

PROSPECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella spp.* EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL CANTÓN MEJÍA

E. Miño-Vega¹⁻², F. Pico-Melendez¹⁻², J. Ron-Roman¹,
M. Celi-Erazo¹, M. Chavez-Larrea¹, F. Proaño-Perez¹,
J. Brandt³, & W. Benitez-Ortiz¹⁻².

¹Centro Internacional de Zoonosis, Universidad Central del Ecuador.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador.

³Instituto de Medicina Tropical de Amberes - Bélgica.



Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de anticuerpos (Ac) contra *Brucella* spp., en bovinos (n=1012) de explotaciones ganaderas (n=59) del cantón Mejía provincia de Pichincha, tres pruebas serológicas: Rosa de Bengala (RB), Antígeno Buferado en Placa (BPA) y “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto (iELISA), fueron realizadas. El presente estudio permitió poner en

evidencia el alto porcentaje de animales portadores de Ac, así: 13.53% (137/1012) a RB, 18.97% (192/1012) a BPA y 32.01% (324/1012) a iELISA.

Adicionalmente, la aplicación de una encuesta epidemiológica permitió determinar la existencia de posibles factores predisponentes para el apareamiento de esta enfermedad, los cuales serían: presencia de abortos en los animales, incorrecto manejo del material abortado y de excretas, presencia de otras especies animales en la finca, e inexistencia de medidas sanitarias adecuadas, entre las principales.

Palabras Claves: brucelosis, bovinos, diagnóstico, pruebas de aglutinación, iELISA, cantón Mejía, Pichincha, Ecuador

Autor de correspondencia:

Dr. Jorge Ron Román M.Sc.

Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), 3^{er} piso Hospital del Día, Universidad Central del Ecuador. Apartado 17-03-100. Telefax (593.2)2904-801. Quito-Ecuador. e-mail: jron-ciz@ac.uce.edu.ec

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecto contagiosa, causada por bacterias del género *Brucella*. Los organismos internacionales la han considerado como la zoonosis más difundida en el mundo (Gil & Samartino, 2000), llegando a estimarse que entre 400 y 500 mil nuevos casos de

brucelosis humana, se producirían cada año a nivel mundial (Álvarez, 2001).

Las personas y animales, adquieren esta enfermedad, por el contacto directo con animales infectados, material contaminado, por ejemplo: fetos, membranas fetales, secreciones vaginales y por la ingestión de productos lácteos contaminados. En animales, esta enfermedad puede cursar de forma asintomática o manifestar una sintomatología que se traduce en abortos, infertilidad, esterilidad, muerte de crías, disminución de la producción láctea, interrupción de programas de mejoramiento genético, depreciación de los animales enfermos y retraso del crecimiento. Según Acha & Szyfres (1986), las pérdidas económicas por brucelosis bovina en América Latina, ascienden a 600 millones de dólares anuales. Según el Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (SESA), actual AGROCALIDAD, la brucelosis estaría distribuida en todo el Ecuador, estimándose que las pérdidas económicas anuales a causa de esta enfermedad ascenderían a 5.4 millones de dólares. (MAGAP – AGROCALIDAD, 2009).

Los objetivos del presente estudio fueron: determinar la presencia de anticuerpos (Ac) contra *Brucella* spp., en bovinos de haciendas del cantón Mejía, ubicadas en la provincia de Pichincha; utilizando los métodos de diagnóstico Rosa de Bengala (RB), Antígeno Buferado en Placa (BPA) y “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto (iELISA); así como, determinar los posibles factores que predisponen el apareamiento de esta enfermedad, en los animales examinados.

Materiales y Métodos

Descripción de la muestra

Durante el período comprendido entre los meses de julio a noviembre del 2002, un total de 1012 muestras sanguíneas, fueron recolectadas de bovinos procedentes de 59 explotaciones ganaderas localizadas en el Cantón Mejía, provincia de Pichincha. Según el número de bovinos existentes, las explotaciones ganaderas fueron previamente clasificadas como: pequeñas (de 1 a 25 bovinos), medianas (de 26 a 70 bovinos) y grandes (más de 70 bovinos). La muestra presentó la siguiente distribución: 32.8% en 28 explotaciones pequeñas, 34.9% en 16 explotaciones medianas, y 32.3% en 15 explotaciones grandes.

Encuesta epidemiológica

Mediante la aplicación de una encuesta epidemiológica, se recopiló información sobre la explotación ganadera en estudio, parámetros como: nombre de la explotación ganadera, ubicación, inventario de bovinos, aspectos de bioseguridad fueron analizados. Adicionalmente, de cada uno de los animales muestreados, se recopiló información sobre: edad, sexo, raza, vacunas administradas contra brucelosis, número de partos y número de abortos.

Toma de muestras serológicas

Las muestras serológicas, tomadas de la vena caudal, en tubos Vacutainer® de 10 ml, fueron transportadas al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ). Cada muestra fue centrifugada e identificada; luego de la

realización de las pruebas diagnósticas, las muestras fueron almacenadas a -20°C .

Pruebas diagnósticas empleadas

Para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, las pruebas de aglutinación rápida en placa Rosa de Bengala (RB) y del Antígeno Buferado en Placa (BPA), así como el "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto (iELISA) fueron empleadas en el presente estudio. Las pruebas fueron ejecutadas según lo descrito por Alton, *et al* (1988) y Godfroid & Boelaert (1995).

Prueba Rosa de Bengala (RB)

El antígeno utilizado fue el Bengatest® de la casa comercial Synbiotics (Código # ABGT), que consiste en una suspensión de *Brucella abortus* (8% v/v) (cepa 99 de Weybridge) inactivada por calor y fenol (al 5%) y coloreada con Rosa de Bengala. Los sueros controles positivo (SC+) y negativo (SC-), así como los sueros a investigar y el antígeno (Ag), se mantuvieron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de efectuar la prueba. Seguidamente, sobre una placa alveolada de vidrio se colocaron 30 μl de suero a investigar y 30 μl de Ag; luego de mezclar los dos componentes, se imprimió a la placa un movimiento ondulante por 4 minutos. Los sueros fueron considerados positivos si existía la presencia de aglutinación.

Prueba de Antígeno Buferado en Placa (BPA)

Para la prueba BPA, el antígeno Brucélico - BPA (SENASA Cert. # 93068), fue utilizado, mismo que consiste en una

suspensión concentrada (11% v/v) de *Brucella abortus* cepa 119-3, amortiguada con ácido láctico y coloreada con verde brillante y cristal violeta. El Ag, así como los sueros a investigar, sueros controles positivos (SC+) y negativos (SC-) se mantuvieron durante 30 minutos fuera del refrigerador para que alcancen la temperatura ambiente, previa la realización de la prueba. Posteriormente se colocaron 80 µl de suero a investigar y 30 µl de Ag sobre una placa alveolada de vidrio, se mezcló con un agitador, y se imprimió movimientos rotatorios durante 20 segundos, luego de un periodo de reposo de 5 minutos, nuevamente se efectuaron movimientos rotatorios durante 20 segundos, y se dejó reposar por 3 minutos. Las muestras fueron consideradas positivas, si existía presencia de aglutinación.

Prueba “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto (iELISA)

Prevía la realización de la prueba iELISA, los siguientes procedimientos fueron realizados:

1. Sensibilización de placas. Placas de poliestireno fueron sensibilizadas con Lipopolisacárido (LPS) (1µg/ml), para lo cual 100 µl de LPS, disuelto en tampón Glicina-Cloruro de sodio (GS), fueron añadidos a cada cúpula; las placas fueron incubadas a 37° C por 3:50 horas, y colocadas a 4° C por 12 horas.
2. Dilución de sueros a investigar. Los sueros a investigar fueron diluidos (1/50 v/v) en tampón Glicina-EDTA-Tween-80 (GS-EDTA-Tw80).
3. Dilución de la curva de calibración. Seis diluciones (1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, 1/8640) de suero positivo fueron preparadas en tampón GS al cual, se adicionó 10% de suero negativo (Tampón BS).
4. Lavado de microplacas. Luego de cada fase del iELISA, las microplacas fueron lavadas con una solución a base de Cloruro de sodio y Tween-20. El procedimiento consistió en eliminar el contenido de la microplaca, y adicionar la solución de lavado a cada cúpula; esta operación se repitió por 5 veces en cada fase de lavado.

El procedimiento del iELISA contempló las siguientes fases: 1) Las placas previamente sensibilizadas, fueron lavadas, luego de lo cual se distribuyeron 50 µl de cada dilución de la curva de calibración, de los tampones GS y BS, así como de los sueros a investigar, en las cúpulas respectivas según la hoja de protocolo. 2) Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego de una nueva fase de lavado se adicionaron a cada cúpula 50 µl del conjugado, el cual fue diluido en el tampón G – HRPO (tampón a base de Hidrógeno fosfato de disodio, Cloruro de sodio, Tween-80, NBCS). 3) Luego de una fase de incubación por 1 hora a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas y se adicionaron 100 µl de sustrato (OPD), las placas fueron incubadas en oscuridad por 20 minutos. 4) La reacción fue parada adicionando a cada cúpula 25 µl de ácido sulfúrico (2M), y se procedió a realizar la lectura, en un espectrofotómetro con filtros de entre 492 nm y 630 nm. Los valores promedio de las densidades ópticas (DO) de la curva y de los sueros a investigar fueron

corregidos sustrayendo de ellos el valor promedio de la DO del tampón GS. El "Cut Off" fue la DO de la dilución 1/8640.

Resultados

Al analizar las 1012 muestras, a través de la prueba Rosa de Bengala, se obtuvo un total de 137 (13.53%) muestras positivas que presentaron anticuerpos contra *Brucella* spp.; de las cuales 55 (40.14%) en explotaciones pequeñas, 45 (32.84%) en explotaciones medianas y, 37 (27%) correspondieron en explotaciones grandes.

A la prueba del Antígeno Buferado en Placa (BPA), se obtuvieron 192/1012 (18.97%) sueros positivos, con la siguiente distribución: 76 (39.58%) en explotaciones pequeñas, 62 (32.29%) en explotaciones

medianas y, 54 (28.12%) correspondieron a explotaciones grandes.

A través del método iELISA, se obtuvo un total de 324/1012 (32.01%) muestras positivas, de las cuales 102 (31.48%) pertenecieron a explotaciones pequeñas, 112 (34.56%) a explotaciones medianas y, 110 (33.95%) a explotaciones grandes.

El Cuadro No. 1, presenta la distribución de los sueros positivos a las pruebas diagnósticas, según el tipo de explotación.

De las 991 hembras muestreadas, 137 (13.82%) arrojaron un resultado positivo a la prueba RB, 192 (19.37%) a la prueba BPA y, 324 (32.69%) al iELISA; con relación a los machos (n=21), 1 (4.76%) fue positivo a la prueba de BPA y 4 (19.04%) a la prueba iELISA, como se presenta en el cuadro No. 2.

Cuadro No. 1.

Resultados obtenidos a las pruebas RB, BPA y iELISA, según el tipo de explotación ganadera.

Prueba diagnósticas	Tipo de explotación						Total de muestras	
	Pequeñas		Medianas		Grandes			
	Muestras positivas		Muestras positivas		Muestras positivas		No	%
	No	%	No	%	No	%		
RB	55	40.14	45	32.84	37	27.00	137	13.53
BPA	76	39.58	62	32.29	54	28.12	192	18.97
iELISA	102	31.48	112	34.56	110	33.95	324	32.01

(RB) Rosa de Bengala, (BPA) Antígeno Buferado en Placa, (iELISA) "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto, (No) número, (%) porcentaje

Cuadro No. 2

Relación de los casos positivos a brucelosis según el sexo.

Pruebas diagnósticas	Casos positivos				Total positivos	
	85		Hembras			
	No	%	No	%	No	%
RB	0	0	137	13.82	137	13.82
BPA	1	4.76	191	19.27	192	19.37
iELISA	4	19.04	320	32.29	324	32.69

(RB) Rosa de Bengala, (BPA) Antígeno Beferado en Placa, (iELISA) "Enzyme Linked Immunosorvent Assay" indirecto, (No) número, (%) porcentaje

Del total de hembras analizadas (n=991), 175 (17.65%) presentaron abortos, con la siguiente distribución: 92/325 (28.30%) procedentes de explotaciones grandes, 50/350 (14.28%) de explotaciones medianas y 33/316 (10.44%) de ex-

plotaciones pequeñas. El Cuadro No. 3 presenta el destino de los productos abortados según el tipo de explotación.

Al realizar el análisis del tipo de vacunación contra brucelosis, que se efec-

Cuadro No. 3

Destino de los abortos, por tipo de explotación.

Destino de los abortos	Tipo de explotación					
	Pequeñas		Medianas		Grandes	
	No	%	No	%	No	%
Ingeridos por perros	3	17.64	2	12.5	2	13.53
Enterrados	12	70.58	14	87.5	13	86.67
Arrojados a basura	1	5.88	0	0	0	0
Consumidos por personas	1	5.88	0	0	0	0
Total	17	100	16	100	15	100

(No) número, (%) porcentaje

Cuadro No. 4
Tipo y distribución de vacunas contra brucelosis,
empleadas en las 59 explotaciones.

Vacuna	Explotación						Total	
	Pequeñas		Medianas		Grandes			
	No	%	No	%	No	%	No	%
Cepa19	4	14.28	10	62.50	4	26.66	18	30.50
RB51	0	0	1	6.25	10	66.60	11	18.64
Ninguna	24	85.71	5	31.25	1	6.66	30	50.84
Total	28	100	16	100	15	100	59	100

(No) número, (%) porcentaje

túa en cada una de las explotaciones muestreadas, se obtuvieron los siguientes resultados: de las 59 explotaciones analizadas, 18 (30.50%) vacunan a los bovinos con “Cepa 19”, 11 (18.64%) con “RB51” y 30 (50.84%) no vacunan a sus animales. El Cuadro No 4, presenta el tipo y distribución de la vacuna contra brucelosis empleada en las diferentes explotaciones.

Adicionalmente, la encuesta epidemiológica permitió poner en evidencia que el 67.7% de las explotaciones tienen ordeño mecánico y el restante 32.20% recurren al ordeño manual de las vacas; la inseminación artificial estuvo presente en el 66.1% de las explotaciones analizadas.

En cuanto al agua de bebida de los animales, en el 74.5% de las explotaciones proviene de acequias; en el 93.2% de las explotaciones, las excretas son utilizadas como abono de los potreros. También se observó que únicamente el 3.38% de las explota-

ciones realizaban cuarentena de animales nuevos antes de introducirlos al hato, y que solo el 20.3% de las explotaciones restringe el ingreso de personas extrañas a la explotación. La encuesta permitió constatar la inexistencia de un calendario coordinado de vacunación contra brucelosis, así como la inexistencia de registros sobre: vacunación, periodo inter-partos y abortos.

Discusión

Discusión de los resultados obtenidos en el laboratorio.

La aplicación de la prueba RB, en los bovinos (n=1012) del cantón Mejía, permitió determinar que el 13.53% de los animales analizados, presentaban anticuerpos contra *Brucella* spp.; estos resultados mantienen una estrecha relación a los observados por Ron (2003), quien deter-

minó la existencia del 12.59% (65/516) de bovinos sero-positivos en dicha zona.

En el año 1979, dos estudios fueron realizados en la provincia de Pichincha, con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos en bovinos; según el Programa Nacional de Sanidad Animal (PNSA) citado por el Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuario (SESA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el 4.85% (77/1585) de los bovinos muestreados fueron positivos (MAG-SESA, 1999), por su parte Maldonado & Salgado (1979) determinaron que el 40% (98/245) de los bovinos analizados, presentaron resultados positivos. Esta amplia variación en los resultados, estaría en relación con la falta de un control de calidad de los reactivos empleados y la falta de un control en el procedimiento mismo. Para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos en el presente trabajo, sueros controles negativos y positivos de Francia y Bélgica fueron incorporados a cada serie de pruebas diagnósticas realizadas.

El presente estudio permitió determinar que el 18.97% (192/1012) de los animales analizados, presentaban resultados positivos a la prueba BPA. Una alta correlación de los resultados entre las pruebas BPA y RB fue observado, sin embargo, debido a la alta sensibilidad del BPA (Miranda *et al.* 2002), 55 (5.44%) sueros negativos a RB fueron detectados como positivos por el BPA.

El 32.01% (324/1012) de los sueros analizados, presentaron resultados positivos al iELISA, de esta forma se puso en evidencia la confiabilidad de las prue-

bas inmunoenzimáticas, en relación a las pruebas de aglutinación en placa, como lo señalan otros autores (Saravi *et al.* 1994; Dajer *et al.* 1998). La alta sensibilidad y especificidad (90% - 100%) (Dohoo *et al.* 1986; Rojas & Alonso, 1994; citados por Nielsen, 2002) de la prueba iELISA para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp., están basadas en la combinación de una unión antígeno - anticuerpos (específica), con un sistema de visualización (sensibile), en el cual la señal de color está en proporción directa a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra (Bautista & Ochoa, 2001)

Las pruebas serológicas utilizadas en rutina poseen ventajas como por ejemplo: su **relativa** fácil implementación y un **costo aceptable** (Ariza, 2002); desafortunadamente poseen también desventajas, debido a que están basadas en la detección de anticuerpos contra el LPS liso (Garin-Bastuji, 1993), poseen reacciones falsas positivas con bacterias Gran negativas, ya que estas comparten el epitope del LPS (Gerbier *et al.* 1997; Pouillot *et al.* 1997; López-Merino, 2002; FAO & OMS, 1986). Adicionalmente, se debe tomar en consideración, que los anticuerpos generados por la vacuna Cepa-19, producen reacciones cruzadas en las pruebas diagnósticas, especialmente en las de aglutinación rápida en placa (Rivera & Curiel, 1993 citados por Vargas, 2002)

Aunque para Ragan (2002), en los bovinos esta enfermedad pasa desapercibida, siendo el único signo el aborto en la primera gestación y durante el última tercio de la misma, también pueden guiar el diagnóstico la presencia de: nacimiento de

terneros débiles, retenciones placentarias, metritis, orquitis epididimitis (Bercovich, 2000). En el este estudio, se evidenció un alto porcentaje 17.65% (175/991) de vacas que presentaron abortos en las 59 explotaciones analizadas.

A pesar de que la encuesta epidemiológica aplicada en las explotaciones, indica la utilización de vacunas contra brucelosis en los bovinos: 30.5% (18/59) de las explotaciones vacunan con Cepa-19, 18.64% (11/59) vacunan con RB-51; la existencia de resultados positivos a las pruebas de diagnóstico, introduce la hipótesis sobre el inadecuado manejo y aplicación de las vacunas, esto se evidencia por la inexistencia de un registro específico sobre vacunación contra brucelosis. Adicionalmente se pudo determinar que un alto porcentaje de la explotaciones ganaderas 50.84% (30/59), no vacunan a sus animales contra esta enfermedad. A pesar de que los resultados obtenidos por los laboratorios de diagnóstico, y los organismos estatales de control, demuestran una alta prevalencia de esta enfermedad, no existe información sobre los posibles biotipos de *Brucella* spp, existentes en el Ecuador. A esto se podrían añadir otros posibles factores de riesgo en la introducción y/o mantenimiento de la brucelosis en las explotaciones ganaderas: existencia de ordeño manual, método reproductivo (monta natural), eliminación inadecuada de productos abortados, incorrecta eliminación o tratamiento de excretas, procedencia del agua de bebida, presencia de otras especies animales (posibles reservorios de la enfermedad), medidas sanitarias y de bioseguridad inadecuadas, malas prácticas de manejo e inadecuada aplicación de vacunas.

Agradecimientos

Nuestro más sincero agradecimiento a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta investigación: a la Universidad Central del Ecuador (UCE), a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), así como a los propietarios de las explotaciones ganaderas del cantón Mejía que participaron en el estudio.

Bibliografía

Acha P. & Szyfres B., 1986. Brucelosis. En: *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y los Animales*. Segunda edición, OPS & OMS editors. Nueva Editorial Interamericana, Washington. pp. 14-24.

Alton G.G., Jones L., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. 1st adn. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris – Francia.

Alvarez P. 2001. Situación de la brucelosis en América: panorama general. In: *Diagnóstico de Brucelosis Animal*. Díaz E., Hernández L., Valero G. & Arellano B., editors. México, pp. 9-16.

Ariza J., 2002. Brucelosis: aspectos actuales de principal interés. *Control Calidad SEIMC*. http://www.seimc.org/control/revi_Sero/brumcli.htm 1-4

Bautista M. & Ochoa V. 2001 Técnicas de inmunoensayo ligadas a enzimas. In:

Diagnóstico de Brucelosis Animal. Díaz E., Hernández L., Valero G. & Arellano B., editors. México, pp. 92 - 95.

Bercovich Z. 2000. The use of skin delayed-type hypersensitivity as adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review. *Veterinary Quarterly*. **22**: 123-130.

Dajer A., Gutiérrez E. & Zapata D. 1998. Uso de las pruebas ensayo Inmunoabsorbent ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán, México.

<http://bvs.insp.mx/componen/svirtual/ppriori/05/1099/arti.htm>.

FAO & OMS. 1986. *Comité Mixte FAO/OMS d'Experts De La Brucellose. Setiem Rapport*. Organisation Mondiale de la Santé, Genève - Suisse.

Garin-Bastuji B. 1993. Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses diffiltés. Le cas de sérologie atypiques en brucelloses bovine. *Point Vét*. **25**:115-124

Gerbier G., Garin-Bastuji B., Pouillot R., Véry P., Cau C., Berr V., Dufour B. & Moutou F. 1997. False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* O:9 in a field trial. *Vet. Res*. **28**: 375-383

Gil A. & Samartino L. 2000. Zoonosis en los sistemas de producción animal en las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. *Food and Agriculture Organization. Livestock Information and Policy Branco, AGAL*.

<http://www.fao.org/ar/AGA/LSPA/papers/policypapers02.pdf1-65>.

Godfroid, J., & Boelaert, F. 1995. Prescriptions pour le diagnostic sérologique de la brucellose. NIDO-INRV - Belgium, pp 1-13 et 35-41.

López - Merino A. 2002. Brucella. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libos/microbios/Cap7>.

MAG-SESA, 1999. Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria.

MAGAP-AGROCALIDAD, 2009. Programa nacional de control de brucelosis bovina. Proceso de sanidad animal, programas específicos.

Maldonado P. & Salgado G. 1979. *Diagnóstico De La Brucelosis Con Antígeno Tamponado y La Prueba De Inactivación Por Calor a 65°C, En Muestras Positivas y Sospechosas a La Aglutinación Rápida En Placa*. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador.

Miranda A., Báez E. & Tarabla H. 2002. Valor predictivo positivo de una modificación a la técnica del BPA para el diagnóstico de brucelosis bovina y concordancia con el BPA tradicional:

http://rafaela.inta.gov.ar/anuario2001/a2001_80.htm.

Nielsen K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol*. **90**: 447-459.

Pouillot R., Garin-Bastuji B., Gerbier G., CocheY., Cau C., Dufour B. & Moutou F. 1997. The Brucellin skin test as a toll to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.* **28**: 365-374

Ragan V.E. 2002. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.* **90**: 11-18.

Ron J. 2003. *Validación De Técnicas Diagnóstica Para La Detección De Brucelosis y Estudio Epidemiológico En Una Región Andina Del Ecuador*. Tesis presentada para la obtención del grado de Master en Ciencias (Master of Science M.Sc.) en Salud Animal. Instituto de Medicina Tropical, Príncipe Leopoldo. Departamento de Sanidad Animal Tropical. Tesis N° 118, Amberes – Bélgica.

Saravi M., Wright P., Gregoret R. & Gall D. 1994. Comparative performance of the enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine Brucellosis in Argentina. *Vet. Imm. and Immunopath.* **47**:93-99.

Vargas O. 2002. Brucellosis in Venezuela. *Vet. Microbiol.* **90**: 39-44.

