

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *BRUCELLA SPP.*, EN EXPLOTACIONES GANADERAS DE LOS CANTONES SANTO DOMINGO Y EL CARMEN

Angulo-Cruz, A.^{1,2}; Tufiño-Acosta, A.^{1,2}; Ron-Román, J.¹; Celi-Erazo, M.¹;
Egas-Dávila, R.^{1,2}; Benítez-Ortiz, W.^{1,2}.

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador.

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

Resumen. Se recopilaron un total de 1.200 muestras sanguíneas de bovinos procedentes de explotaciones de los cantones El Carmen (n = 463) y Santo Domingo (n = 737). Para el diagnóstico de brucelosis, en esta investigación se utilizaron tres métodos de diagnóstico: Skin Test (ST) para discriminar reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica*, mientras que Rosa de Bengala (RB) y Enzyme Linked Immunosorbent Assay indirecto (i-ELISA), como pruebas serológicas. En el cantón El Carmen se encontraron prevalencias desde 1.08% hasta 9.73% y en Santo Domingo de 2.17% hasta 9.4%. La sensibilidad de (RB) en el presente estudio, tomando como "Gold Standar" la prueba i-ELISA fue de 32%. Los resultados a la prueba ST no tienen correlación con los obtenidos en las pruebas serológicas.

Summary. This investigation gathered 1200 bovine sanguine samples from cattle exploitations; 463 from El Carmen and 737 samples from Santo Domingo. For the brucellosis diagnosis, this research used three diagnostic methods: Skin Test to discriminate crossed reactions with *Yersinia enterocolitica*. Rose - Bengal Test and indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay as serological tests. The prevalence found in El Carmen goes from 1.08% to 9.73%, and in Santo Domingo from 2.17% to 9.4% in the three diagnostic tests. The sensibility of RB in this study was 32%, with the i-ELISA as "Gold Standard". The results to the test ST don't have correlation with those found in the serological tests.

Corresponding author:

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 infectocontagiosa causada por bacterias del género *Brucella*, la cual afecta tanto a humanos como animales, constituyéndose estos últimos en reservorios y fuente de infección. Estimaciones señalan que a nivel mundial anualmente se producirían entre 400 a 500 mil nuevos casos en humanos (Alvarez, 2001).

Pese a los grandes esfuerzos que se realizan por parte de organismos nacionales e internacionales, tendientes al control de esta zoonosis, todavía continúan siendo endémicas tanto en Ecuador como en otros países de la región. Debido a la importancia en Salud Pública, economía, y seguridad alimentaria que esta enfermedad posee (Nicoletti, 2001; Corbel, 2006), se están tomando en todo el mundo, medidas tanto para el control así como para su erradicación, dentro de las cuales se encuentran: la vacunación total o parcial de los animales, el diagnóstico directo e indirecto de la enfermedad y el sacrificio de animales positivos (Nicoletti, 2001; de Olsen & Stoffregen, 2005).

Aunque es reconocido, que el aislamiento y tipificación de *Brucella spp.*, es el diagnóstico concluyente, la disponibilidad de laboratorios debidamente equipados, y personal suficientemente entrenados en el manejo de este tipo de agente patógeno de alto riesgo, compromete su aplicación rutinaria. Actualmente, pruebas diagnósticas de tipo directo (Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR) e indirectas (relacionadas a la inmunidad humoral), están siendo aplicadas en todo el mundo, demostrando su alta sensibilidad y especificidad (Saegerman *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se determinó la sero-prevalencia de anticuerpos contra *Brucella spp.*, en explotaciones ganaderas grandes, medianas y pequeñas de los cantones Santo Domingo y El Carmen, mediante la aplicación de pruebas inmuno-diagnósticas. Adicionalmente se determinó la sensibilidad de la prueba Rosa de Bengala (RB), tomando como "Gold Standard" la prueba "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto (i-ELISA).

Materiales y métodos

Muestreo serológico

Entre octubre 2004 y abril 2005, muestras sanguíneas de bovinos ($n=1.200$), fueron colectadas de 58 Unidades de Producción Agrícola (UPA's) en estudio. Cada muestra fue dividida en 2 tubos Eppendorf® (1.5 ml), identificada y conservada a -20°C . Un tubo sirvió para realizar las pruebas serológicas en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), de la Universidad Central del Ecuador (UCE).

Distribución y características de las explotaciones ganaderas muestreadas

En la presente investigación se muestrearon un total de 58 explotaciones; 27 en el cantón El Carmen y 31 en el cantón Santo Domingo. Las explotaciones ganaderas, estuvieron distribuidas de la siguiente manera: en El Carmen 8/27 (29.63%) pertenecieron a explotaciones pequeñas; 10/27 (37.04%) pertenecieron a explotaciones medianas y 9/27 (33.33%) a explotaciones grandes; en Santo Domingo 7/31 (22.58%) pertenecieron a explotaciones pequeñas; 10/31 (32.26%) a explotaciones medianas y 14/31 (45.16%) a explotaciones grandes.

Pruebas diagnósticas utilizadas

Las pruebas aplicadas para el diagnóstico de la brucelosis fueron: Rosa de Bengala (RB), "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto (i-ELISA). Adicionalmente una prueba alérgica o "Skin test" (ST) fue aplicada a los bovinos muestreados.

Reactivos utilizados

Bengatest®, suspensión concentrada al 8% de *Brucella abortus* cepa 19 de Weybridge, inactivada por calor y el fenol (5%), dispersa en tampón ácido y coloreada con Rosa de Bengala.

Brucellergene® OCB (brucelina), derivado proteico de *Brucella melitensis*, cepa B115.

Pruebas de inmunidad humoral y celular

Las pruebas serológicas RB e i-ELISA, fueron realizadas según los descrito por Ron, 2003.

Para la prueba alérgica, se aplicó una dosis de 0,1 ml del alérgeno, en el tercio medio de la tabla del cuello, previa depilación y medición del espesor de la piel. La lectura se realizó a las 72 horas de la inoculación, la cual consistió en medir el espesor de la piel

por segunda vez. El resultado de la prueba fue considerado positivo, si existió una diferencia igual o mayor a 2 mm entre la primera y la segunda lectura.

Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico de los resultados fue realizado con la ayuda los programas estadísticos SPSS 12.0 y EXCEL 2003 (Microsoft®). Tomando en consideración la prueba i-ELISA como “Gold Estándar” fue calculada la sensibilidad de la prueba RB.

Resultados

Resultados de las pruebas diagnósticas

En el cantón El Carmen, de 452 animales inoculados con el antígeno de ST, 44 (9.73%) fueron considerados como positivos; de 463 muestras de suero bovino, 5 (1.1%) fueron positivas a la prueba RB, y 26 (5.62%) positivas al i-ELISA. En el cantón Santo Domingo, de 658 animales inoculados con el antígeno de ST, 62 (9.42%) fueron considerados como positivos a la prueba alérgica. De 737 muestras sanguíneas analizadas, 16 (2.17%) fueron positivas a RB y 39 (5.29%) positivas al i-ELISA. Los resultados se observan en las Tablas I y II.

Tabla I. Resultados a las pruebas diagnósticas en el cantón El Carmen.

Resultados	Categorías								
	Grandes			Medianas			Pequeñas		
	ST	RB	i-ELISA	ST	RB	i-ELISA	ST	RB	i-ELISA
(+)	23	4	11	17	1	13	4	0	2
%	12.6	2.12	5.82	9.94	0.57	7.39	4.08	0	2.04
(-)	160	185	178	154	175	163	94	98	96
%	87.4	97.88	94.18	90.06	99.43	92.61	95.92	100	97.96
Total	183	189	189	171	176	176	98	98	98

ST: Skin Test; **RB:** Rosa de Bengala; **i-ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay indirecto; **(+):** positivo; **(-):** negativo; **%:** porcentaje.

Tabla II. Resultados a las pruebas diagnósticas en el cantón Santo Domingo

Resultados	Categorías								
	Grandes			Medianas			Pequeñas		
	ST	RB	i-ELISA	ST	RB	i-ELISA	ST	RB	i-ELISA
(+)	32	9	28	20	4	6	10	3	5
%	9.55	2.56	7.98	8.89	1.43	2.15	10.2	2.8	4.67
(-)	303	342	323	205	275	273	88	104	102
%	90.45	97.44	92.02	91.1	98.57	97.85	89.8	97.2	95.33
Total	335	351	351	225	279	279	98	107	107

ST: Skin Test; **RB:** Rosa de Bengala; **i-ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay indirecto; **(+):** positivo; **(-):** negativo; **%:** porcentaje.

Resultados positivos según la edad

De un total de 165 casos positivos, 69 pertenecientes a El Carmen tuvieron la siguiente distribución etárea: 5 (7.25%) corresponden a animales entre 6 y 11 meses, 3 (4.38%) entre 12 y 17 meses, 1 (1.45%) entre 18 y 23 meses, 21 (30.43%) entre 24 y 59 meses, 29 (42.03%) entre 60 meses o más y 10 (14.49%) cuya edad no se determinó. En Santo Domingo, se presentaron 96 casos positivos: 1 (1.04%) entre 6 y 11 meses, 1 (1.04%) entre 12 y 17 meses, 4 (4.17%) entre 18 y 23 meses, 30 (31.25%) entre 24 y 59 meses; 35 (36.46%) entre 60 meses o más y 25 (26.04%) cuya edad no se determinó.

Resultados positivos según la raza

En las Tablas III y IV, se han clasificado los casos positivos a las pruebas diagnósticas según la raza de los bovinos, tanto los pertenecientes al cantón El Carmen como los del cantón Santo Domingo. Los resultados positivos totales en estas Tablas varían en ciertas razas, debido a que existen casos positivos a más de una prueba.

Tabla III. Casos positivos según la raza. El Carmen.

Categorías de explotación										
Raza	Grandes			Medianas			Pequeñas			Total No.
	ST	RB	i-ELI-SA	ST	RB	i-ELI-SA	ST	RB	i-ELI-SA	
H	-	-	-	3	-	1	-	-	-	4
BS	8	2*	4	3	1*	1	-	-	2	21
G	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2
C	-	1*	1	-	-	-	1	-	-	3
B	3	-	2	7	-	5	1	-	-	18
J	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
SI	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
NE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
M	10*	1*	3	4	-	4	1	-	-	23
Total	23	4	11	17	1	13	4	0	2	75

ST: Skin Test; RB: Rosa de Bengala; i-ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay indirecto; H: Holstein; BS: Brown Swiss; G: Gir;
C: Cebú; B: Brahman; J: Jersey; SI: Simental; NE: Nelore; M: Mestiza. *: = presencia de muestras positivas a más de una prueba.

Tabla IV. Casos positivos según la raza. Santo Domingo.

Categorías de explotación										
Raza	Grandes			Medianas			Pequeñas			Total No.
	ST	RB	i-ELISA	ST	RB	i-ELISA	ST	RB	i-ELISA	
H	7*	1*	3	6	-	1	5	-	-	23
BS	6*	1*	4	3	2*	2	3	-	1	22
G	5*	1*	7	1	-	1	-	-	-	15
B	1	-	2	1	1*	1	-	-	-	6
J	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
M	12*	6*	12	9	1*	1	2	3*	4	50
Total	32	9	28	20	4	6	10	3	5	117

ST: Skin Test; **RB:** Rosa de Bengala; **i-ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay indirecto; **H:** Holstein; **BS:** Brown Swiss;

G: Gir; **B:** Brahman; **J:** Jersey; **M:** Mestiza. * = presencia de muestras positivas a más de una prueba.

Resultados positivos según el sexo

De un total de 69 casos positivos en el cantón El Carmen, 56 fueron hembras y 13 machos. En Santo Domingo, de 96 casos positivos, 91 fueron hembras y 5 machos. El número total de hembras para los dos cantones fue de 147 (89.09%) y de machos fue de 18 (10.91%).

Resultados positivos según la presencia de abortos

En el cantón El Carmen, de un total de 6 abortos, dos de explotaciones medianas tuvieron resultados positivos a las pruebas: 1 a ST y 1 a i-ELISA. En Santo Domingo, de 12 casos de aborto, 3 resultaron positivos a las pruebas: en explotaciones grandes 1 a las 3 pruebas y otro a ST y, en pequeñas 1 a ST.

Resultados positivos según vacunación

De 165 animales positivos, se determinó que 4 (2.42%) fueron vacunados contra brucelosis en el cantón El Carmen y 18 (10.91%) en Santo Domingo, dando un total de 22 (13.33%) animales, los cuales provienen de explotaciones grandes.

Comparación de los resultados a la prueba RB, tomando como “Gold Standar” i-ELISA

De las 1200 muestras bovinas, se encontraron 1135 (94.58%) negativas tanto a RB como i-ELISA y 65 (5.42%) positivas por lo menos a una de las pruebas, como se detalla en la Tabla V, así se pudo establecer que la sensibilidad (Se) de la prueba RB en el presente estudio, tomando como “Gold Standar” la prueba i-ELISA, fue de 32%.

Tabla V. Comparación de resultados entre RB e i-ELISA

RB	i-ELISA		Total
	+	-	
+	^a 21	^c 0	(a+c) 21
-	^b 44	^d 1135	(b+d) 1179
Total	(a+b) 65	(c+d) 1135	1200

RB: Rosa de Bengala; **i-ELISA** Enzyme Linked Immunosorbent Assay indirecto

$$Se = \frac{a}{a + b} \times 100 = \frac{21}{21 + 44} \times 100 = 32\%$$

Se: Sensibilidad

Determinación de reacciones cruzadas con Yersinia enterocolítica

En la Tabla VI se resumen los resultados positivos, estableciendo relación entre las pruebas ST, RB e i-ELISA y sus posibles reacciones cruzadas con un total de 16 pruebas positivas a RB e i-ELISA y 43 positivos a i-ELISA que se determinaron como negativos a ST.

Tabla VI. Resumen de resultados positivos a las pruebas ST, RB e i-ELISA.

Pruebas diagnósticas	Casos Positivos					
	El Carmen		Santo Domingo		Total	
	No	%	No	%	No.	%
ST	43	62.32	57	59.38	100	60.61
i-ELISA	21	30.43	22	22.91	43	26.06
ST – i-ELISA	0	0	1	1.04	1	0.61
RB - i-ELISA	4	5.8	12	12.5	16	9.69
ST – RB – i-ELISA	1	1.45	4	4.17	5	3.03
TOTAL	69	100	96	100	165	100

ST: Skin Test; RB: Rosa de Bengala; i-ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay indirecto;

Análisis estadístico

Al realizar el análisis de variancia de los resultados positivos a las diferentes pruebas tanto en El Carmen como en Santo Domingo, clasificados por categoría de explotación, se determinó una diferencia no significativa (NS), ya que el valor de “F” calculada en todos los casos fue menor que la “F” tabular al 5 y al 1%. Por tanto, se aceptó la hipótesis nula (H0) al 1 y al 5 %, lo que indica que no hay diferencia entre las categorías de explotaciones y los resultados positivos a las pruebas.

Mediante la prueba de Duncan, se pudo observar que existe diferencia significativa únicamente entre las categorías mediana y pequeña, entre grandes y pequeñas a la prueba ST; y entre las medianas y grandes a la prueba RB en Santo Domingo.

La correlación (r) entre la prueba i-ELISA y RB, tuvo un valor de “r” calculada de 0.82, en relación a una “r” tabular al 1% de 0.917 y al 5% de 0.811, lo que determinó una diferencia no significativa al 1%, y una diferencia significativa al 5%. El coeficiente de determinación fue de 67.46 %. Todo esto determina que sí existe correlación entre las pruebas i-ELISA y RB.

Con “Ji” cuadrado “t” de Student combinadas (x² y “t”), se pudo observar que no existe una diferencia significativa entre los resultados positivos de las tres categorías de explotación a las diferentes pruebas, excepto en comparaciones a la prueba i-ELISA, en las que hubo diferencia significativa al 1 y 5% al comparar explotaciones medianas

de ambos cantones y diferencia significativa al 5% al comparar explotaciones pequeñas con grandes, y grandes de El Carmen con medianas de Santo Domingo. Esto indica que la mayoría de los resultados a las pruebas en las diferentes categorías de explotación no se relacionan con el tipo de explotación del que provienen, a excepción de los casos previamente mencionados.

Discusión

Weynants *et al.*, (1995) menciona que aunque la prueba de hipersensibilidad retardada es muy efectiva a nivel de hato, es tediosa y consume gran cantidad de tiempo, ya que los animales deben ser manipulados dos veces y el resultado es obtenido únicamente luego de 2 ó 3 días.

La OIE (2004) menciona que el aumento en el grosor de la piel de un animal para que este se considere positivo, va de 1.5 a 2 mm de aumento a la primera lectura; sin embargo, en este estudio se consideró positivo a todo animal cuya segunda lectura aumentó de 2 mm en adelante, según el método mencionado por Pouillot *et al* (1997). Cabe destacar que la especificidad del ST según el mismo autor es de 99.53% y que su sensibilidad relativa es de 64%.

Las prevalencias encontradas en El Carmen y Santo Domingo (1.08% y 2.17% respectivamente) a RB difieren con las del Programa de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería en el año 1979, en el que se estableció una prevalencia de 9.34% para la provincia de Pichincha y de 7.49% para Manabí, mediante pruebas de aglutinación rápida en placa por lo que estas provincias fueron caracterizadas como de alta prevalencia. Zambrano (2002), en el cantón El Carmen reportó un 2% de positividad (25/1.225) diagnosticada mediante la prueba RB, por lo que se puede observar similitud con los resultados del presente estudio, en el que se obtuvo un 1.08% (5/463) a RB. Cabe mencionar a diferencia de aquel reporte, la mayoría de animales muestreados para el presente estudio no eran vacunados, lo que disminuye el riesgo de la presencia de reacciones cruzadas por esta causa.

Estudios de Miño & Pico (2003) y Ron (2003) en el cantón Mejía, encontraron porcentajes de 22.52% y de 32.11% respectivamente con i-ELISA. A la misma prueba, en el presente estudio se encontraron porcentajes de 5.62% en El Carmen y 5.29% en Santo Domingo, lo que denota una prevalencia menor de brucelosis en los cantones estudiados. Esto puede deberse a que en el cantón Mejía gran parte de las explotaciones ganaderas vacunan a sus animales (reacciones cruzadas), o a que la prevalencia puede ser mayor debido a factores como manejo, tipo de ganado y control sanitario. Nicoletti (1983) menciona que pueden observarse diferencias en los resultados entre el número

de casos positivos a la prueba alérgica y a las pruebas serológicas, ya que estas dos clases de pruebas no miden la misma respuesta inmunológica, como en el presente estudio. Los animales también pueden desarrollar reacciones alérgicas durante un largo período seronegativo. Cunningham *et al.*, (1980) añade que otros animales pueden ser anérgicos, particularmente los infectados crónicamente. En esta investigación, se podría establecer que 16 muestras resultaron positivas a RB e i-ELISA, 43 únicamente a i-ELISA y que ninguna de ellas tuvo resultados positivos al ST, descartándose que dentro de estos resultados existan reacciones cruzadas con vacunación.

En la presente investigación podemos observar que la mayoría de casos se han presentado en animales de 60 meses en adelante en ambos cantones, lo que es comprensible según Akakpo (1987), ya que los animales de mayor edad han tenido más posibilidades de contagiarse con la enfermedad. Los resultados muestran que la mayor parte de casos positivos se han presentado en animales de las razas *Bos taurus*, seguidos por las razas *Bos indicus*. Chantal & Thomas, (1976) y Akakpo, *et al.*, (1984) mencionan que las razas *indicus* son más resistentes, debido a su rusticidad en relación a las razas *taurus* y que el producto de su cruzamiento es más sensible a la brucelosis que las razas puras.

No se pudo establecer la relación entre casos positivos y sexo del animal, ya que el muestreo fue de 1084 (90.36%) hembras y 116 (9.67%) machos, lo que no fue equitativo y su comparación no sería correcta. Aunque se hiciera un muestreo equitativo, se debe considerar lo que menciona Akakpo (1987), quien señala que no es posible aclarar la participación intrínseca y exclusiva del factor sexo, ya que no puede ser disociado de factores extrínsecos.

Según Ensminger, (1987) se debe considerar que no todos los animales que abortan están infectados con brucelosis y que no todos los animales infectados con brucelosis necesariamente abortarán, lo que se observó en los casos de aborto encontrados en el presente estudio, donde únicamente 5 se relacionaron con resultados positivos a las pruebas serológicas y de campo.

Según la OIE (2004) la prueba ST, presenta reacciones cruzadas en animales vacunados con Cepa 19; partiendo de esto, podrían considerarse como falsos positivos los vacunados con esta cepa ($n = 2$) y aquellos cuya vacuna fue desconocida ($n = 7$). A i-ELISA se encontraron 7 casos positivos dentro de los animales vacunados con RB-51. Dada la ausencia de cadena O, RB-51 no produce anticuerpos que sean detectables por pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de brucelosis. (Olsen, *et al.*, 1996, citado por Shuring, *et al.*, 2002) Por lo tanto estos animales son verdaderos positivos.

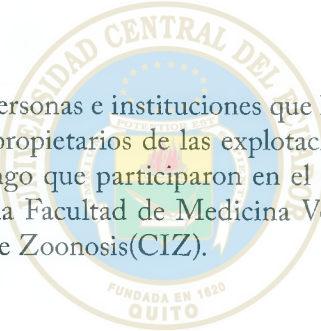
La sensibilidad (Se) de una prueba es la capacidad que tiene la misma de producir una respuesta positiva en un individuo infectado (Toma, *et al.*, 1996). Van Aert, *et al.*, (1984) y Samartino, *et al.*, (1999), citados por Nielsen, (2002) determinan una sensibili-

dad para RB que va del 21 al 98.3%. En el presente estudio la Se fue de 32%, lo que está dentro del rango establecido por los autores previamente mencionados.

El ST es una alternativa para discriminar las reacciones cruzadas que se presenten debido a *Yersinia enterocolitica* y otras bacterias. *Y. enterocolitica* O:9 posee una cadena O muy próxima a la de *Brucella* de tipo liso y su reacción cruzada a las pruebas serológicas es la más intensa. En el Ecuador existe *Y. enterocolitica*, según lo menciona la Public Health Agency of Canada (2004), pero no se ha discutido la existencia del serotipo O:9. Se puede mencionar también que 100 casos resultaron positivos únicamente al ST, los que según la OIE (2004) deben considerarse como positivos, también menciona que la prueba ST no debe ser usada como única prueba diagnóstica con el propósito de comercio internacional.

Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta investigación: a los propietarios de las explotaciones ganaderas de los cantones El Carmen y Santo Domingo que participaron en el estudio, a la Universidad Central del Ecuador (UCE), a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ).



Bibliografía

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.

Akakpo, A., Bornarel, P., Almeida, J., 1984. Epidémiologie de la Brucellose Bovine en Afrique Tropicale, Enquête Sérologique en République Populaire du Bénin. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 37 (2): 133-137.

Akakpo, A., 1987. Brucelloses Animales en Afrique Tropicale. Particularités épidémiologique, clinique et bactériologique. *Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 40 (4): 307-320.

Bautista, M., Ochoa, V., 2001. Técnicas de Inmunoensayo ligado a enzimas. In: *Diagnóstico de Brucelosis Animal*. Díaz, E., Hernández, L., Valero, G., Arrellano, B., editores. México, pp 92-95

Chantal, J., Thomas, J., 1976. Etude Sérologique Sur la Brucellose Bovine aux Abattoirs de Dakar. *Revue. Méd. Vét.* 69 (2): 101-108.

Corbel M.J. 1991. Brucelosis. In: *Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria*. Laing J., Brinley Morgan, W., Wagner W., editors. Mc.Graw-Hill Interamericana, Madrid, p. 201-236

Cunningham, B., Miler, J., Dolan, L., McKeon, F., & O Meara, M., Immunological characteristics in cattle of allergens derived from smooth *Brucella abortus* S99. *Vet. Rec.*, 107, 369, 1980.

Ensminger, M., 1987. Brucelosis (Bang's Disease). In: *Beef Cattle Science*. Interstate Printers & Publishers, Inc., Illinois, pp. 442-445.

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

Miño, E. & Pico, V., 2003. *Estudio de la Presencia de Brucelosis Bovina en Explotaciones Ganaderas del Cantón Mejía*. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito- Ecuador, pp. 32-33.

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

Nicoletti, P., Winter, A., 1990. The Immune response to *B. abortus*: the cell-mediated response to infections. In: *Animal Brucellosis*. Nielsen, K., Duncan, J., editors, Ontario, Canada, pp. 83-95.

Nicoletti, P., 1983/1984 The use of a Brucella protein antigen in dermal Hypersensitivity as an adjunct Method to Diagnose Bovine Brucellosis, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 5, 27.

Nicoletti P. 2001. Immune Responses and Vaccination. In: *Madkour's Brucellosis*. Madkour M., editor. Springer-Verlag, Germany, p. 267-274

OIE, 2004. Bovine Brucellosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00052.htm

Olsen, S.C., Evans, D., Hennager, S.G., Cheville, N.F., Stevens, M.G., 1996. Sero-logic response of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8. 451-454.



Olsen S.C. & Stoffregen W.S. 2005. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Review of Vaccines* 4: 915-928.

Pouillot, R., Garin – Bastuji, B., Gerbier, G., Coche, Y., Cau, C., Dufour, B., Moutou, F., 1997. The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.* 28, 365-383.

Public Health Agency of Canada, 2004. Travel health advisory: Gastrointestinal illness while travel.

http://eslkid.com/msgboard.mv?parm_func=showmsg+parm_msgnum=1001638

Ron, J., 2003. *Validación de Técnicas Diagnósticas para la Detección de Brucelosis y Estudio Epidemiológico en una Región Andina del Ecuador*. Tesis de Maestría, Instituto de Medicina Tropical, Príncipe Leopoldo, Departamento de Sanidad Animal Tropical. Tesis N° 118. Amberes-Bélgica.

Saegerman C., Vo T.K., De Waele L., Gilson D., Bastin A., Dubray G., Flanagan P., Limet J.N., Letesson J.J., & Godfroid J. 1999. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Veterinary Record* 145: 214-218.

Schuring, G., Sriranganathan, N., Corbel, M., 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, 479-496.

Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bennet, J., Ellis, P., Moutou, F., Louzâ, A., 1996. Le Dépistage des Maladies Infectieuses Animales. In : *Épidémiologie Appliquée*. Association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies animales (A.E.E.M.A.), Francia, pp. 46-62.

Weynants, V., Godfroid, J., Limbourg, B., Saegerman, C., Letesson, J., 1995. Specific Bovine Brucellosis Diagnosis Based on In Vitro Antigen – Specific Gamma Interferon Production. *Journal of Clinical Microbiology.* 33, 706 – 702.

Zambrano, M., 2002. *Actividad Realizada en el Laboratorio Agropecuario de la ULEAM, Extensión El Carmen*. Reporte, Laboratorio de Pecuaria, Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, extensión El Carmen.