Díaz, E. 2006. Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*. *Técnica Pecuaria en México*. 44: 269-276.
- Gutiérrez, E., Lützelshwab, C., Díaz, A., Estein, S. 2014. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of anti-*Brucella abortus* antibodies in cattle serum: Adaptation for its use in microplates and comparison with conventional agglutination test. *Journal of Veterinary Science and Medical Diagnosis*. 3: 1-4.
- Herrera, E., Suárez, F., Arellano, B., Palomares, E., Hernández, R., Díaz, E. 2010. Experiences in México of the vaccination in bovines and goats, with *Brucella abortus* RB51 strain. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Méndez-Vilas ed. pp. 694-699.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2017. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/ganaderia/> Fecha de acceso: 08 de diciembre de 2018.
- López, A., Migranas, R., Pérez, A., Magos, C., Salvatierra, B., Tapia, R., Valdespino, J., Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud Pública de México*. 34: 230-240.
- Lucero, N., Escobar, G., Ayala, S., Paulo, P., Nielsen K. 2003. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 883-887.

- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2006. Brock. Biología de los microorganismos. 10 ed. Pearson Educación. Madrid, España. p. 756.
- Manish, K., Puran, C., Rajesh, C., Teena, R., Sunil, K. 2013. Brucellosis: An updated review of the disease. The Indian Journal of Animal Sciences. 83: 3-16.
- Margni, R. 2006. Nueva vacuna contra la brucelosis. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 40: 83-88.
- Martínez, L., Verdugo, A., Hernández, R. 2006. Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca. Veterinaria México. 37: 479-486.
- Martínez, D., Peniche, A., Hernández, S., Antonia, M., Barradas, F., Villanueva, M., Morales, J., Flores, R. 2011. Evaluación de la cepa S19 *Brucella abortus* en el control de la brucelosis bovina en Actopan, Veracruz, México. Revista de Salud Animal. 33: 44-50.
- Mejía, K., Lemus, C. 2012. Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con ELISA para el diagnóstico de brucelosis bovina. Revista Electrónica de Veterinaria. 13: 1-14.
- Méndez, M., Rodríguez, E., Sánchez, L. 2015. Brucelosis, una zoonosis presente en la población: Estudio de series de tiempo en México. Salud Pública de México. 57: 519-527.
- Merchant, I., Packer, R. 1975. Bacteriología y virología veterinaria. 3 ed. Acribia. Zaragoza, España. p. 138, 328, 329, 330.
- Muñoz, P., Marín, C., Monreal, D., González, D., Garin, B., Díaz, R., Mainar, R., Moriyón, J., Blasco, J. 2005. Efficacy of several serological test and

antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O: 9. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 12: 141-151.

SAGARPA. 1995. Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995). Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4896374&fecha=20/08/1996

Fecha de acceso: 08 de junio de 2017

Nuñez, O., Bouda, J. 2007. Patología Clínica Veterinaria. FMVZ-UNAM. México, Distrito Federal. p. 12-13.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2016. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/> Fecha de acceso: 05 de junio del 2017.

Orduña, A., Abad, R., Zarzosa, M., Dueñas, A., Mantecón, M., Eiros, J., Rodríguez, A. 2001. Diagnóstico microbiológico de la brucelosis. Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León. España. pp. 121-138.

Padilla, F., Nielsen, K., Samartino, L., Ling, W. 2010. Diagnosis of brucellosis. J. The Open Veterinary Science. 4: 46-60.

Palmer, D., Douglas, J. 1989. Analysis of brucella lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. American Society for Microbiology. 27: 2331-2337.

Peña, A., Cervini, J., Padilla, L., Delgadillo, J. 2014. Prevalencia de brucelosis bovina en la región de producción lechera de Jalisco, México. Revista Iberoamericana de Ciencias. 1: 245-252.

- Petersen, E., Rajashekara, G., Sanakkayala, N., Eskra, L., Harms, J., Splitter, G. 2013. Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*. *Microbes and Infection*. 15: 440-449.
- Querol, J. 2011. Cuestiones clínicas, epidemiológicas y diagnósticas de la brucelosis bovina, ovina y caprina. Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/117-Cuestiones_clinicas.pdf Fecha de acceso: 20 de junio del 2018.
- Quinn, P., Markey, B. 2003. Elementos de microbiología veterinaria. Acribia. Zaragoza, España. pp. 105-107.
- Ramírez, C., Díaz, E., Gomez, R., Rodríguez, C., Morales, A., Álvarez, G. 2008. Use of the *Brucella melitensis* native hapten to diagnose brucellosis in goats by a rapid, simple, and specific fluorescence polarization assay. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15: 911-915.
- Rentería, T., Organes H., Licea, A., G Medina, G., Nielsen, K., Montaña, M., Moreno, J., Pujol, L. 2005. Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Técnica Pecuaria en México*. 43: 117-126.
- Rodríguez, R. 2005. Enfermedades de importancia económica en producción animal. McGraw-Hill Interamericana. D.F., México. pp. 339-351.

- Rodríguez, Y., Ramírez, W., Antúnez, G., Pérez, F., Ramírez, Y., Igarza, A. 2005. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Revista Electrónica de Veterinaria. 6: 1-9.
- Rojas, N., Freer, E., Weintraub, A., Ramírez, M., Lind, S., Moreno, E. 1994. Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 1: 206-213
- Saldarriaga A., O., M. Rugeles T. 2002. Inmunobiología de la infección por *Brucella spp*: Fundamentos para una estrategia vacunal. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 15: 188-197.
- Samartino, L., Schust, M., Piazza, E., Salustio, E., Conde, S. 2007. Diagnóstico de la brucelosis animal: Implementación de nuevas tecnologías. Sitio Argentino de Producción Animal. 20-23.
- Sánchez, A., Rodríguez, M., Becerra, L., Cordero, R. 2010. Utilidad de las técnicas fluorescencia polarizada y del inmunoensayo enzimático de competencia para diagnóstico de brucelosis en caballos purasangre de carreras. Interciencia. 35 (2): 131-135.
- Schurig, G. 2001. Uso de la vacuna RB51 contra la brucelosis; Diez preguntas a su creador el Dr. Gerhardt Schurig. Producción Animal. 3: 31-36.
- Smits, H., Abdoel, T., Solera, J., Clavijo, E., Díaz, R. 2003. Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 10: 1141-1146.

- Stanchi, N., Martino, P., Gentilini, E., Reinoso, E., Echeverría, M., Leardini, N., Copes, J. 2007. Microbiología Veterinaria. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina. pp. 281-293.
- Stevens, M., Hennager, S., Olsen, S., Cheville, N. 1994. Serologic responses in diagnostic test for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. Journal of Clinical Microbiology. 32 (4): 1065-1066.
- Tizard, I. 2009. Inmunología Veterinaria. 8 ed. Elsevier. Barcelona, España. pp. 85-87.
- Urmeneta, B., Díaz, M., Blasco, J. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. Journal of Clinical Microbiology. 26: 2642-2646.
- Urmeneta, B., Marín, C., Aragón, V., Blasco, J., Díaz, R., Moriyón, I. 1998. Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 5: 749-754.
- Weiner, M., Iwaniak, W., Zlotnicka, J., Szulowski, K. 2010. Diagnosis of bovine brucellosis using traditional serological techniques and fluorescence polarization assay. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 54: 485-488.
- Zambrano, J., Díaz, S. 2012. Guía para la correcta toma de sangre en bovinos. UNAL. Bogotá, Colombia. pp. 1-4.