

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**Comparación del desempeño de cuatro pruebas para el diagnóstico
serológico de brucelosis bovina en hatos lecheros de Baja California**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

MVZ. Karla Guadalupe Barrán Hernández

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

MARZO 2015

Comparación del desempeño de Cuatro Pruebas para el Diagnóstico Serológico de Brucelosis Bovina en Hatos Lecheros de Baja California. Tesis presentada por Karla Guadalupe Barrán Hernández; como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias.

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado

Directora de tesis

Dr. Gilberto López Valencia

Asesor

Dr. Francisco Javier Monge Navarro

Asesor

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez

Asesor

Mexicali, Baja California Marzo 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado por sus consejos y por siempre estar al tanto de este estudio.

A mis asesores, Dr. José José Carlomán Herrera Ramírez, Dr. Francisco Javier Monge Navarro y Dr. Gilberto López Valencia por sus comentarios, críticas y sugerencias para mejorar este estudio y tesis.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dra. Gabriela Palomares Reséndiz y Biól. Isabel Tuxpan Galván del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por su apoyo incondicional durante mi estancia y por haber contribuido en este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico, ya que sin ello no podría haber realizado esta maestría.

A mi compañero y amigo MC. Jorge Cervantes por las risas, por ayudarme y escucharme durante estos dos años.

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo, consejos y por darme la vida e inculcar en mí los valores y principios necesarios para alcanzar mis metas, hacer lo que me gusta y ser la persona que soy.

A mi hermano (†), que aunque físicamente no está conmigo sé que estaría orgulloso de mí. Su muerte me dio el coraje para vivir cada día como si fuera el último y a luchar para hacer realidad todos mis sueños.

A mi pareja, por vivir conmigo todo este proceso, brindarme su amor y ser ese soporte y persona con la que quiero estar siempre.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar las pruebas de Rosa de Bengala (RB), Rivanol (RIV), Ensayo inmunoenzimático indirecto (IELISA) e Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo (IDR-HN) para el diagnóstico de brucelosis bovina, determinando su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y coeficiente Kappa, utilizando la prueba de Fluorescencia Polarizada (FP) como estándar de oro. El muestreo se realizó en tres hatos lecheros de Baja California. Se probaron un total de 332 muestras de suero sanguíneo provenientes de vacas en producción, mayores de un año de edad, sin historial de vacunación contra brucelosis. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las cuatro pruebas comparadas con FP fueron RB 96.83%, 97.7%, 97.4%, 97.14%; RIV 99.3%, 92.5%, 92.3%, 94.3%; IELISA 96.8%, 98.2%, 98.0, 97.1% e IDR 77.2%, 98.8%, 98.3%, 82.6%. El coeficiente kappa más alto obtenido se logró entre FP e IELISA con 0.952. El 84.6% (281/332) de las muestras analizadas en este estudio concordaron los resultados en todas las pruebas examinadas. De las 51 muestras restantes (15.4%), 46 resultaron negativas a IDR y positivas a RIV. IELISA es una buena alternativa para el diagnóstico de brucelosis bovina en Baja California.

PALABRAS CLAVE: Rosa de Bengala, Rivanol, Ensayo inmunoenzimático indirecto, Inmunodifusión radial, Fluorescencia polarizada, Brucelosis, Sensibilidad

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the Rose Bengal test (RB), Rivanol (RIV), indirect Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (IELISA) and Radial Immunodiffusion with Native Hapten (IDR-HN) for the diagnosis of bovine brucellosis, determining their sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and Kappa coefficient using Polarized Fluorescence test (FP) as *gold standard*. Sampling was carried out in three dairy herds in Baja California. A total of 332 serum samples from cows in production, over one year of age and no history of vaccination against brucellosis were tested. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of the four tests compared with FP, were: RB 96.83%, 97.7%, 97.4%, 97.14%; RIV 99.3%, 92.5%, 92.3%, 94.3%; IELISA 96.8%, 98.2%, 98.0%, 97.1% and IDR 77.2%, 98.8%, 98.3%, 82.6%. The highest kappa coefficient obtained was achieved between FP and IELISA with 0.952. 84.6% (281/332) of the samples analyzed in this study agreed results in all the examined tests. Of the remaining 51 samples (15.4%), 46 were negative IDR and positive RIV. IELISA is a good alternative for the diagnosis of bovine brucellosis in Baja California.

KEYWORDS: Rose Bengal, Rivanol, Indirect Enzyme-Linked ImmunoSorbent, Radial Immunodiffusion, Polarized Fluorescence, Brucellosis, Sensitivity.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Historia	3
Etiología	3
Estructura externa	4
Patogénesis.....	6
Factores de virulencia	7
Epidemiología.....	8
Diagnóstico.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Ubicación.....	17
Selección de animales.....	17
Criterio de inclusión	17
Colección de muestras	18
Análisis de las muestras.....	18
Análisis estadístico	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	31
LITERATURA CITADA	32

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas para brucelosis	16
2	Valoración del coeficiente kappa	21
3	Resultados de pruebas serológicas	24
4	Comparación de los resultados de FP con las otras pruebas estudiadas	25
5	Concordancia de Fluorescencia Polarizada con otras pruebas	27

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Estructura del lipopolisacárido de <i>Brucella abortus</i>	5
2	Situación de la campaña contra la brucelosis bovina	9
3	Curva ROC de IELISA y FP	22
4	Diagrama de puntos de IELISA y FP	23
5	Tablas de contingencia 2x2 para cada prueba diagnóstica y sus respectivos valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo	26

INTRODUCCIÓN

Brucella spp. es considerado uno de los principales patógenos zoonóticos en el mundo. Es una enfermedad de notificación obligatoria (Organización Mundial de Salud Animal, 2008) y es responsable de importantes pérdidas económicas para la industria ganadera, donde las estimaciones oficiales en América Latina son de aproximadamente US\$ 600 millones (Acha y Szyfres, 2003). Además de 500,000 casos humanos de brucelosis al año en todo el mundo (Pappas et al., 2006).

En México, las pruebas de diagnóstico para la brucelosis, reconocidas en la NOM-041-ZOO-1995 son Rosa de Bengala, Rivanol y Fijación del Complemento; a nivel internacional son Fijación de Complemento, Ensayos Inmunoenzimáticos y Fluorescencia Polarizada (Organización Mundial de Salud Animal, 2009).

El principal problema para obtener un diagnóstico serológico confiable de brucelosis bovina es debido a la reacción cruzada serológica, la cual se puede dar entre el lipopolisácarido liso de *Brucella* spp. y diversos organismos como *Escherichia coli* O: 157, *Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae* O:1, *Leptospira* spp. y *Yersinia enterocolitica* O:9 (Garin-Bastuji et al., 1999; Muñoz et al., 2005; de Faria Naves et al., 2012). Otro problema de reacción cruzada es debido a los anticuerpos desarrollados al utilizar la vacuna que contiene la cepa S19 de *Brucella abortus* (Stevens et al., 1995).

Para diferenciar o eliminar estas reacciones cruzadas se han desarrollado y validado otras técnicas diagnósticas, por ejemplo, PCR para

identificar *Brucella abortus* S19 y RB51 (Bricker y Halling, 1995), IELISA con LPS liso y rugoso (Nielsen et al., 2006) y el inmunoensayo APIA (antígeno printeado inmunoanálisis) usando la cadena O del LPS de *B. abortus* (Cantero et al., 2011).

El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, negativo y concordancia (Kappa) de un sistema ELISA indirecto y compararlos con los obtenidos por las pruebas de Rosa de Bengala, Rivanol e Inmunodifusión Radial con hapteno nativo, para el diagnóstico serológico de brucelosis bovina.

REVISIÓN DE LITERATURA

Historia

En 1887 Bruce reportó el aislamiento de *Micrococcus melitensis* de un caso humano en Malta (Vassallo, 1992). En 1897 Bang describió *Bacterium abortus*, el cual aisló del útero de una vaca que había abortado (MacNeal y Kerr, 1910). Evans mostró la cercana relación de estas dos bacterias en 1918. Siguiendo con estas sugerencias, Meyer y Shaw en 1920 propusieron el género *Brucella* para *B. melitensis* y *B. abortus*.

Los aislados de cerdos fueron considerados cepas atípicas de *B. abortus* hasta que en 1931 Huddleson observó las diferencias y propuso la especie *Brucella suis*. El mejor entendimiento del género abrió el camino para la descripción de *B. neotomae* (Stoenner y Lackman, 1957), *B. ovis* (Buddle, 1956) y *B. canis* (Carmichael y Bruner, 1968).

Etiología

El género *Brucella* está formado por cocobacilos de 0.5-0.7 X 0.6-1.5µm, se pueden observar solos, en pares o en pequeños grupos. Son Gram negativos, no motiles, aeróbicos, algunas cepas requieren CO₂ para crecer, catalasa positivo, frecuentemente oxidasa positiva, pero pueden ocurrir negativos. Son parásitos intracelulares facultativos, genéticamente monoespecíficos. Aunque no es ácido-alcohol resistente, no sufre decoloración con ácidos débiles. Su pared celular está compuesta de una membrana que

comprende una capa externa principalmente de lipopolisacáridos intercalados con una variedad de proteínas y lípidos. Existen 10 especies dentro del género *Brucella* en base a la especificidad con el hospedador preferencial: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. suis* (cerdo), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos), *B. neotomae* (ratón del desierto) (Corbel y Banai, 2005), *B. cetácea* (cetáceos), *B. pinnipediae* (foca) (Cloeckert et al., 2001, 2003), *B. microti* (ratón de campo) y *B. inopinata* (aislado de un implante mamario) (Scholz et al., 2008, 2010). De estas 10 especies, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis* son patógenos para los seres humanos (O'Callaghan y Whatmore, 2011).

De acuerdo al aspecto de las colonias en medios sólidos, se pueden clasificar a las especies de *Brucella* en lisas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*) y en rugosas (*B. ovis* y *B. canis*). Este aspecto de las colonias se debe al tipo de lipopolisacárido expresado en mayor proporción en la superficie bacteriana (Ariza, 1995).

Estructura externa

Fosfatidilcolina es el principal fosfolípido de la membrana externa de *Brucella*, a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias, que se relacionan con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina (Gamazo y Moriyón, 1987). Uno de los componentes más estudiados de la membrana externa de *Brucella* es el lipopolisacárido (LPS), el cual en las cepas en fase lisa está dividido en tres secciones: Lípido A, un oligosacárido intermedio llamado núcleo y el polisacárido O (Fig. 1). La estructura del LPS de las cepas rugosa es similar

excepto que la cadena O está ausente o reducida a unos pocos residuos de monosacáridos (Corbel, 1997).

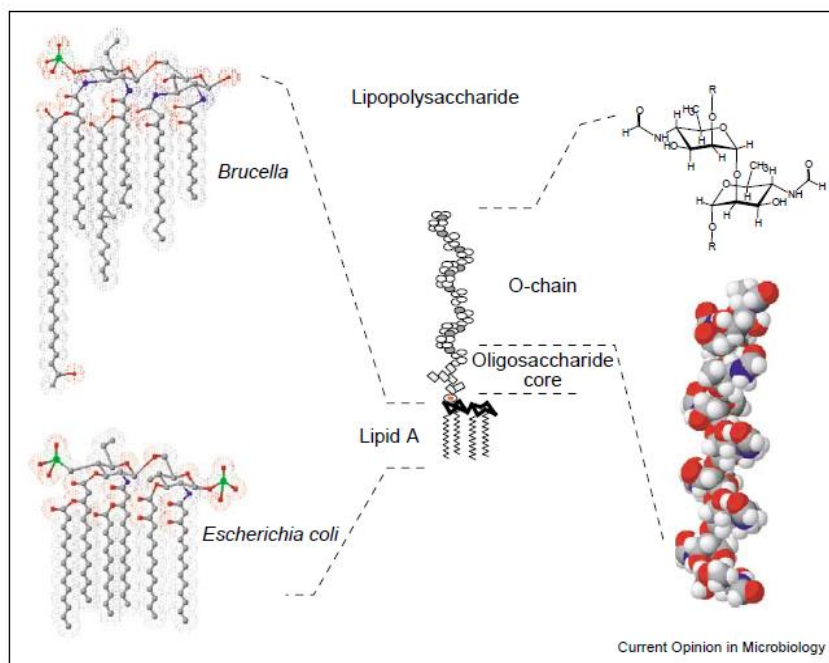


Fig. 1 Estructura del lipopolisacárido de *Brucella abortus*

(Lapaque et al., 2005).

El lípido A es diferente al de las enterobacterias, ya que tiene una columna vertebral de diaminoglucosa, en lugar de glucosamina (Lapaque et al., 2005). Contiene como azúcar central un disacárido de 2,3-diamino-2,3 dideoxi-D-glucosa con enlaces β -1,6, sustituidas por ácidos grasos saturados unidos por enlaces amida y éster (Qureshi, 1994). El núcleo es una cadena corta oligosacáridica de glucosa, manosa, 2-amino-2,6-dideoxi-D-glucosa (quinovosamina) y 2- ceto, 3- deoxioctonato (KDO) que une la cadena O al lípido A (Moreno et al., 1987). Las cepas rugosas contienen mayor cantidad de KDO y no contienen quinovosamina (Moreno et al., 1984). La cadena O

consiste en un homopolímero lineal de enlaces α 1, 2 4-formamido-4,6-dideoxi-D-manosa (N-formil perosamina) de longitud variable (Moriyón y Goñi, 1998). Esta cadena O es el antígeno inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (Nielsen et al., 2004b).

La similitud entre el LPS de *Yersinia enterocolitica* O: 9 y el LPS de *Brucella* se determina por la cadena O, ya que está formada por unidades de 4,6-dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosil con enlaces α -1,2. Por lo que las reacciones cruzadas con *Brucella* spp. se da por ser esta estructura idéntica, sin embargo el lípido A y el núcleo son diferentes. El oligosacárido del núcleo de *Y. enterocolitica* O:9 está compuesto de D-galactosa, D-glucosa, L y D-glicero-D-mano-heptosas, KDO y 2-amino-2-deoxi-D-galactosa. El lípido A contiene 2-amino-2-deoxi-D-glucosa y los ácidos grasos: dodecanóico, tetradecanóico, hexadecanóico y 3-hidroxi-tetradecanóico (Caroff et al., 1984).

Patogénesis

Brucella spp. es altamente dependiente de su habilidad para entrar, sobrevivir y replicarse en células huésped fagocíticas profesionales y no profesionales (macrófagos, células dendríticas, trofoblastos y células epiteliales)(Liautard, 1996; Ko y Splitter, 2003; Köhler et al., 2003), modificando el proceso de maduración del fagosoma (Arenas et al., 2000) y acidificándolo rápidamente después de la infección (Porte et al., 1999). Por lo tanto, *Brucella* spp. pasa con éxito los efectos bactericidas de los fagocitos (Pizarro et al.,

1988). Algunos estudios con fagocitos no profesionales han demostrado que *Brucella* spp. invade las células huésped y está contenida dentro de los endosomas tempranos como vacuolas, estas vacuolas rápidamente se fusionan con autofagosomas tempranos que adquieren H⁺-ATPasa vacuolar y proteínas de membrana lisosoma-asociado (LAMP) madurando dentro de un autofagosoma tardío (Cardoso et al., 2006). Estos autofagosomas inhiben la fusión con lisosomas y finalmente se convierten en una vacuola replicante, normalmente asociada con el retículo endoplásmico (Dorn et al., 2002). Recientemente se ha demostrado que *Brucella abortus* no induce respuestas pro-inflamatorias significativas durante la infección en ratones, la actividad inmunoestimulante es baja, así como la toxicidad para las células hospedadoras (Barquero-Calvo et al., 2007).

Factores de virulencia

Brucella spp. no tiene los clásicos factores de virulencia como exotoxinas o cápsula. La cadena O del lipopolisacárido, presente solamente en las cepas lisas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* está asociada a su virulencia, por lo que resulta esencial para la entrada y la fase intracelular temprana de *Brucella* spp. en macrófagos (Porte et al., 2003). Las cepas mutantes incapaces de producir fosfatidilcolina tienen una capacidad reducida para evitar la fusión con los lisosomas de los macrófagos (Conde-Álvarez et al., 2006). LPS de *B. abortus* tiene una baja endotoxicidad en comparación a *E. coli* (Moreno et al., 1981; Goldstein et al., 1992), interfiere con la ruta presentación de antígeno del

complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Forestier et al., 2000). Por lo que la capa de lipopolisacárido de la membrana externa de *Brucella* spp. es una barrera eficiente para soportar las actividades digestivas de los fagocitos, y por lo tanto esta molécula debe ser considerada como un factor de virulencia (Freer, 1996).

Epidemiología

Durante 1981, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) realizó un monitoreo serológico de brucelosis, el cual reveló una seroprevalencia del 6.2% en 7,974 vacas probadas en la región de Mexicali (Salman et al., 1984). En el año 1999 el comité de campaña de tuberculosis y brucelosis bovina en el estado de Baja California, observó una seroprevalencia en brucelosis bovina del 3.5% (Rentería et al., 2003). En un estudio realizado en Tijuana, Baja California se obtuvo una prevalencia de 6.4% por la prueba de fluorescencia polarizada y 7.7% por la prueba de tarjeta (Moreno et al., 2002). En México, la brucelosis bovina se considera una enfermedad endémica. El Estado de Sonora (casi en su totalidad) es el único que ha sido declarado libre de esta enfermedad, mientras que Baja California Sur, Yucatán, Campeche y regiones de Guerrero (Costa Chica y Costa Grande) se encuentran en fase de erradicación (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2011). En enero del 2015 el 8.02% del territorio nacional se encuentra libre de brucelosis, el 14.43% en erradicación y 77.55% en control (Fig. 2) (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2015).

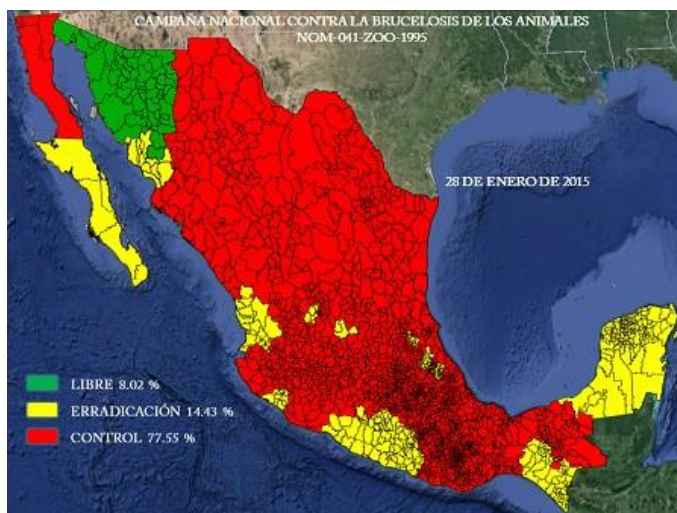


Figura 2. Situación de la campaña contra la brucelosis bovina

(Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2015).

Diagnóstico

En México, el diagnóstico oficial de brucelosis bovina se realiza con muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y muestras de tejido, mediante las pruebas inmunológicas, estudios bacteriológicos u otros autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA). Las pruebas inmunológicas autorizadas son: Prueba en tarjeta, Rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche (NOM-041-ZOO, 1995). Sin embargo bajo estas pruebas, se puede presentar reacción cruzada con otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Salmonella*, *E. coli* y con anticuerpos vacunales, obteniendo resultados falsos positivos (Weynants et al., 1996; Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2011).

La prueba de Rosa de Bengala (RB) es un procedimiento cualitativo, rápido, de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución y que detecta principalmente anticuerpos IgG1 y en menor grado IgM. Se utiliza como prueba de tamizado por su alta sensibilidad y permite reducir el número de pruebas diagnósticas necesarias para controlar y/o erradicar la brucelosis en un rebaño o hato (NOM-056-ZOO-1995), sin embargo, existe el riesgo de dar resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con bacterias como *Salmonella*, *E. coli*, *yersinias* y *pseudomonas* (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2011). Se fundamenta en que las IgG1 específicas contra *Brucella* todavía actúan a un pH de 3.8, lo que determina la especificidad de la prueba. Se realiza con muestras de suero sanguíneo no hemolizado y con antígeno autorizado por la Secretaría, que reúna las siguientes características: elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, teñido con rosa de bengala en ácido láctico, pH de 3.65 (\pm 0.05) y concentración celular del 8% para bovinos y del 3% para caprinos y ovinos. Los resultados de la prueba de tarjeta arrojarán sólo dos clasificaciones: positivos y negativos, dependiendo de la presencia o ausencia de aglutinación, según sea el caso (NOM-056-ZOO-1995).

La prueba de Rivanol (RIV) es una prueba serológica complementaria cuantitativa, altamente específica, ya que precipita las inmunoglobulinas de la muestra, principalmente las IgM, quedando en solución solo las IgG, que son las directamente involucradas con la respuesta inmune ante una cepa de campo (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2011). Se debe realizar con sueros no hemolizados, positivos a la prueba de

tarjeta, con antígeno autorizado por la Secretaría y con reactivo de Rivanol: lactato de 2-etoxi 6,9-diamino acridina. El antígeno debe ser elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* y debe reunir las siguientes características: teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta, pH 5.8 a 6.2 y concentración celular 4%. Se consideran positivos, todos aquellos sueros de animales no vacunados que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de las diluciones, desde 1/25 a 1/400. En el caso de ganado vacunado con S19, la aglutinación completa en una dilución mayor o igual a 1/50 será una prueba positiva (NOM-056-ZOO-1995).

La prueba de Fluorescencia polarizada (FP) se basa en las diferencias de la velocidad de rotación entre una molécula pequeña de antígeno soluble en solución (marcado con un fluorocromo) y una molécula de complejo antígeno con su anticuerpo. Una molécula pequeña rotará aleatoriamente a un ritmo rápido, lo que resulta en rápida despolarización de la luz, mientras que una molécula de complejo más grande girará más despacio y despolarizará la luz más lentamente, pudiendo medirse el cambio en la tasa de despolarización en una muestra (Nielsen y Gall, 2001). Las lecturas se llevan a cabo mediante un lector portátil de FP (Sentry 100, Diachemix Corp, DLL, EUA).

La prueba de Fijación del complemento (FC) es una prueba rápida y muy sensible, ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico confirmatorio de la Brucelosis en las diferentes especies animales debido a su gran sensibilidad y especificidad. Es capaz de detectar el isotipo IgG1; por esta razón resulta más precisa comparativamente con otras técnicas serológicas y el diagnóstico bacteriológico. Se basa en la activación del complemento por la vía clásica, en

donde es necesaria la presencia de una unión antígeno anticuerpo para iniciar la reacción (fase invisible). Cuando existen anticuerpos contra *Brucella*, se da la reacción antígeno anticuerpo y el complemento se une a esta reacción (Ag-Ac-C), siendo incapaz de unirse al sistema hemolítico, que es un segundo sistema antígeno anticuerpo (fase visible), observándose una sedimentación de los glóbulos rojos con anticuerpos o hemolisina. En ausencia de anticuerpos contra *Brucella* en el primer sistema durante la fase invisible, el complemento queda libre, uniéndose al segundo sistema antígeno anticuerpo o sistema hemolítico, observándose una hemólisis. Se consideran títulos positivos a la dilución correspondiente desde 0% de hemólisis hasta 75% de hemólisis o títulos desde 1:10 (NOM-056-ZOO-1995). Algunos problemas que presenta esta prueba son: no discrimina a los anticuerpos derivados de *B. abortus* S19, subjetividad de la interpretación de los resultados e incapacidad de la prueba por uso de sueros hemolizados (Poester et al., 2010).

La prueba del anillo en leche es un procedimiento práctico, rápido y económico para detectar hatos lecheros infectados y para la vigilancia de los que están exentos de la enfermedad. Se debe efectuar 3 a 4 veces al año combinando muestras de leche de tanques almacenadores grandes y luego realizando pruebas individuales. Se ha utilizado como prueba de vigilancia epidemiológica en países o regiones donde se ha establecido un control de la brucelosis bovina. Es una prueba muy sensible que permite reducir el número de pruebas diagnósticas necesarias para controlar y/o erradicar la Brucelosis en un rebaño o hato. Esta prueba se debe practicar en muestras de leche cruda, fluida y fresca, realizándose con antígeno autorizado por SAGARPA reuniendo

las siguientes características: teñido con hematoxilina, pH entre 4.0 y 4.3, concentración celular de 4%. En el caso de bovinos, los resultados se interpretarán como negativos en ausencia de anillo teñido y como positivos los que presenten anillo teñido en la superficie (NOM-056-ZOO-1995).

El estudio bacteriológico se debe realizar en muestras de leche, sangre, líquidos corporales o fragmentos de tejidos. La presencia de *Brucella spp* en cualquiera de las muestras, significa que el animal es positivo, aun en ausencia de anticuerpos demostrables por los métodos serológicos (NOM-056-ZOO-1995). Lamentablemente esta prueba no es común en México, además de que los procedimientos bacteriológicos no siempre son exitosos, son tardados y representan un gran riesgo de infección para los técnicos de laboratorio (Leal-Klevezas et al., 1995).

Las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) se basan en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Cultek, 2006).

En la prueba de Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo (IDR-HN) el hapteno nativo es un antígeno de tipo intracelular, por lo que solamente una exposición prolongada de la *Brucella* al sistema inmune, como es el caso de

una infección de campo, produce anticuerpos contra este antígeno y no cuando se trate de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de la revacunación con cepa S19 (González et al., 2006). En el ganado bovino, IDR presenta una alta especificidad para diferenciar animales con infección, demostrada por aislamiento bacteriológico de los vacunados con cepa 19. En el caso más desfavorable, que se da en la vacunación de adultos con la cepa 19, su especificidad es del 80%, superior al 66% de la fijación de complemento (FC). Sin embargo, como ocurre con la FC, la IDR puede ser positiva en bovinos vacunados en la edad adulta o en estado de gestación, cuando se establece una infección permanente en las ubres por la cepa vacunal. El 76.5% de los animales que eliminan la cepa vacunal 19 por la leche, contienen anticuerpos en la sangre frente al poly-B. Esta prueba ha sido aplicada al diagnóstico de la brucelosis bovina dentro de programas de control con buenos resultados (Díaz et al., 2001).

Debido a las desventajas de las pruebas de Rosa de Bengala, Rivanol, Anillo en leche y Fijación del complemento, se empezaron a usar otras pruebas diagnósticas tales como la técnica reacción en cadena de la polimerasa (Fekete et al., 1990), ensayo inmunoenzimático (Carlsson et al., 1976; Boraker et al., 1981) y fluorescencia polarizada (Nielsen et al., 2000); las cuales son más rápidas, económicas y seguras (Renteria et al., 2005; Yu y Nielsen, 2010), ayudan a diferenciar las cepas vacunales S19 Y RB51 (Bricker y Halling, 1995) y tienen un índice mayor de sensibilidad y especificidad (Nielsen, 2002; Gall y Nielsen, 2004).

En el cuadro 1 se pueden observar los valores de sensibilidad y especificidad de algunas pruebas diagnósticas para brucelosis bovina. En los estudios mencionados como referencias para cada prueba con resultados muy bajos se usaron cálculos de sensibilidad y especificidad en relación con otras pruebas serológicas, mientras que los valores más altos se obtuvieron utilizando sueros de bovinos de los que se realizó cultivo de *Brucella abortus* o animales infectados experimentalmente.

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de pruebas serológicas para brucelosis

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencias
SAT	29.1-100	99.2-100	Van Aert et al., 1984; Lord et al., 1989
RBT	21-98.3	68.8-100	Van Aert et al., 1984; Samartino et al., 1999
RIV	50.5-100	21.9-100	Huber y Nicoletti, 1986; Lord et al., 1989; Dajer et al., 1999
2 ME	56.2-100	99.8-100	Stemshorn et al., 1985; Lord et al., 1989; Saravi et al., 1995
CFT	23-97.1	30.6-100	Van Aert et al., 1984; Saravi et al., 1995; Huber y Nicoletti, 1996
IELISA	92.5-100	90.6-100	Dohoo et al., 1986; Rojas y Alonso, 1994
CELISA	97.5-100	99.7-99.8	Samartino et al., 1999; Nielsen y Gall, 2001
FP	99-99.3	96.9-100	Dajer et al., 1999; Nielsen y Gall, 2001

SAT: prueba tubo estandar, RBT: prueba rosa de bengala, RIV: rivanol, 2 ME: prueba 2 mercaptoetanol, CFT: prueba fijación del complemento, IELISA: ensayo inmunoenzimático indirecto, CELISA: ensayo inmunoenzimático competitivo, FP: fluorescencia polarizada.

(Modificado de Nielsen, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El presente estudio se realizó en el estado de Baja California, México en el periodo de febrero a diciembre del 2014; en donde se recolectaron muestras de sangre de hatos ganaderos orientados a la producción de leche, ubicándose en el municipio de Mexicali y Tijuana.

Selección de animales

De tres hatos diferentes, fueron seleccionados un total de 332 animales, sin historial de vacunación contra brucelosis.

Criterio de inclusión

Los animales incluidos en el estudio, fueron hembras mayores de 1 año de edad.

Muestras con constancia "Libre de Brucelosis" otorgado por la SAGARPA, de acuerdo a los criterios que establece la NOM-041-ZOO-1995 y que en su análisis en el laboratorio de Tuberculosis-Brucelosis de la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) resultaron negativos a la prueba de fluorescencia polarizada (FP), fueron consideradas como negativas.

Muestras provenientes de hatos lecheros sin constancia "Libre de brucelosis " otorgado por la SAGARPA, de acuerdo a los criterios que establece

la NOM-041-ZOO-1995 y que en su análisis en el laboratorio de tuberculosis-brucelosis de la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del IICV resultaron positivos a fluorescencia polarizada (FP), fueron consideradas como positivos.

Colección de muestras

Se colectaron 10 ml de sangre en tubos de vidrio estériles sin anticoagulante de la vena coccígea, para su extracción se utilizará un sistema comercial de tubos con vacío y agujas desechables (Vacutainer). Las muestras se identificaron, se colocaron en una hielera y se transportaron al laboratorio de Tuberculosis-Brucelosis del IICV. Tras la formación del coágulo, se separó el suero por centrifugación a 1500 xg durante 10 minutos, el suero se colocó en tubos de microcentrífuga de 2.0 ml y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Análisis de las muestras

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis de la Unidad de Laboratorios Diagnósticos del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad de Baja California.

Como estándar de oro, se utilizó la prueba de fluorescencia polarizada y se realizaron las comparaciones con los resultados de la prueba RB, RIV, IELISA e IDR-HN. Su procedimiento se describe, brevemente, a continuación:

Rosa de Bengala: de acuerdo a la técnica descrita por Alton et al. (1988) y a la NOM-056-ZOO-1995 se utilizó antígeno ABA test al 8% (rosa de

bengala). Se analizó para presencia o ausencia de cualquier grado de aglutinación. Se consideró positiva en presencia de aglutinación.

Rivanol: se utilizó la técnica descrita por Alton et al. (1988) con antígeno oficial autorizado por SAGARPA y solución rivanol al 1%. La prueba se considera positiva cuando hay aglutinación de cualquier grado. En animales no vacunados se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:25 y en animales vacunados con S19, se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:50 (NOM, 1995b).

Fluorescencia Polarizada: de acuerdo a la técnica descrita por Nielsen et al. (1996), se empleó como antígeno un fragmento de 22kD de la porción O del lipopolisacárido de *Brucella abortus* (S-1119.3) proveniente de Diachemix Corp, DLL, EUA. Las lecturas se llevaron a cabo mediante un lector portátil de FPA (Sentry 100, Diachemix Corp, DLL, EUA). La segunda lectura en unidades de milipolarización (mP) indicará la cantidad de anticuerpos presente en el suero. La prueba se consideró válida de acuerdo al criterio de verificación del fabricante, al encontrarse que los sueros controles negativos y positivos se mantuvieron dentro de los valores estándares.

Ensayo inmunoenzimático indirecto: el kit comercial "*Universal indirect enzyme immunoassay for detection of serum antibody to smooth and rough Brucella spp.*" (No. Catálogo 650112-2) fue donado por Peace River Biotechnology Company Limited (China). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Los controles y las muestras se agregaron por duplicado. Las placas fueron incubadas a 26 °C y la densidad óptica fue medida en espectrofotómetro

a 450 nm. La validez de la prueba se estableció según criterios del fabricante, los cuales se cumplieron satisfactoriamente.

Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo: siguiendo la técnica descrita por Díaz et al. (1979). El hapteno nativo fue obtenido a partir de la cepa de *B. melitensis* 16 M, el antígeno se utilizó a una concentración de 1 mg/ ml en un gel de agarosa preparado en una solución amortiguadora de glicina. Se colocaron 15 µl de cada uno de los sueros problemas en cada uno de los pozos en las placas de gel, se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente, realizando la lectura al día siguiente. Se considera positiva, aquella muestra que presente un halo o anillo de precipitación alrededor del pocillo.

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de las características operativas del receptor (Análisis ROC) en las pruebas FP e IELISA para determinar sensibilidad, especificidad y punto de corte óptimo. El cual se realizó mediante el programa estadístico MedCalc® versión 14.12.0, descargado desde la página www.medcalc.org.

En base a las tablas de contingencia 2x2 obtenidas mediante Win Episcopo, se calculó el valor predictivo positivo y negativo, sensibilidad y especificidad de cada prueba estudiada.

Para determinar el nivel de concordancia entre las pruebas diagnósticas se calculó el coeficiente Kappa mediante el paquete estadístico Win Episcopo 2.0 en www.winepi.net/f301.php y se valorizó de acuerdo a Landis y Koch, 1977 (Cuadro 2).

Las estimaciones fueron realizadas con un nivel de significancia de 0.05 admitiendo un error del 5% y un intervalo de confianza del 95%.

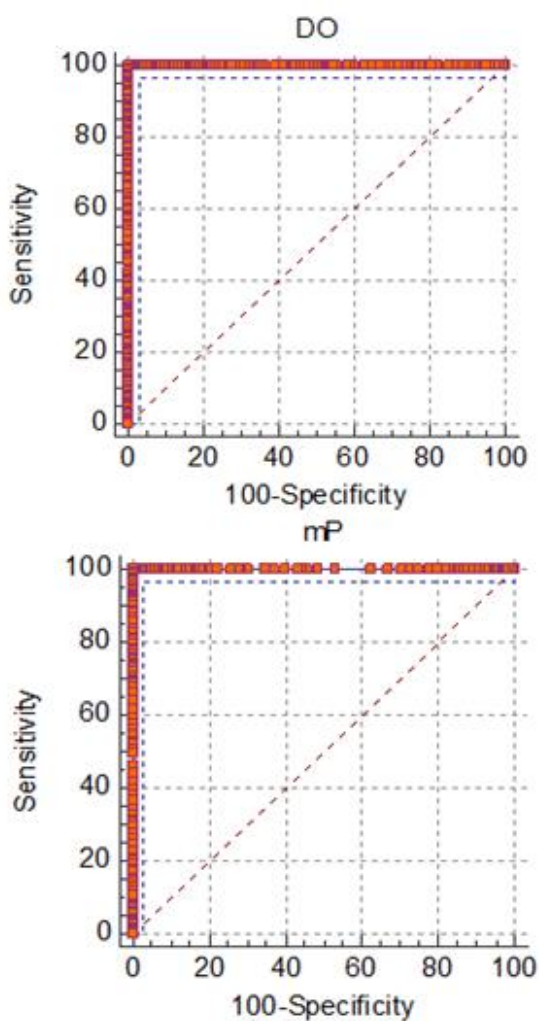
Cuadro 2. Valoración del coeficiente Kappa

Coeficiente Kappa	Fuerza de la 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

(Landis y Koch, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

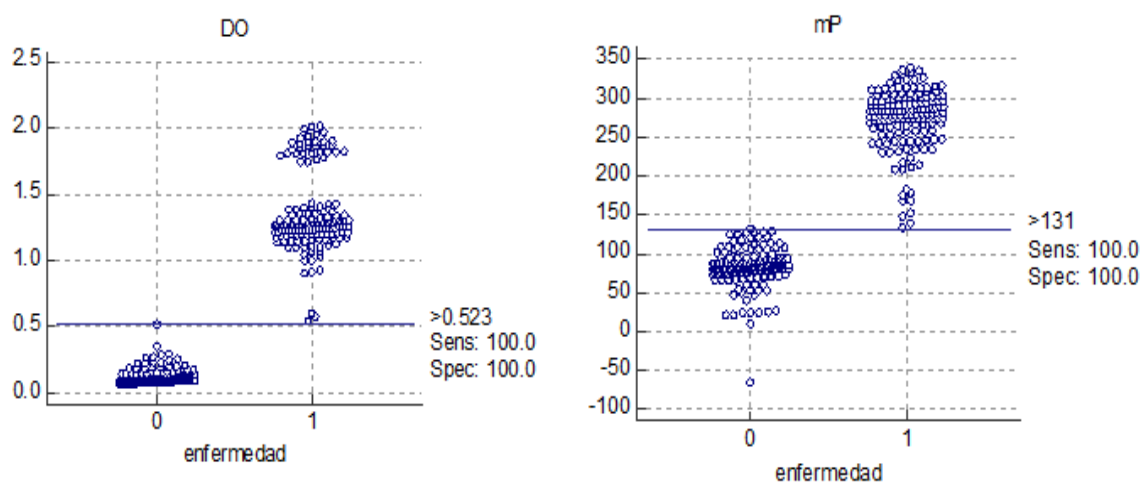
Por medio del programa MedCalc® se usó el análisis ROC y se graficó la curva ROC para la prueba IELISA y FP, para las cuales los punto de corte óptimos fueron de 0.523 DO y 131 mP, respectivamente, obteniendo 100% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo en ambas pruebas y un área debajo de la curva de 1 (Figura 3).



DO: densidad óptica, mP: milipolarizaciones

Figura 3. Curva ROC de IELISA y FP

El diagrama de puntos para IELISA y FP comparado con la ausencia o presencia de enfermedad se muestra en la Figura 4. Donde cada punto representa un resultado. Muestras negativas se muestran como enfermedad=0 y muestras positivas como enfermedad=1. La línea horizontal localizada a 0.523 y 131, respectivamente, representa el punto de corte óptimo calculado por análisis ROC.



DO: densidad óptica, mP: milipolarizaciones

Figura 4. Diagrama de puntos de IELISA y FP

Se consideró positivos los sueros que presentaron cualquier grado de aglutinación en la prueba de Rosa de Bengala, aglutinación a partir de 1:25 en Rivanol, un halo de precipitación en IDR-HN y los puntos de corte mencionados anteriormente para IELISA y FP.

De las 332 muestras, 158 resultaron positivas y 174 negativas a Fluorescencia polarizada (FP), 157 positivas y 175 negativas a Rosa de Bengala (RB), 170 positivas y 162 negativas a Rivanol (RIV), 156 positivas y 176 negativas a Ensayo inmunoenzimático indirecto (IELISA) y 124 positivas y

208 negativas a Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo (IDR-HN) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de pruebas serológicas

Prueba	FP	RB	RIV	IELISA	IDR-HN
Positivo	158	157	170	156	124
Negativo	174	175	162	176	208

FP: fluorescencia polarizada, RB: rosa de bengala, RIV: rivanol, IELISA: ensayo inmunoenzimático indirecto, IDR-HN: inmunodifusión radial con hapteno nativo

Del total de muestras analizadas (n=332), 161 fueron negativas y 120 fueron positivas en todas las pruebas realizadas en este estudio, 28 muestras fueron negativas solo a IDR-HN y 11 muestras fueron negativas a FP y positivas a RIV (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de los resultados de FP con las otras pruebas estudiadas

	FP Positivo	FP Negativo
Positivas a RB, RIV, IELISA e IDR-HN (n=120)	120	
Negativas a RB, RIV, IELISA e IDR-HN (n=161)		161
Negativos solo a IDR-HN (n=28)	28	
Negativa solo a RB (n=1)	1	
Negativa solo a IELISA (n=1)	1	
Negativas solo a FP (n=2)	2	
Positivas solo a RIV (n=8)		8
Positivas a RIV e IELISA y Negativas a RB e IDR-HN (n=3)	3	
Positivas a RB y RIV y Negativas a IDR-HN e IELISA (n=3)	3	
Negativas a IELISA e IDR-HN y Positivas a RB y RIV (n=2)		2
Positiva a RIV y Negativa a RB, IELISA e IDR-HN (n=1)	1	
Positiva a RB, IELISA y Negativa a RIV e IDR-HN (n=1)	1	
Negativa a RB e IDR-HN y Positiva a RIV e IELISA (n=1)		1

FP: fluorescencia polarizada, RB: rosa de bengala, RIV: rivanol, IELISA: ensayo inmunoenzimático indirecto, IDR-HN: inmunodifusión radial con hapteno nativo.

Utilizando una tabla de contingencia 2x2 para cada prueba diagnóstica (Figura 5), se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Para la prueba RB se obtuvo 96.83%, 97.7%, 97.4% y 97.14%, respectivamente. RIV fue de 99.3%, 92.5%, 92.3% y 99.3%, respectivamente. Para IELISA resultaron 96.8%, 98.2%, 98% y 97.1%, respectivamente. Y para IDR fueron 77.2%, 98.8%, 98.3% y 82.6%, respectivamente.

RB	FP			Total
	+	-		
	+	153	4	
-	5	170	175	
Total	158	174	332	
Se: 96.83%		Vp+: 97.4%		
Sp: 97.7%		Vp-: 97.14%		

RIV	FP			Total
	+	-		
	+	157	13	
-	1	161	162	
Total	158	174	332	
Se: 99.3%		Vp+: 92.3%		
Sp: 92.5%		Vp-: 99.3%		

IELISA	FP			Total
	+	-		
	+	153	3	
-	5	171	176	
Total	158	174	332	
Se: 96.8%		Vp+: 98%		
Sp: 98.2%		Vp-: 97.1%		

IDR	FP			Total
	+	-		
	+	122	2	
-	36	172	208	
Total	158	174	332	
Se: 77.2%		Vp+: 98.3%		
Sp: 98.8%		Vp-: 82.6%		

FP: fluorescencia polarizada, RB: rosa de bengala, RIV: rivanol, IELISA: ensayo inmunoenzimático indirecto, IDR: inmunodifusión radial con hapteno nativo

Figura 5. Tablas de contingencia 2x2 para cada prueba diagnóstica y sus respectivos valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo

La concordancia entre FP y las otras cuatro pruebas se muestra en el Cuadro 4. La mayor concordancia fue con la prueba IELISA ($\kappa=0.952$ $p<0.05$), seguida de FP y RB ($\kappa=0.946$ $p<0.05$), entre FP y RIV ($\kappa=0.916$ $p<0.05$) y la menor concordancia fue entre FP e IDR ($\kappa=0.768$ $p<0.05$).

Cuadro 5. Concordancia de Fluorescencia Polarizada con otras pruebas.

Combinación de pruebas	Coefficiente Kappa
FP / RB	0.946
FP / RIV	0.916
FP / IELISA	0.952
FP / IDR	0.768

FP: fluorescencia polarizada, RB: rosa de bengala, RIV: rivanol, IELISA: ensayo inmunoenzimático indirecto, IDR-HN: inmunodifusión radial con hapteno nativo.

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que tiene un gran impacto tanto económico como en la salud pública, por lo que es necesario un diagnóstico sensible y altamente específico con el fin de poder controlarla o erradicarla. El diagnóstico definitivo de la brucelosis se lleva a cabo con el aislamiento de *Brucella spp.* pero los procedimientos bacteriológicos no siempre son exitosos, son tardados y están influenciados por factores como los requisitos de crecimiento altamente exigentes, un menor número de organismos viables en la muestra, retraso en el transporte de la muestra al laboratorio y el potencial peligro para la salud de los trabajadores de laboratorio.

Actualmente en México, el diagnóstico oficial de brucelosis bovina se realiza exclusivamente mediante las pruebas serológicas RB, RIV y FC. El

problema radica en que estas pruebas presentan falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias o anticuerpos vacunales y falsos negativos debido a la falta de detección en la etapa temprana de la enfermedad. Esta es la razón por la que se llevan a cabo varios estudios comparativos para determinar la eficacia de las diferentes pruebas diagnósticas (Nielsen, 2002; Gall y Nielsen, 2004; Ramirez-Pfeiffer et al., 2006; Abernethy et al., 2012; Islam et al., 2013; O'Grady et al., 2014)

El 84.6% (281/332) de las muestras analizadas en este estudio concordaron los resultados en las cinco pruebas examinadas. De las 51 muestras restantes (15.4%), 46 resultaron negativas a IDR y positivas a RIV. No se encontraron estudios en los que se comparen estas pruebas en animales no vacunados, sin embargo, en vacas revacunadas con cepa 19, Bustamante et al., (2000), Aparicio et al., (2003) y González et al., (2006) concuerdan con los resultados de este estudio y coinciden con la premisa de que Rivanol no se considera efectivo para diferenciar anticuerpos producidos por la revacunación, ya que por la existencia de repetidas revacunaciones, hay niveles elevados de IgG que no son debidos a una infección, al contrario de IDR, que es capaz de seguir diferenciando vacas revacunadas de las infectadas.

El LPS de *Brucella* por su localización externa en la célula es el primer antígeno contra el que aparecen inmunoglobulinas de tipo M y G, tanto en la infección como en la vacunación (Moriyón, 1997), contrario a lo que sucede con el Hapteno Nativo, ya que al menos en animales de experimentación, la aparición de anticuerpos precipitantes depende de la intensidad de su estímulo antigénico (Bustamante et al., 2000)

Los resultados de este estudio mostraron que RIV tuvo la mayor sensibilidad (99.3%) e IDR la menor (77.2%), lo contrario ocurrió con la especificidad, donde RIV mostró la más baja con 92.5% e IDR la más alta con 98.8%. En el caso de IELISA y RB tuvieron sensibilidad y especificidad cercanas a las más altas con 96.8%, 98.2% y 96.83%, 97.7%, respectivamente. Asimismo la prueba IELISA tuvo un alto valor predictivo positivo (98%) y negativo (97.1%), igualmente para el coeficiente Kappa (0.952), coincidiendo con lo reportado por Dájer-Abimerhi et al., 1995; Abalos et al., 1998; Nielsen et al., 2004a; Chachra, et al., 2009; Paulin et al., 2009. Cabe señalar que en estos estudios la comparación de IELISA fue con FC y la de este trabajo con FP.

La prueba de fijación del complemento (CFT) se ha establecido también como prueba confirmatoria en Argentina, pero esta práctica tiene una serie de problemas, como dificultades técnicas con el procedimiento, las largas distancias entre las granjas y los laboratorios, los sueros hemolizados y descompuestos en algunos casos, y un número de sueros anticomplementarios, lo que ocasiona que esta prueba sea una solución poco práctica. Lo contrario sucede con FPA, la cual es relativamente barata, requiere un buffer simple, antígeno marcado, tubos de vidrio reutilizables y el equipo necesario para medir la polarización de fluorescencia, que cuesta aproximadamente lo mismo que un fotómetro para inmunoensayo enzimático. Al igual que en otros ensayos de unión primaria y a diferencia de las pruebas convencionales, los datos se obtienen electrónicamente, eliminando la subjetividad y proporcionando un análisis rápido, un registro permanente y fácil dispersión de datos (Nicola et al., 2010).

ELISA tiene una clara ventaja sobre pruebas serológicas convencionales, en que son ensayos de unión primarios que no lo hacen depender de propiedades secundarias de los anticuerpos tales como su capacidad para aglutinar o para fijar el complemento. En segundo lugar, se puede adaptar para ser más específico utilizando reactivos de alta pureza tales como antígenos y anticuerpos monoclonales (Gall et al., 1998). Su punto de corte puede ser ajustado de acuerdo con la prevalencia de enfermedad en la población y no existe diferencia significativa en los valores epidemiológicos cuando se analiza suero tanto de hembras vacunadas como de no vacunadas (Paulin et al., 2009).

Ninguna prueba serológica aislada es adecuada para todas y cada una de las situaciones epidemiológicas, presentando limitaciones en el diagnóstico de animales individuales (Godfroid et al., 2002, Nielsen et al., 2006).

En un análisis separado de los datos, las pruebas en paralelo con IELISA y aglutinación en suero (SAT) aumentó 10% la sensibilidad (91.9%) y sin reducción en la especificidad (100%). Pruebas en paralelo mejoran significativamente la sensibilidad y es especialmente valiosa donde la detección temprana es altamente deseable (Abernethy et al., 2006).

Se deben considerar todos los factores que influyen en la relevancia del método de prueba y de sus resultados para una aplicación o interpretación diagnóstica específica (Organización Mundial de Salud Animal, 2008). Las características diagnósticas de algunos enzimoimmunoensayos (ELISA) y la prueba de la polarización de fluorescencia (FPA) son similares o superiores a la FC y, como son más fáciles de realizar técnicamente y más consistentes, es preferible su utilización (Nielsen et al., 1995, Wright et al., 1997).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de sensibilidad fueron 96.83% para RB, 99.3% para RIV, 96.8% para IELISA y 77.2% para IDR-HN; de especificidad fueron 97.7% para RB, 92.5% para RIV, 98.2% para IELISA y 98.8% para IDR-HN. Bajo estos resultados concluimos que no existe una prueba ideal (alta sensibilidad y especificidad), esto puede deberse a factores asociados a la muestra (edad, estado nutricional o respuesta inmunológica del hospedador, contaminación o deterioro de la muestra), al sistema de prueba (instrumentación, error técnico, calidad del agua, temperaturas de reactivos) o a la respuesta de la prueba (prevalencia y selección de los animales de referencia).

La prueba que mostró una mayor cercanía en este aspecto fue IELISA con un 96.8% de sensibilidad y 98.2% de especificidad, además de una concordancia casi perfecta con el coeficiente kappa más alto de 0.952. La cual sería una alternativa como prueba paralela en el diagnóstico de brucelosis bovina en el estado de Baja California, con una prevalencia moderada en Tijuana de 6.4% y de 6.2% en Mexicali.

Se recomienda realizar más estudios de la prueba IELISA en paralelo a otras pruebas, teniendo en cuenta los factores mencionados anteriormente (muestra, sistema y respuesta de la prueba), así como incluir el aislamiento bacteriológico y reacción en cadena de la polimerasa como pruebas de oro con el fin de comparar sus resultados con pruebas más específicas.

LITERATURA CITADA

Abalos, P., L. Pinochet, L. Ibarra y F. Navia. 1998. Use of an indirect enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis and epidemiological studies of brucella abortus in chile. Disponible en: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/29/067/29067674.pdf. Visitada Dic, 5, 2014.

Abernethy, D. A., F. D. Menzies, S. J. McCullough, S. W. J. McDowell, K. E. Burns, R. Watt, A.W. Gordon, M. Greiner, D. U. Pfeiffer. 2012. Field trial of six serological tests for bovine brucellosis. The Veterinary Journal, 191(3), 364-370.

Abernethy, D.A., F.D. Menzies, D.U. Pfeiffer, L. Stringer, 2006. Does one size fit all? Strategic use of parallel testing for the detection of Brucella abortus. En: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics. Australia. Disponible en: scisearch.org.nz/elibrary/download/64338/T3-3.2.5+-+Does+one+size+fit+all?+Strategic+use+of+parallel+testing+for+the+detection+of+Brucella+abortus. Visitada Dic, 5, 2014.

Acha, N.P. y B. Szyfres, 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, 3ra Edición, vol. 1. Pan American Health Organization, Washington, DC.

- Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus y J.M. Verger. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Editado por Institute National de la Recherche Agropecuaire INRA, París, France.
- Aparicio, B. A., A. E. Díaz, A. L. Hernández, G. R. Pérez, S. E. Alfonseca y G. F. Suárez. 2003. Estudio serológico en bovinos revacunados con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19 y expuestos al desafío natural en un hato infectado Téc Pecu Méx;(41):129-140.
- Arenas GN, A. S. Staskevich, A. Aballay y L.S. Mayorga. 2000. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun.*, 68:4255-4263
- Ariza, J. 1995. Brucelosis. En: Farreras-Rozman, *Medicina Interna*. 13ra Edición. Barcelona: Mosby- Doyma libros S.A., p. 2312-2317.
- Barquero-Calvo, E., E. Chaves-Olarte, D. S. Weiss, C. Guzmán-Verri, C. Chacón-Díaz, A. Rucavado, I. Moriyón y E. Moreno. 2007. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*, 2(7), e631.
- Boraker, D. K., W. R. Stinebring y J. R. Kunkel. 1981. BrucELISA: an enzyme-antibody immunoassay for detection of *Brucella abortus* antibodies in milk: correlation with the *Brucella* ring test and with shedding of viable organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(4), 396.

- Bricker, B. J. y S. M. Halling. 1995. Enhancement of the Brucella AMOS PCR Assay for Differentiation of Brucella abortus Vaccine Strains S19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*, 1640-1642.
- Buddle, M. B. 1956. Studies on Brucella ovis (n. sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *Journal of Hygiene*, 54(03), 351-364.
- Bustamante, S. J., H.F. Salazar, A. E. Díaz, C. C. Manzano, G. R. Pérez y A. L. Hernández. 2000. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de Brucella abortus. *Téc Pecu Méx*;(38):35-42.
- Cantero, J. G., L. Mon, S. Cravero, L. Samartino, S. Conde, G. Gutiérrez, T. Rovira, A. Gil, J. Piaggio y A. Nuñez, 2011. Desarrollo de un nuevo diagnóstico serológico para brucelosis bovina utilizando LPS y cadena del LPS de brucella abortus. *Revista veterinaria argentina*. Volumen XXX N° 281.
- Cardoso, P. G., G. C. Macedo, V. Azevedo y S. C. Oliveira. 2006. Brucella spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories*, 5(1), 13.
- Carlsson, H. E., B. Hurvell y A. A. Lindberg. 1976. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for titration of antibodies against Brucella abortus and Yersinia enterocolitica. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. Section C, Immunology, 84(3), 168.

- Carmichael, L. E. y D. W. Bruner. 1968. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *The Cornell Veterinarian*, 48(4), 579.
- Caroff, M., D. R. Bundle y M. B. Perry. 1984. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O: 9. *European Journal of Biochemistry*, 139(1), 195-200.
- Chachra, D., H.M. Saxena, G. Kaur y M. Chandra. 2009. Comparative efficacy of Rose Bengal plate test, standard tube agglutination test and Dot ELISA in immunological detection of antibodies to *Brucella abortus* in sera. *J. Bacteriology Research*, 1(3): 30–33.
- Cloekaert A, M. Grayon, O. Grépinet y K.S. Boumedine. 2003. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect*, 5:593-602.
- Cloekaert A, J.M. Verger, M. Grayon, J.Y. Paquet, B. Garin-Bastuji, G. Foster y J. Godfroid. 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect*, 3:729-738.
- Cultek. 2006. Fundamentos y tipos de ELISAs. Protocolo y técnicas. En: <http://www.cultek.com/link/link.asp?link=/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-Protocolos.pdf>. Visitada Dic, 5, 2014

- Conde-Álvarez, R., M. J. Grilló, S. P. Salcedo, M. J. De Miguel, E. Fugier, J. P. Gorvel y M. Iriarte. 2006. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cellular microbiology*, 8(8), 1322-1335.
- Corbel, M. J. y M. Banai. 2005. Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2da Edición, vol. 2, part C, pp. 370–386. Editado por D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley y G. M. Garrity. New York: Springer
- Corbel, M. J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging infectious diseases*, 3(2), 213-221.
- de Faria Naves, J. H. F., L. M. Rezende, G. C. Ramos, P. M. Soares, T. C. Tavares, A. M. França, S. M. Neves, N. A. Silva y A. M. Lima-Ribeiro, 2012. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(2), 283-287.
- Dájer-Abimerhi, A., E. J. Gutiérrez-Ruiz, D. Zapata-Villalobos, N. Honhold, y S. L. Villegas-Pérez. 1995. Comparación de cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* y reporte preliminar del porcentaje de reactores positivos en hatos bovinos en Yucatán, México. *Rev Biomed*, 6, 84-90.

- Díaz, E., L. Hernández, G. Valero, B. Arellano. 2001. Diagnóstico de brucelosis animal. ISBN 970-92493-0-4. INIFAP produce. México, pág. 100.
- Díaz, R., P. Garatea, L. M. Jones, y I. Moriyón. 1979. Radial immunodiffusion test with a Brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *Journal of clinical Microbiology*, 10(1), 37-41.
- Dorn, B. R., W. A. Dunn y A. Progulske-Fox. 2002. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cellular microbiology*, 4(1), 1-10.
- Evans, A. C. 1918. Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. II. A comparison of *Bacterium abortus* and *Bacterium bronchisepticus* and with the organism which causes Malta fever. *J. Infect. Dis.*, 22 (6): 580-93.
- Fekete, A., J. Bantle, S. Halling y M. Sanborns. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction. *Journal of applied bacteriology*, 69(2), 216-227.
- Forestier, C., F. Deleuil, N. Lapaque, E. Moreno y J. P. Gorvel. 2000. Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *The Journal of Immunology*, 165(9), 5202-5210.
- Freer, E. 1996. Immunochemical characterisation of Brucella LPS and its relation to virulence. ISBN 91-628-2302-7. Ph.D. Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm.

- Gall, D. y K. Nielsen. 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 23(3), 989.
- Gall, D., A. Colling, O. Marino, E. Moreno, K. Nielsen, B. Perez y L. Samartino. 1998. Enzyme immunoassays for serological diagnosis of bovine brucellosis: A trial in Latin America. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(5), 654-661.
- Gamazo, C. y I. Moriyon. 1987. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infection and immunity*, 55(3), 609-615.
- Garin-Bastuji, B., N. Hummel, G. Gerbier, C. Cau, R. Pouillot, M. Da Costa y J. J. Fontaine. 1999. Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O: 9. *Veterinary microbiology*, 66(3), 223-233.
- Godfroid, J., C. Saegerman, V. Wellemans, K. Walravens, J.J. Letesson, A. Tibor, A. Mcmillan, S. Spencer, M. Sanaa, D. Bakker, R. Pouillot y B. Garin-Bastuji. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.*, 90, 461–477.
- Goldstein, J., T. Hoffman, C. Frasch, E. F. Lizzio, P. R. Beining, D. Hochstein, Y. Lee, R. Dale y B. Golding. 1992. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella*

abortus is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infection and immunity*, 60(4), 1385-1389.

González, M., L. Hernández, y E. Aparicio. 2006. Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 44(2), 269-a.

Huddleson, I. F. 1931. Differentiation of the Species of the Genus *Brucella*. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 21(5), 491-498.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2011. Prevención de Brucelosis en Rumiantes. Manual de capacitación. México.

Islam, M., M. P. Gupta, P. K. Sishu, G. Filia, H. M. Saxena y T. A. Shafi. 2013. Comparative evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay, rose bengal plate test, microagglutination test, and polymerase chain reaction for diagnosis of brucellosis in buffaloes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(3), 306-310.

Ko, J. y G. A. Splitter. 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol.Rev.* 16, 65–78.

- Köhler, S., S. Michaux-Charachon, F. Porte, M. Ramuz y J. P. Liautard. 2003. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named Brucella? Trends in microbiology, 11(5), 215-219.
- Landis, J. R. y G. G. Koch. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. biometrics, p 159-174.
- Lapaque, N., I. Moriyón, E. Moreno y J. P. Gorvel. 2005. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Current opinion in microbiology, 8(1), 60-66.
- Leal-Klevezas, D. S., I. O. Martínez-Vázquez, A. Lopez-Merino y J. P. Martínez-Soriano. 1995. Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. Journal of clinical microbiology, 33(12), 3087-3090.
- Liautard J. P., A. Gross, J. Dornand y S. Kohler. 1996. Interactions between professional phagocytes and Brucella spp. Microbiología, 12:197-206.
- MacNeal, W. J. y J. E. Kerr. 1910. Bacillus Abortus† of Bang, the Cause of Contagious Abortion in Cattle. Journal of Infectious Diseases, 7(3), 469-475.
- Meyer, K. F. y E. B. Shaw. 1920. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of B. abortus and B. melitensis: Studies on the genus Brucella. Nov. Gen. I. The J. Infect. Dis., 27: 173–84.

- Moreno, J. F., T. B. Rentería, R. Searcy, y M. F. Montaña. 2002. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 40(3).
- Moreno, E., D. Borowiak y H. Mayer. 1987. Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 138:102-105.
- Moreno, E., L. M. Jones y D. T. Berman. 1984. Immunochemical characterization of rough Brucella lipopolysaccharides. *Infection and immunity*, 43(3), 779-782.
- Moreno, E., D. T. Berman y L. A. Boettcher. 1981. Biological activities of Brucella abortus lipopolysaccharides. *Infection and immunity*, 31(1), 362-370.
- Moriyón, I. e I. López-Goñi. 1998. Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(1), 19.
- Moriyón, U. I. 1997. Brucella cell structure En: Memory to 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago ILL, USA, November 8-9, 3-18.
- Muñoz, P. M., C. M. Marín, D. Monreal, D. González, B. Garin-Bastuji, R. Díaz y J. M. Blasco. 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 and diagnostic laboratory immunology*, 12(1), 141-151.

Nicola, A. M., S. Elena, B. Alonso y J. Esteves. 2010. Evaluation of the Fluorescence Polarization Assay (FPA) for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats in Argentina. *Prilozi*, 31, 133-143.

Nielsen, K., P. Smith, W. Yu, P. Nicoletti, G. Jurgensen, J. Stack, y J. Godfroid, 2006. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 109, 69–78.

Nielsen, K., P. Smith, W. Yu, P. Nicoletti, P. Elzer, A. Vigliocco, P. Silva, R. Bermúdez, T. Renteria, F. Moreno, A. Ruiz, C. Massengill, Q. Muenks, K. Kenny, T. Tollersrud, L. Samartino, S. Conde, G. Draghi de Benitez, D. Gall, B. Perez y X. Rojas. 2004a. Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric Protein A–Protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species. *Veterinary microbiology*, 101(2), 123-129.

Nielsen K., P. Smith, J. Widdison, D. Gall, L. Kelly, W. Kelly y P. Nicoletti 2004b. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O:157:H7. *Vet Microbiol*, 100, 25-30.

- Nielsen, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary microbiology*, 90(1), 447-459.
- Nielsen, K. y D. Gall. 2001. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 22(3), 183-201.
- Nielsen, K., M. Lin, D. Gall y M. Jolley. 2000. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods*, 22(1), 71-76.
- Nielsen, K., D. Gall, M. Jolley, G. Leishman, S. Balsevicius, P. Smith, P. Nicoletti y F. Thomas. 1996. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of Immunological Methods*, 195(1), 161-168.
- Nielsen, K., L. Kelly, D. Gall, P. Nicoletti y W. Kelly. 1995. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 46, 285–291.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. SAGARPA. Diario Oficial de la Federación. México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas

aprobados en materia zoosanitaria. SAGARPA. Diario Oficial de la Federación. México.

O'Callaghan, D. y A. M. Whatmore. 2011. Brucella genomics as we enter the multi-genome era. *Briefings in functional genomics*, 10(6), 334-341.

O'Grady, D., W. Byrne, P. Kelleher, H. O'Callaghan, K. Kenny, T. Heneghan, S. Power, J. Egan, y F. Ryan. 2014. A comparative assessment of culture and serology in the diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 199(3), 370-375.

Organización Mundial de Salud Animal. 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.

Organización Mundial de Salud Animal. 2009. Manual de Diagnóstico serológico de Brucelosis Bovina.

Pappas, G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou y Tsianos, E. V. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases*, 6(2), 91-99.

Paulin, L. M. S., W. A. Andrade-Pacheco, V. Castro y I. S. P. Federsoni. 2009. Evaluation among four serological techniques of *Brucella abortus* infection in bovines. *Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo*, 76(1), 9-15.

Peace River Biotechnology Company Limited. Universal indirect enzyme immunoassay for detection of serum antibody to smooth and rough *Brucella* spp. Catalogue number 650112-2. Republic of China.

- Pizarro-Cerda, J, S. Meresse, R. G. Parton, G Van der Goot, A. Sola-Landa, I. Lopez-Goni, E. Moreno y J. P. Gorvel. 1988. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, 66:5711-5724.
- Poester, F. P., K. Nielsen, L. E. Samartino y W. L. Yu. 2010. Diagnosis of brucellosis. *Open Veterinary Science Journal*, 4(1), 46-60.
- Porte, F., A. Naroeni, S. Ouahrani-Bettache y J. P. Liautard. 2003. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and immunity*, 71(3), 1481-1490.
- Porte F, J. P. Liautard y S. Kohler. 1999. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun*, 67:4041-4047.
- Qureshi, N., K. Takayama, U. Seydel, R. Wang, R. J. Cotter, P. K. Agrawal, C. A. Bush y D. T. Berman. 1994. Structural analysis of the lipid A derived from the lipopolysaccharide of *Brucella abortus*. *Journal of Endotoxin Research*, 1(3), 137-148.
- Ramirez-Pfeiffer, C., K. Nielsen, F. Marin-Ricalde, C. Rodríguez-Padilla y R. Gomez-Flores. 2006. Comparison of fluorescence polarization assay with card and complement fixation tests for the diagnosis of goat brucellosis in a high-prevalence area. *Veterinary immunology and immunopathology*, 110(1), 121-127.

- Rentería, T. B., H. Organes, A. F. Licea, G. E. Medina, K. Nielsen, M. F. Montaña, J. F. Moreno, y L. C. Pujol. 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. *Téc Pecu Méx*, 43(1), 117-126.
- Rentería, T. B., K. Nielsen, A. F. Licea, M. F. Montaña y J. F. Moreno. 2003. Evaluación de un programa de control de la brucelosis bovina en hatos lecheros de Baja California. *Técnica Pecuaria en México*, (3), 275-282.
- Salman, M. D., M. E. Meyer y D. W. Hird. 1984. Epidemiology of bovine brucellosis in the Mexicali Valley, Mexico: data gathering and survey results. *American journal of veterinary research*, 45(8), 1561-1566.
- Scholz, H. C., K. Nöckler, C. Göllner, P. Bahn, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Dahouk, P. Kampfer, A. Cloeckaert, M. Maquart, M. Zygmunt, A. Whatmore, M. Pfeffer, B. Huber, H-J. Busse y B. K. De. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(4), 801-808.
- Scholz, H. C., Z. Hubalek, I. Sedláček, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, F. Melzer, P. Kämpfer, H. Neubauer, A. Cloeckaert, M. Maquart, M. S. Zygmunt, A. M. Whatmore, E. Falsen, P. Bahn, C. Göllner, M. Pfeffer, B. Huber, H-J. Busse y K. Nöckler. 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 375-382.

- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2015. En:
<http://www.senasica.gob.mx/?id=4414>
- Stevens, M. G., S. C. Olsen y N. F. Cheville. 1995. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. immunology and immunopathology*, 44(3), 223-235.
- Stoenner, H. G. y D. B. Lackman, 1957 A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *Am. J. Vet. Research*, 18, 947-951.
- Vassallo, D. J. 1992. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. *Journal-royal army medical corps*, 138, 140-140.
- Weynants, V., A. Tibor, P. A. Denoel, C. Saegerman, J. Godfroid, P. Thiange y J. J. Letesson. 1996. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O: 9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Veterinary microbiology*, 48(1), 101-112.
- Wright, P.F., K. Tounkara, M. Lelenta y M.H. Jeggo. 1997. International reference Standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev. Sci. Tech.*, 3, 824–832.
- Yu, W. L. y K. Nielsen. 2010. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croatian medical journal*, 51(4), 306-313.