

EVALUACIÓN DE MÉTODOS SEROLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN BOVINOS

EVALUATION OF SEROLOGICAL METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN CATTLE

Gabriela Mercedes Ordóñez-Andrade¹

¹Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Granja Experimental Laguacoto II, Km 1.5 Vía Guaranda - San Simón, Guaranda-Ecuador.
Correo-e: gabyordo@yahoo.es

RESUMEN

El objetivo de esta revisión literaria fue el evaluar una posible especificidad en el diagnóstico serológico de brucelosis, posterior a la vacunación contra Brucelosis. Con tal fin, se seleccionaron diferentes artículos en los que se habla de los diferentes métodos de diagnóstico bacteriológicos, inmunohistoquímicos (técnica alternativa) y otros métodos moleculares de diagnóstico de Brucelosis, junto con los métodos directos y las inespecificidades o falsos positivos que podrían encontrarse, por reacciones inmunitarias ocasionadas por diversas causas según la literatura encontrada.

Palabras clave: *Brucelosis, métodos de diagnóstico, falsos positivos.*

ABSTRACT

The objective of this literature review was to evaluate a possible non-specificity in the serological diagnosis of brucellosis following the vaccination against Brucellosis. To this end, different articles were selected to discuss the different bacteriological, immunohistochemical (alternative technique) diagnostic methods and other molecular methods of diagnosis of Brucellosis, together with the direct methods and the non-specificities or false positives, that could be found either by immune reactions caused by various causes according to the literature found

Key words: *Brucella, diagnostic methods, non positive.*

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países. Afecta la sanidad y la producción, además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos derivados. Ocasiona significativas pérdidas en la producción pecuaria debido no solamente a la enfermedad en sí, sino es la generación de anticuerpos en las hembras vacunadas y que interfieren con las pruebas diagnósticas más utilizadas que emplean antígenos con lipopolisacáridos (LPS) lisos. Estos LPS lisos están presentes tanto en la cepa utilizada en la vacunación como en las cepas de campo, lo que indica que son similares de forma antigénica, además de que explica la similitud de la respuesta inmune que existe entre un animal vacunado y uno infectado (Martínez-Herrera, 2011).

Dichas técnicas varían en sensibilidad y especificidad; también varía el momento de su aplicación de acuerdo con el objetivo que se persigue: si es el control y posterior erradicación de la enfermedad de un rodeo, hay que ser muy preciso en la interpretación de los resultados y relacionarlos con los datos anamnésticos de los animales, por ejemplo: edad de vacunación, tiempo transcurrido entre ésta y el primer control serológico, otras vacunaciones aplicadas muy próximas a dichos controles, y otras (Aparicio-Bahena, 2003) (García Carrillo, 1988), (González-

Tome *et al.*, 1990) (Lovane, 1988), (Peninpede, 1992) (Samartino *et al.*, 1986)

En Argentina al igual que en otros países, a través de sus organismos competentes (Agroalimentaria, 1999), participa activamente en estos logros, promulgando reglamentaciones tendientes a controlar y/o erradicar las enfermedades de mayor interés económico y de salud pública, como la brucelosis. Las principales herramientas de combate son los controles sanitarios y vacunación masiva de los rodeos. Los primeros se pueden realizar de distintas maneras y con diferentes técnicas serológicas, para realizar diagnósticos y conocer el estado de situación (Di Lorenzo, 1991) (González, 1995) (González-Tomé *et al.*, 1989) (Penninpede *et al.*, 1996) (Pentri, 1994).

Adicionalmente se debe proponer un diagnóstico diferencial que suplante los falsos positivos con resultados veraces, evitando así las pérdidas económicas por sacrificios (Alton *et al.*, 1975).

MATERIALES Y MÉTODOS

Debido a que el parámetro no permitió encontrar más artículos referentes al tema, se amplió el año de búsqueda; hasta el 2014 solo se encontraron 6 artículos por lo que se modificaron los parámetros desde el 2010.

Cuadro1. Método de Investigación.

| Consulta | Google académico | Elsevier home | Science direct (no se puede descargar) | Total |
|---|------------------|---------------|--|-------|
| Brucella bovinos | 10600* | 27 | 903 | 11530 |
| Brucella Diagnóstico /brucella diagnostic | 6550 | 60 | 1312 | 7922 |
| Diagnóstico "brucella" bovinos "falsos positivos"/brucella diagnostic/non positives | 532 | 42 | 422 | 996 |
| diagnostico brucella bovinos diagnostico OR serológico "falsos positivos" /serologic brucella diagnostic/non positives | 134 | 33 | 40 | 207 |
| diagnóstico brucella bovinos diagnóstico OR serológico "falsos positivos" 2014 | 72 | 33 | 40 | 145 |
| diagnóstico brucella bovinos diagnostico OR serológico "falsos positivos" - caprino -ovino -humano/ serologic brucella diagnostic/non positives (journals) | 31 | 33 | | 64 |
| diagnóstico brucella bovinos diagnostico OR serológico "falsos positivos" - caprino -ovino -humano/ serologic brucella diagnostic/non positives (journals) 2010 | 239 | 40 | 40 | 319 |

*Número de artículos que aparecen según las directrices de búsqueda.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Métodos directos para diagnóstico de Brucelosis

Cuadro 2. Diagnóstico bacteriológico.

| | |
|----------------------------------|---|
| Técnica | Diagnóstico Bacteriológico |
| Tipo de Técnica | Aislamiento bacteriano. |
| Veracidad | Gold estándar. Específico permite biotipificar el microorganismo (Bricker, 2002) (Al Dahouk, 2003) |
| Dificultad | Requiere alta especificidad en los medios de cultivo. Necesita alto número de muestras viables, almacenamiento adecuado y rápida entrega al laboratorio de diagnóstico. Fácil contaminación. Laboratorio específico nivel 3 y personal capacitado |
| Precauciones | Se necesita cultivos enriquecidos con antibióticos (De Miguel <i>et al.</i> , 2011) |
| Tipo de muestras | Membranas fetales (cotiledones). Órganos fetales (pulmón, linfonódulos bronquiales, bazo, hígado, secreciones vaginales (hasta seis semanas después del aborto), semen y leche de los 4 cuartos (Lage <i>et al.</i> , 2008; Poester <i>et al.</i> , 2006) |
| Tipo de reactivos/medios sólidos | Agar dextrosa, agar triptosa, Trypticase soy Agar y otros dependiendo de la especie por aislar (Poester <i>et al.</i> , 2010) |

Cuadro 3. Inmunohistoquímica.

| | |
|----------------------------------|--|
| Técnica | Inmunohistoquímica |
| Tipo de Técnica | Estudios patogénesis /lesiones |
| Veracidad | No es verídico |
| Dificultad | Protocolos de fijación y selección del anticuerpo primario (Ramos-Vara, 2005) |
| Precauciones | - |
| Tipo de muestras | Dependiendo de las lesiones (Xavier <i>et al.</i> , 2009) No requiere una bacteria viable (Santos <i>et al.</i> , 1998) |
| Tipo de reactivos/medios sólidos | - |

Métodos moleculares para genotipar las especies de *Brucella*

Son importantes herramientas de diagnóstico y estudios epidemiológicos, para identificar las especies y biotipos de *Brucella* spp entre cepas virulentas y vacunales.

La detección molecular de *Brucella* spp, puede ser hecha directamente en muestras clínicas sin un aislamiento previo del organismo, se pueden utilizar estas

técnicas como complemento de los resultados obtenidos del test de fenotipo.

Sin embargo, el autor Minda Asfaw Geresu dice que:

“Un diagnóstico preciso de la infección por Brucella spp. es importante para el control de la enfermedad en animales y consecuentemente en el hombre. El diagnóstico clínico se basa generalmente en la historia de fallas reproductivas, pero es un

diagnóstico presuntivo que debe ser confirmado por métodos de laboratorio. El diagnóstico directo de brucelosis implica bacteriológica, inmunohistoquímica y métodos moleculares. Bajo un punto de vista epidemiológico, el aislamiento bacteriano de muestras es más relevante, ya que es más específico y permite Biotipificación del aislamiento, pero requiere protocolos BSL-3 para el de las infecciones adquiridas en el laboratorio. Para estudios retrospectivos, la inmunohistoquímica permite la localización in situ de los organismos dentro de la lesión inducida por *Brucella* ya que no requiere bacterias viables. Las técnicas moleculares son herramientas importantes para el diagnóstico y estudios epidemiológicos, proporcionando información para identificación de especies y biotipos de *Brucella* spp.

Diferenciación entre cepas virulentas y vacunales. Serológico. Los métodos están entre los diagnósticos de laboratorio indirectos bien establecidos de la brucelosis,

ya que la mayoría de los programas de control y erradicación usa estos métodos, mientras que la prueba cutánea alérgica a la brucelina podría ser una prueba confirmatoria en animales no vacunados contra la brucelosis y más específica que la RBT y la CFT.” (Geresu and Kassa, 2016).

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción basado en enfoques

Longitud del fragmento de restricción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Polimorfismo (PCR-RFLP) es un enfoque común para la tipificación de *Brucella* spp., Proporcionando una buena herramienta para análisis taxonómico, epidemiológico, Evolutivos y diagnósticos. El método ha sido especialmente utilizado en estudios de diversos genes de proteínas de membrana externa (omp) (Al Dahouk *et al.*, 2003).

Cuadro 4. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

| Técnica | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) |
|------------------|--|
| Tipo de Técnica | Amplificación de una secuencia genómica del gen, especie o incluso un biotipo de <i>Brucella</i> spp. El tipo de PCR se elige en base al tipo de muestra biológica y el objetivo. |
| Veracidad | Es el más usado para el diagnóstico definitivo (Bricker, 2002). Su rango de sensibilidad va del 50 -100% y una especificidad entre el 60 y 98% (Mitka <i>et al.</i> , 2007) |
| Dificultad | Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli <i>et al.</i> , 2001) |
| Precauciones | El protocolo de extracción de ADN, tipo de muestra clínica y la detección de los límites para cada protocolo son factores que influyen en la eficiencia de la técnica (Mitka <i>et al.</i> , 2007) |
| Tipo de muestras | Muestra clínica |

Fuente. Tomado del autor.

Cuadro 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex

| | |
|-----------------|--|
| Técnica | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex |
| Tipo de Técnica | Varias PCR multiplex que identifican el género <i>Brucella</i> en el Nivel de especie y en parte al nivel de biovar utilizando diferentes combinaciones |
| Veracidad | <p>Este método podría identificar tres biovars (1, 2 y 4) de <i>B. abortus</i>, Todos los biovars de <i>B. melitensis</i>, todos los biovars de <i>B. ovis</i> y biovar 1 de <i>B. Suis</i>. Un ensayo AMOS PCR de multiplexación abreviada basado en tres. Se desarrollaron cebadores adicionales para diferenciar la vacuna de <i>B. abortus</i> Cepas S19 y RB51 de las cepas de campo (Ewalt and Bricker, 2000).</p> <p>En 2005, la conclusión de una supresión junto a una de las copias de IS711 (elemento genético con polimorfismo específico de Brucela) en <i>B. abortus</i> biovars 5, 6, 9 y en algunas cepas de campo de biovars 3 de <i>B. abortus</i> ha permitido diseñar y añadir un cebador específico a las ocho mezclas de cebadores de AMOS PCR, Permitiendo potenciar el poder de discriminación de este ensayo.</p> |
| Dificultad | Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli <i>et al.</i> , 2001) |
| Precauciones | El protocolo de extracción de ADN, tipo de muestra clínica y la detección de los límites para cada protocolo son factores que influyen en la eficiencia de la técnica (Mitka <i>et al.</i> , 2007) |

Fuente. Tomado del autor.

Cuadro 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

| | |
|------------------|--|
| Técnica | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real |
| Tipo de Técnica | No requiere la manipulación post amplificación de productos de PCR, reduciendo así el riesgo de contaminación de laboratorio y de falsos resultados. |
| Veracidad | La PCR en tiempo real es más rápida y más sensible que la PCR convencional. Y se añade un cebador específico a las ocho mezclas de cebadores de AMOS PCR, permitiendo potenciar el poder de discriminación de este ensayo. |
| Dificultad | Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli <i>et al.</i> , 2001) |
| Precauciones | El protocolo de extracción de ADN, tipo de muestra clínica y la detección de los límites para cada protocolo son factores que influyen en la eficiencia de la técnica (Mitka <i>et al.</i> , 2007) |
| Tipo de muestras | Los ensayos de PCR en tiempo real se han descrito recientemente con el fin de probar células de <i>Brucella</i> (Redkar <i>et al.</i> , 2001) orina (Queipo-Ortuño <i>et al.</i> , 2005), sangre y parafina en Tejidos (Redkar <i>et al.</i> , 2001) |

Fuente. Tomado del autor.

Cuadro 7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

| | |
|------------------|---|
| Tipo de Técnica | El desarrollo de una técnica molecular que utiliza el tiempo real PCR seguida por análisis de curva de fusión de alta resolución (HRM) será más confiable. Tipo de miembros de este género ha sido descrito por Winchell <i>et al.</i> (2007). |
| Veracidad | El ensayo se dirigió a los loci discriminantes dentro de los genomas de <i>Brucella</i> spp. Mediante el análisis de la curva de disociación que permite la identificación precisa de los aislamientos de <i>Brucella</i> a nivel de especie y de aislados raros de <i>Brucella</i> tales como BO1 y BO2. Este ensayo también demostró éxito de discriminar <i>B. suis</i> de <i>B. canis</i> , pero fue incapaz de diferenciar con precisión un <i>B. suis</i> biovar 4 de <i>B. canis</i> . Sin embargo, se ha informado previamente que <i>B. suis</i> biovar presenta un patrón genotípico idéntico a <i>B. canis</i> , y se sigue debatiendo en cuanto a si esto es verdaderamente un biovar único de <i>B. suis</i> (Wathmore <i>et al.</i> , 2007) (Huynh, 2008) |
| Dificultad | Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli <i>et al.</i> , 2001) |
| Precauciones | El protocolo de extracción de ADN, tipo de muestra clínica y la detección de los límites para cada protocolo son factores que influyen en la eficiencia de la técnica (Mitka <i>et al.</i> , 2007) |
| Tipo de muestras | Muestras clínicas |

Fuente. Tomado del autor.

Cuadro 8. Tipos de polimorfismos de nucleótido único.

| | |
|------------------|---|
| Técnica | Tipos de polimorfismos de nucleótido único |
| Tipo de Técnica | Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) representan marcadores que permiten describir con precisión el marco filogenético basado en una serie de ensayos de discriminación de una especie, particularmente en un grupo genéticamente conservado como <i>Brucella</i> . |
| Veracidad | El ensayo distingue a todos los miembros de la especie clásica, pero la diferenciación de <i>B. suis</i> y <i>B. canis</i> fue difícil, ya que no hay <i>B. suis</i> específico. El SNP ha sido identificado. Sin embargo, como un SNP específico de <i>B. canis</i> ha sido identificado, es posible una discriminación con <i>B. suis</i> / <i>B. del perro</i> SNP específicos y el <i>B. canis</i> SNP específicos (Wathmore <i>et al.</i> , 2007). |
| Dificultad | Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli <i>et al.</i> , 2001). |
| Precauciones | El protocolo de extracción de ADN, tipo de muestra clínica y la detección de los límites para cada protocolo son factores que influyen en la eficiencia de la técnica (Mitka <i>et al.</i> , 2007) |
| Tipo de muestras | Muestras clínicas |

Fuente. Tomado del autor.

Métodos indirectos para diagnóstico de Brucella

Las pruebas serológicas son cruciales para el diagnóstico de laboratorio de la brucelosis, ya que la mayoría de los programas de control y erradicación se basan en estos métodos. Las bacterias enteras inactivadas o las fracciones purificadas (es decir, Lipopolisacárido o proteínas de membrana) se utilizan como antígenos detectando anticuerpos generados por el huésped durante la infección. Anticuerpos contra especies de *Brucella* lisas (por ejemplo, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) reaccionan de forma cruzada con las preparaciones de antígeno de *B. abortus*, mientras que los anticuerpos contra especies de *Brucella* rugosas (por ejemplo, *B. ovis* y *B. canis*) reaccionan de forma cruzada con preparaciones de antígeno de *B. ovis* (Nielsen *et al.*, 1999). Aunque actualmente se dispone de varios métodos serológicos, las pruebas pueden clasificarse como pruebas de detección (por ejemplo, placa de antígeno tamponada Aglutinación-BPAT), controles o pruebas de vigilancia epidemiológica (Por ejemplo,

ensayo de anillo de leche) y pruebas complementarias o confirmatorias (por ejemplo, Mercaptoetanol, fijación del complemento, ELISAs y fluorescencia Polarización). La selección de una prueba dada debe tener en cuenta la especie afectada, así como las regulaciones locales (Nielsen *et al.*, 1999). Estos métodos en presencia de vacunaciones podrán presentar falsos positivos (Aparicio-Bahena, 2003).

Las comprobaciones tienen gran importancia no solamente en los controles sanitarios de rutina que se practican en los rodeos, sino particularmente en los establecimientos que están o van a entrar en saneamiento, de acuerdo con las normativas del Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina. Los bovinos de esos rodeos que acusen resultados positivos a BPA y SAT 1/100, estarían encuadrados en la categoría de sospechosos, pudiendo generar una situación sanitaria no definida, que afectaría al establecimiento en estado libre de brucelosis debido a interferencias con algunas vacunas como por ejemplo la de Campilobacteriosis (Jacobo *et al.*, 2002).

Cuadro 9. Métodos indirectos para diagnóstico de Brucella.

| Nombre del test | Que identifica | Veracidad | Tipo de muestra | Interferencias/observaciones |
|--|--|---|-----------------|--|
| Standard slow aglutination 40uve test (SAT) | Aglutinación del antígeno bacteriano (IgM) | Especificidad baja no se recomienda (Poester <i>et al.</i> , 2006) (Nielsen <i>et al.</i> , 1999) (OIE, 2009) | Sangre | Los resultados señalaron que los animales vacunados con campilobacteriosis arrojaron resultados falsos positivos a las técnicas del BPA y SAT, desde los 15 hasta los 45 días post-vacunación. (Jacobo <i>et al.</i> , 2002) |

Cuadro 9. Continuación

| Test Anillo de leche | Aglutinación de anticuerpos secretados en leche | El resultado indica la presencia de ganado infectado en el rebaño, por lo que la prueba debe ser seguida por la prueba serológica individual en el rebaño entero. (OIE, 2009) | Leche del rebaño |
|--------------------------|--|---|---|
| 2 – mercaptoetanol | prueba de confirmación que permite la Cuantificación de IgG anti-Brucella debido a la inactivación de IgM en la muestra de prueba. | Inconvenientes, incluyendo la toxicidad del mercaptoetanol, que requiere una campana extractora para su manipulación, y la posibilidad de degradación de IgG | El 2-mercaptoetanol, puede dar lugar a falsos resultados negativos (Poester <i>et al.</i> , 2010) La sensibilidad de la prueba de 2-mercaptoetanol varía de 88.4 y 99.6%, y su especificidad de 91.5 y 99.8% (Nielsen <i>et al.</i> , 2004) |
| Fijación del complemento | Debido a su alta precisión, la fijación del complemento se utiliza como prueba confirmatoria para infecciones por <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> y <i>B. ovis</i> y es la prueba de referencia recomendada por la OIE para animales terrestres (OIE, 2009) Sin embargo se encuentran muchos reactores positivos (Aparicio-Bahena <i>et al.</i> , 2003) | Desventajas: alto costo, complejidad para la ejecución y requiere equipo especial y personal de laboratorio capacitado. | Suero sanguíneo Presenta limitaciones con suero hemolizado, muestras o suero con actividad anti-complemento de algunos sueros, y ocurrencia de fenómenos de prozona (Nielsen <i>et al.</i> , 2004). Sensibilidad, la fijación del complemento oscila entre 77.1% y 100%, y su especificidad de 65% a 100% (Gall <i>et al.</i> , 2001) (Perret <i>et al.</i> , 2010) |

Cuadro 9. Continuación

| | | | | |
|--|---|--|---|---|
| Rosa de Bengala (RBT) | Reactivación de anticuerpos contra el lipopolisacárido liso (LPS) | Bajo. Especialmente en casos crónicos, una especificidad relativamente baja. La sensibilidad general es del 92.9%, por lo que el uso de RBT debe ser considerado cuidadosamente en áreas endémicas | Suero sanguíneo | Las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Confirmación de la RBT por otros ensayos tales como pruebas de aglutinación sérica (Christopher <i>et al.</i> , 2010; Araj, 2010) |
| ELISA Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas | Detección de anticuerpos contra LPS liso. Detección de IgM | Es el más sensible en casos agudos y crónicos (Aparicio-Bahena <i>et al.</i> , 2003) | Suero o leche | El Elisa indirecto no discrimina falsos positivos por vacunación (Gall <i>et al.</i> , 2001). ELISA competitivo si discrimina anticuerpos pos vacunales (Perret <i>et al.</i> , 2010) (Godfroid <i>et al.</i> , 2010) |
| Ensayo de polarización por fluorescencia (FPA) | Diferencias entre una pequeña molécula de antígeno soluble en solución y el complejo de moléculas de antígeno con su anticuerpo. Mide el tamaño de una molécula marcada fluorescente tal como antígeno. | La sensibilidad de FPA es del 96% para la brucelosis humana confirmada por cultivo y la especificidad es de alrededor del 98% (Mitka <i>et al.</i> , 2007) (Christopher <i>et al.</i> , 2010). | Suero Muestras de sangre (EDTA) entera y leche | |
| Agar gel de inmunodifusión | Precipitación del complejo Antígeno-anticuerpo (Aparicio-Bahena <i>et al.</i> , 2003) | Comparables al de fijación del complemento | | Sensibilidad en infecciones crónicas variabilidad de calidad. Antígenos disponibles. Necesidad de realizar pruebas complementarias (Costa <i>et al.</i> , 2012) |

Cuadro 9. Continuación

| | | | |
|--|---|--|---|
| Prueba de Coombs | Esta es la prueba más adecuada y sensible para la confirmación de pacientes recurrentes con enfermedad persistente, detección de reacciones incompletas, de bloqueo o no aglutinantes. IgG. | Es bueno para casos complicados y crónicos, pero falla alrededor del 7% de casos comparados con ELISA (SargÜsel <i>et al.</i> , 2011) | Requiere mucho tiempo, técnicamente difícil, requiere personal calificado y no rutinariamente realizado en laboratorios clínicos. |
| Dipstick assay | El ensayo de la tira reactiva IgM es una de las pruebas que han de detectar anticuerpos IgM para el LPS liso. | Para detectar anticuerpos IgM contra las especies de <i>Brucella</i> . Mejora la interpretación de los resultados estableciendo así puntos de corte. (Lim and Rickman, 2004) | |
| Prueba de inmunocaptura de aglutinación (BCAP) | Detectar aglutinantes y no aglutinantes. Anticuerpos con alta sensibilidad (Özdemir <i>et al.</i> , 2011). | Comparado con el test de Coombs, tiene sensibilidad y especificidad similares, pero ambos pueden permanecer positivos durante mucho tiempo (Özdemir <i>et al.</i> , 2011). | Comparación con otras pruebas: es más compleja, costosa y lenta. Esta prueba difícilmente puede reemplazar las pruebas rápidas de detección tales como RBT y varilla. |
| Prueba rápida de aglutinación en tabla | | Se recomienda utilizar MAT y 2-ME / RSAT para verificar los sueros de todos los pacientes con síntomas de brucelosis, pero que son negativos para Brucelosis utilizando un antígeno de <i>Brucella</i> suave | El diagnóstico rutinario de brucelosis no incluye <i>B. canis</i> en esta Investigación |

Cuadro 9. Continuación

| | | | |
|---------------------------------------|---|--|---|
| Prueba de piel alérgica con Brucellin | Respuesta inmune cutánea a la cepa rugosa de brucella | Esta prueba es altamente eficiente en discriminación entre casos de brucelosis verdadera y falsos positivos. Reacciones serológicas. | No puede discriminar entre la infección y la vacunación 85. Esta prueba se prescribe como prueba alternativa por la OIE (OIE, 2009) |
|---------------------------------------|---|--|---|

Fuente. Tomado del autor.

CONCLUSIONES

Los métodos de diagnóstico y su interpretación resultan muy complejos en cuanto a la veracidad y las facilidades que el investigador pueda tener para realizar el análisis.

Según los autores existen diversos métodos con alta veracidad pero resulta complicado por los escenarios en los que el ganadero o el investigador puede encontrarse, ya que no se tiene acceso a muchos de ellos; en cuanto a los de bajo costo y de fácil manejo no tienen un nivel de sensibilidad necesarios para dar un diagnóstico verídico, por lo tanto se deben utilizar métodos complementarios con altos costos y de suma dificultad para una persona sin instalaciones ni conocimientos necesarios para desarrollarlos.

En el caso de *Brucella* spp. es complicado escoger un método para diagnosticar este patógeno con la seguridad de no presentar un diagnóstico errado. Al empezar el trabajo la intención fue la de elegir un método verás, pero lastimosamente los documentos para realizar este review se encuentran con fechas alrededor del 2000 y los trabajos recientes no permiten ser descargados de manera gratuita, por lo cual se dificultó mucho más el method research.

LITERATURA CITADA

Agroalimentaria, S. N. 1999. Plan nacional de control y erradicación de brucelosis y tuberculosis bovina. *Resolución 115/99*. Argentina.

Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., & Frangoulidis, D. 2003. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clinical laboratory*, 49(9-10): 487-505.

Alton, G. G., J. Maw, B. A. Rogerson, & G. G. McPherson. 1975. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Australian Veterinary Journal*, 51(2): 57-63.

Aparicio-Bahena, A., E. Díaz-Aparicio, L. Hernández-Andrade, R. Pérez-González, E. Alfonseca-Siva, F. Suarez-Güemes. 2003. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato con brucellosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Tec Pecu Mex* 41(2): 129-140.

Araj, G. F. 2010. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International journal of antimicrobial agents* 36(S1): 12-17.

- Boschiroli, M. L., V. Foulongne, & D. O'Callaghan. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current opinion in microbiology*, 4(1): 58-64.
- Bricker, B. J. 2002. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Veterinary microbiology*, 90(1): 433-434.
- Christopher, S., B. L. Umapathy, & K. L. Ravikumar. 2010. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of laboratory physicians*, 2(2): 55-60.
- Costa, E. A., Sant'Ana, F. M., Carvalho, C. J. S., Moustacas, V. S., Silva, S. M. M. S., Paixão, T. A., & Santos, R. L. 2012. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the State of Piauí. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(3): 751-754.
- De Miguel, M. J., C. M. Marín, P. M. Muñoz, L. Dieste, M. J. Grilló, & J. M. Blasco. 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4): 1458-1463.
- Di Lorenzo, C. 1991. Sensibilidad y especificidad relativas de la prueba de Angus y Barton (BPA). *Therios*. 17. 82. mensual.
- Ewalt, D. R., & B. J. Bricker. 2000. Validation of the Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of *Brucella abortus* Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. *Journal of clinical microbiology*, 38(8): 3085-3086.
- Gall, D., K. Nielsen, L. Forbes, W. Cook, D. Leclair, S. Balsevicius, & M. Mallory. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1): 110-118.
- García-Carrillo, C. 1988. Efectos de la vacuna oleosa en adyuvante oleoso aplicada un mes antes o un mes después de la vacuna *B. abortus* cepa 19 sobre la inmunidad contra la brucelosis en cobayos. *Vet. Arg.* 5: 178-179.
- Geresu, M. A., & G. M. Kassa. 2016. A review on diagnostic methods of brucellosis. *Journal of Veterinary Science and Technology* 7(3).
- Godfroid, J., K. Nielsen, & C. Saegerman. 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian medical journal*, 51(4): 296-305.
- González J, J. R. 1995. Modificación del tiempo de lectura de la técnica de BPA en el diagnóstico serológico de brucelosis. *Therios* 23: 17-23.
- González-Tomé, J. S., L. J. Villa., E. Del Palacio, & R. Gregoret. 1989. El test de Angus y Barton (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, 70: 34-36.
- González-Tomé, J. S., E. D. Palacio, L. E. Samartino, & R. J. Gregoret. 1990. Secuencia de anticuerpos de la clase IgG en bovinos mayores de un año vacunados con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Revista de Medicina Veterinaria*, 71(3): 46-52.
- Huynh Y, E. A. 2008. Multiple locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) of *Brucella* spp. *Humana press Totowa*, 47-54.
- Jacobo, R. A., L. Anderson, C. A. Storani, G. M. Stamatti, M. F. Cipolini. 2002. Diagnóstico serológico de brucelosis bovina: variaciones de resultados postvacunales. *Rev. Vet.* 12/13(1 y 2): 19-21.
- Lage, A. P., F. P. Poester, T. A. Paixão, T. M. A. Silva, M. N. Xavier, S. Minharro, & R. L. Santos. 2008. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32(3): 202-212.
- Lim M.L, Rickman L.S. 2004. Brucellosis. *Infect Dis Clin Prac.* 12(1): 7-14.

- Lovane, G. 1988. Estudio sobre vacunación simultánea contra fiebre aftosa y brucelosis en Búfalos. *Vet Arg* 5: 260-262.
- Martínez-Herrera, D. I., A. Peniche Cardeña, S. G. Hernández Ruiz, M. A. Abeledo, F. T. Barradas-Piña, M. Villanueva-Valencia, R. Flores-Castro. 2011. Evaluación de la Cepa S19 *Brucella abortus* en el control de la Brucelosis Bovina en Actopan, Veracruz, México. *Revista de Salud Animal*, 33(1): 44-50.
- Mitka, S., Anetakis, C., Souliou, E., Diza, E., & Kansouzidou, A. 2007. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *Journal of clinical microbiology* 45(4): 1211-1218.
- Nielsen, K., D. Gall, P. Smith, S. Balsevicius, F. Garrido, M. D. Ferrer, & R. Bermudez. 2004. Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Rev. Sci. Tech*, 23(3), 979-987.
- Nielsen, K., D. Gall, P. Smith, A. Vigliocco, B. Perez, L. Samartino, & F. Enright. 1999. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 68(3): 245-253.
- Özdemir, M., B. Feyzioğlu, M. G. Kurtoğlu, M. Doğan, H. T. Dağı, Ş. Yükksekaya, & B. Baysal. 2011. A comparison of immunocapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis. *Int J Med Sci*, 8(5), 428-32.
- OIE Terrestrial Manual (2009). Bovine brucellosis. En *Terrestrial manual of animal*. OIE. (2009). Bovine epididimitis.
- Peninpede, E. 1992. Inmunoserología de brucelosis bovina. Pruebas de seroaglutinación. *Therios* 19: 354-361.
- Penninpede, E. F., C. M. Gómez, J. A. Bernagozzi, M. C. Venturini, E. Mortola, D. Naumovich, & C. L. Di Lorenzo. 1996. Inmunoserología en brucelosis bovina: características operativas de la técnica de microaglutinación. *Therios* 25: 138-145.
- Pentrini, R.L. 1994. El uso de la prueba de BPA en el diagnóstico serológico de brucelosis bovina. *Vet. Arg.* 11: 462-468.
- Perrett, L. L., J. A. McGiven, S. D. Brew, & J. A. Stack. 2010. Evaluation of competitive ELISA for detection of antibodies to *Brucella* infection in domestic animals. *Croatian medical journal* 51(4): 314-319.
- Poester F.P., K. Nielsen, L.E. Samartino, W.L. Yu. 2010. Diagnosis of brucellosis. *The Open. Vet. Sci. J.* 4: 46-60
- Poester, F. P., V. S. Gonçalves, T. A. Paixao, R. L. Santos, S. C. Olsen, G. G. Schurig, & A. P. Lage. 2006. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine* 24(25): 5327-5334.
- Poester, F. P., K. Nielsen, L. E. Samartino, & W. L. Yu. 2010. Diagnosis of brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal* 4(1): 46-60.
- Queipo-Ortuño, M. I., J. D. Colmenero, J. M. Reguera, M. A. García-Ordóñez, M. E. Pachón, M. González, & P. Morata. 2005. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clinical microbiology and infection*, 11(9): 713-718.
- Ramos-Vara, J. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42: 405-426.
- Redkar, R., S. Rose, B. Bricker, & V. Del Vecchio. 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and cellular probes* 15(1): 43-52.

- Samartino, L. E., J. S. González-Tomé, & E. Del Palacio. 1986. Secuencia y comportamiento de las inmunoglobulinas séricas en terneras vacunadas contra brucelosis. *Rev. Med. Vet*, 67(6): 308-313.
- Santos, R. de L., G. M. da Costa, & E. N. Martins. 1998. Detección de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina -biotina-peroxidasa en el testículo y en el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Archivos de Reproducción Animal* 6: 34-41.
- Sarigüzel, F. M., T. Kayman, I. Celik, & N. Koc. 2011. Comparison of standard tube agglutination, coombs' and brucellacapt tests in the diagnosis of brucellosis. *New J Med*, 28: 113-115.
- Whatmore, A. M., L. L. Perrett, & A. P. MacMillan. 2007. Characterization of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC microbiology* 7(1): 34.
- Winchell JM, Wolff BJ, Tiller R. 2010. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol*. 48: 697-702.
- Wyatt, H. V. 2005. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 98(10): 451-454.
- Xavier, M. N., T. A. Paixão, F. P. Poester, A. P. Lage, & R. L. Santos. 2009. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *Journal of comparative pathology*, 140(2): 149-157.