

DESARROLLO DE UN NUEVO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO PARA BRUCELOSIS BOVINA UTILIZANDO LPS Y CADENA O DEL LPS DE BRUCELLA ABORTUS

Cantero, J.G.¹; Mon, L.³; Cravero, S.³; Samartino, L.²; Conde, S.²; Gutierrez, G.¹; Rovira T.¹; Gil, A.⁴; Piagio J.⁴; Nuñez A.⁴, Romano, M.I.³. 2011. Veterinaria Argentina, 28(282).

¹ Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Veterinarias, San Lorenzo. Paraguay.

² Instituto de Patobiología. Centro de Investigaciones Veterinarias y Agronómicas (CICVyA). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. Argentina.

³ Instituto de Biotecnología. Centro de Investigaciones Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. Argentina. Los Reseros y Nicolás Repetto s/n Castelar (1712). Provincia de Buenos Aires. Argentina. Teléfono: 0054-11-46211447. Fax: 0054-11-46210199.

⁴ Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.
www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Enfermedades y problemas reproductivos](#)

RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad endémica en los países del MERCOSUR. Provoca principalmente abortos. Uno de los principales antígenos de *Brucella abortus* es el lipopolisacárido (LPS), el cual consta de una parte glicolípida (lípidos A) y otra polisacárida expuesta hacia el exterior, formada por el núcleo o *core*, más interno y la cadena O. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar un inmunoensayo, denominado APIA (antígeno printeado inmunoanálisis), para el diagnóstico de brucelosis bovina, con los antígenos LPS y cadena O del LPS de *Brucella abortus*, adheridos a una membrana de nitrocelulosa. Cuando se utilizó como antígeno el LPS de *Brucella abortus* 85% de los sueros de los animales positivos reaccionaron con el antígeno en el formato APIA, en cambio con la cadena O del LPS muy pocos sueros positivos reconocieron este antígeno. La especificidad del APIA-LPS y APIA-Cadena O fue 100 %, incluyendo para calcularla sueros de animales positivos, negativos, y vacunados con S19 o RB51. Debido a que solo con LPS total como antígeno se detectó una considerable cantidad de animales enfermos, en un segundo paso de este trabajo se evaluó solo el APIA-LPS con a) 40 sueros de animales con status sanitario conocido, de los cuales 10 eran sueros de un rodeo positivo a Brucelosis de Uruguay, confirmado con las pruebas de RB, 2-ME, SAT, BPA y FPA, y los restantes 30 eran animales con otras patologías; b) muestras de suero de 215 animales de Uruguay de 3 tambos diferentes, y 359 de animales de Paraguay de 4 tambos diferentes, todos de status sanitario desconocido. Los sueros de estos rodeos fueron también evaluados con las pruebas convencionales para brucelosis. De los 40 sueros de Uruguay solo los 10 sueros del rodeo con brucelosis fueron positivos por APIA-LPS. De las muestras de rodeos de status desconocido de Uruguay y Paraguay, se obtuvo con APIA-LPS un total de 6 sueros positivos en Uruguay, todos los positivos fueron del mismo establecimiento, y 8 positivos a Brucelosis por APIA-LPS en Paraguay, también todos pertenecientes al mismo establecimiento. Todos estos sueros fueron también evaluados con las pruebas: RB, 2-M, SAT, BPA y FPA. En todos los casos los resultados de las pruebas convencionales coincidieron con APIA-LPS.

Los resultados demostraron que el APIA-LPS, es una valiosa herramienta diagnóstica para identificar animales con brucelosis bovina. Se puede procesar gran cantidad de sueros en forma simultánea y identificar positivos aun en rodeos que no tenían historia clínica, además permite diferenciar animales infectados de vacunados, tanto con la cepa S19 como con la cepa RB51.

Palabras clave: *Brucella abortus*; diagnóstico; APIA-LPS.

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 a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. Por otro lado, constituye un importante problema para la salud pública. El hombre adquiere la infección por el consumo de leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto con material infeccioso (Cherwonogrodzky, 1990; Corbel, 2009).

La lucha contra la Brucelosis se basa en cuatro aspectos fundamentales: el conocimiento de la enfermedad, el diagnóstico correcto, la vacunación y la eliminación de los animales positivos con un único destino el sacrificio.

La vacunación y el diagnóstico de los animales constituyen una herramienta muy valiosa para los planes de control y erradicación (Nicoletti, 1990; Olsen, 2005; Samartino, 2002; 2007).

El agente causal de la brucelosis es la bacteria *Brucella* (B) spp. Se trata de un cocobacilo, aeróbico, Gram negativo. Se conocen 8 especies, cuyos reservorios naturales principales para las distintas especies son: vacunos (*B. abortus*), caprinos (*B. melitensis*), porcinos (*B. suis*), ovinos (*B. ovis*), caninos (*B. canis*), roedores (*B. neotomae*) y, además, la recientemente hallada en mamíferos marinos (*B. ceti* y *B. pinnipedialis*) (Corbel, 2009).

La *Brucella* posee una envoltura celular característica: la membrana externa, la membrana interna y un espacio periplásmico intermedio. En el periplasma hay proteínas y un glicopeptido denominado peptidoglicano responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. En la membrana externa hay antígenos que han sido objeto de investigación desde el punto de vista del diagnóstico y de la inmunoprofilaxis; este interés se debe a que representa el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador. Las moléculas mejor caracterizadas corresponden a dos grupos: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (Cloekaert, 1992).

Las especies de *Brucella* pueden ser clasificadas como “lisas” (*smooth*, S) o “rugosas” (*rough*, R) de acuerdo al aspecto de las colonias en medio sólido. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de LPS expresado en mayor proporción en superficie: LPS-S y LPS-R, respectivamente. El LPS-S consta de una parte glicolípida (lípidos A), inserta en la membrana externa y otra polisacáridica expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo o *core*, más interno y la cadena O. Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en el LPS-R de las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) (Corbel, 2009). La 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* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta y blanco de anticuerpos protectores. Pero la cadena O posee epítopes compartidos con otras especies bacterianas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O:157 H7 responsables de reactividad cruzada en las pruebas serológicas que se basan en la detección de anticuerpos hacia este antígeno (Nielsen, 2004). La cepa vacunal *B. abortus* S19, es lisa, por lo tanto posee *core* de LPS y cadena O, en cambio la cepa vacunal *B. abortus* RB51 es rugosa, por lo tanto no posee cadena O (Moreno, 1979; Nicoletti, 1990; Olsen, 2006).

El diagnóstico habitual de brucelosis bovina es serológico. Dentro de éstos, las técnicas más ampliamente utilizadas son aglutinación con antígeno en placa (BPA), rosa de bengala (RB), seroaglutinación en tubo (SAT), aglutinación con 2-ME (2-ME) y fijación de complemento (FC) (Nielsen, 2002; Samartino, 2007).

El diagnóstico definitivo de cualquier enfermedad es obtenido por aislamiento e identificación del agente, método viable cuando se trabaja con rebaños. Pero en el caso de Brucelosis, las operaciones de certificación de rebaños libres se apoyan en el serodiagnóstico, teniéndose en cuenta en la elección de las pruebas a ser aplicadas, a sus características intrínsecas, al costo y a la practicidad de la ejecución (Samartino, 1999; 2002; 2007). Existen varios test utilizando antígeno acidificado buferado, como BPA y RB, y podemos ver que la mayoría de los países los usan dentro de una batería de técnicas, sin embargo, no siempre son las mismas (Nielsen, 2002; Paulin, 2009; Samartino, 2002).

En los países del Mercosur se utiliza como tamiz el RB, el test del anillo, y el BPA. Para confirmar los resultados del tamiz los países emplean principalmente, el FC, el Rivanol, el 2-ME y los tests inmunoenzimáticos (ELISA), utilizados en Argentina y Chile. En Brasil, los tests oficiales del Programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y de la Tuberculosis (PNCEBT) son RB, el 2-ME y el FC. En Paraguay se utiliza principalmente RB y 2-ME. En Argentina, son ejecutados los mismos tests, aunque el RB es substituido por BPA. En Uruguay, se utiliza el RB y el 2-ME no es utilizado. Las pruebas de aglutinación convencionales para el diagnóstico de brucelosis, en particular SAT, poseen una baja especificidad debido a la presencia de IgM no específica. Las pruebas de BPA y 2-ME son usadas frecuentemente para determinar la infección por *B. suis*, sin embargo no son confiables para un diagnóstico individual. Es de destacar que ninguna de las pruebas serológicas convencionales son totalmente confiables para el diagnóstico indirecto de brucelosis en animales individuales (Samartino, 2007). La Organización Mundial de Epizootias (OIE) recomienda las pruebas de ELISA competitivo (C-ELISA) y de polarización fluorescente (FPA) como pruebas confirmatorias para el diagnóstico individual. Es importante considerar pruebas de diagnóstico serológicas que utilicen los principales antígenos de *Brucella*, LPS o su polisacárido O, y evaluar si se elimina el problema de la reactividad cruzada con animales vacunados (Nielsen, 2002). El presente trabajo tiene como objeto evaluar un test para el diagnóstico de brucelosis bovina que consiste en la aplicación del antígeno LPS o su cadena O en una membrana de nitrocelulosa. El test fue denominado APIA (antígeno preñtado immunoanálisis).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de animales:

Los sueros usados para evaluar el APIA-LPS y APIA-Cadena O fueron de 100 bovinos positivos y 100 negativos a las siguientes técnicas convencionales de diagnóstico de brucelosis: BPA, SAT, 2-ME y FPA; así como 18 animales vacunados con S19 y 10 vacunados con RB51, 203 días post vacunación.

Luego se evaluó el APIA-LPS con el suero de 40 animales de status sanitario conocido: 5 animales con diagnóstico de Leptospirosis, 5 animales con Paratuberculosis, 10 animales de un establecimiento con brucelosis, 5 animales diagnosticados con Neoporosis y 15 animales sanos.

También se evaluaron 215 animales de 3 establecimientos de Uruguay y 359 animales de 4 tambos de Paraguay. Los sueros de estos animales fueron evaluados con la prueba APIA-LPS, estos sueros también fueron evaluados con RB, 2-ME, SAT, BPA y FPA, como prueba confirmatoria.

Obtención del LPS y cadena O:

Se obtuvo el LPS de una pasta húmeda de *Brucella abortus* cepa 1119 crecida en medio de cultivo agar papa. La cepa creció cuatro días a 37°C, al finalizar este tiempo se levantó del agar papa con solución fisiológica, se centrifugó y eliminó el sobrenadante. De este procedimiento se obtuvo 92 gramos de pasta húmeda. Se extrajo el LPS utilizando fenol, según protocolo descripto (Nielsen, 1996b), al cual se le aplicaron las siguientes modificaciones: se resuspendió el pellet con 170 ml de agua bidestilada, se preparó 190 ml de fenol al 90% y se llevó ambas soluciones a baño maría de 60°C para equilibrar las temperaturas, se mezcló y se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos a 4°C, como resultado de la centrifugación se observaron cuatro fases: la capa de agua saturada de fenol (superior), un sedimento sobre la fase fenólica, la fase fenólica y por último el pellet. Se descartó la fase superior con una pipeta y el resto se filtró con un filtro Whatman 3M, de este filtrado se almacenó una fracción a -18°C y la otra fracción continuó con el proceso. Se agregó al filtrado 360 ml de una solución de metanol (que contiene 1 % de metanol saturado con NaAc) y se dejó 24hs a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos a 4°C, al pellet se le añadieron 70 ml de agua destilada, y se llevó a agitación a 4°C durante 48 horas, luego se almacenó 72 horas a 4°C. Se centrifugó a 11000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se conservó la solución sobrenadante y se agregaron 40 ml de agua destilada al pellet, dejando en agitación durante 120 minutos, posterior a este proceso se repitió la centrifugación a 11000 rpm recuperándose nuevamente la fracción del sobrenadante, obteniendo de esta manera un pool del sobrenadante de ambas centrifugaciones con un volumen final de 100 ml.

Se añadieron 5 gramos de ácido tricloroacético, dejando reposar 15 minutos para luego centrifugar a 11000 rpm por 10 minutos. La solución sobrenadante se dializó en agitación constante en agua destilada durante 24 horas con cambios continuos del agua. Luego de dializar la solución se procedió a la sonicación con 5 ciclos a 6 watts por 30 segundos manteniéndola en baño frío. Se alicuotó la solución del LPS para su almacenamiento a -18°C.

Para la preparación de la cadena O fueron agregados 400 ml de 2% v/v de ácido acético a 36 gramos de pasta centrifugada de *Brucella abortus*. Dicha solución fue autoclavada durante 15 minutos a 121°C. Se llevó a 4°C usando un baño frío y se neutralizó a un pH aproximado de 7 utilizando 5,0M de NaOH. Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se agregó a la solución sobrenadante 20 gramos de ácido tricloroacético (5% Peso/volumen) y se dejó 30 minutos a 4°C en agitación permanente. Nuevamente se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se dializó la solución sobrenadante en agua destilada durante toda la noche. Al día siguiente se continuó con la agitación por 4 hs. en 0,01M de Buffer fosfato a un pH 6,8 conteniendo 0,1M de NaCl. Se almacenó congelando a -18°C hasta su aplicación en el APIA. Parte del producto obtenido del proceso de elaboración de la cadena O fue tratada con Polimixina B, mientras la otra fue dejada sin este tratamiento.

Rosa de Bengala.

Se utiliza un antígeno de *Brucella abortus* biotipo 1 (cepa 99S o cepa 1119-3) acidificado regulado y teñido con Rosa de Bengala a un pH de 3.65 +/- 0.05 para la detección de aglutininas específicas de *Brucella*. En la placa de prueba se coloca el antígeno y muestras de suero. Se mezcla suavemente el Antígeno Rosa de Bengala hasta que se encuentre totalmente homogéneo, después se coloca 30 µL en la placa de prueba, en el mismo círculo donde se colocó la muestra de suero, se mezclan. La observación de cierta aglutinación se considera positiva.

Las diferentes técnicas para el diagnóstico de brucelosis por métodos convencionales se realizaron de acuerdo a los protocolos ya establecidos (Godfroid, 2010) APIA-LPS

Una vez obtenidos los antígenos LPS y cadena O, se realizaron varias diluciones con buffer TBS 1x (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5) para hallar la concentración óptima para el trabajo. Tanto los antígenos LPS, como la cadena O tratada con Polimixina B y sin tratar fueron aplicados en un volumen de 20µl de cada dilución a la membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™ -ECL), utilizando un aerosolizador semi automático (Ca-

mag Scientific Inc., Wilmington, Delaware) y generando bandas paralelas con diferentes concentraciones de los antígenos.

Las membranas fueron bloqueadas por 1 hora con una solución bloqueante de TBS leche que se preparó con 5 gramos de leche en polvo descremada en 100 ml de TBS 1x, a esto se le añadió 50 µl de tween 20. Por otro lado se realizaron diluciones de los sueros 1:100 en la solución bloqueante. Luego las membranas fueron colocadas en un *mini blotter* (Isogen Biosolutions The Netherland) que posee 45 calles, donde se depositó 180 µl de suero en cada calle perpendicularmente a las bandas del antígeno. Cada membrana fue incubada por 1h con los sueros en el *mini blotter*. Luego de la incubación se retiraron los sueros por vacío y se realizaron 3 lavados de 10 min. con TBS 1x. Luego se incubó la membrana con la proteína G unida a peroxidasa (BIORAD catalogo 1706425) diluida 1:500 en solución bloqueante, se sembró 180 µl de esta dilución en cada calle del mini blotter y se incubó 90 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS 1x y se retiró la membrana de nitrocelulosa del *mini blotter*. El sustrato para revelar la actividad enzimática se preparó como sigue: 20ml de TBS 1x pH7.5 y 4 ml de 4-Cloro-1-naftol (sigma, USA) (para preparar la solución del 4-Cloro-1-naftol: 1ml de metanol por cada 3mg de 4-Cloro-1-naftol). Esta solución se depositó en un recipiente con la membrana de nitrocelulosa y se dejó en agitación durante 5 minutos, luego se agregó 24 µl de H₂O₂ y se esperó 5 minutos para detener la reacción con H₂O. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. El proceso de desarrollo del APIA-LPS y la evaluación visual, donde la presencia de banda coloreada fue considerada como resultado positivo, puede verse en la Figura 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pocos sueros de animales infectados detectaron la cadena O del LPS tratada y sin tratar con polimyxina, aplicada en la membrana de nitrocelulosa; por lo tanto este antígeno no parece brindar una mayor especificidad diagnóstica (dato no mostrado). Por lo tanto continuamos trabajando en la evaluación del APIA-LPS. De un total de 228 sueros, el APIA-LPS detectó 85 de los 100 sueros positivos a BPA, SAT, 2-ME, y FPA; mientras que 100 sueros negativos a las mismas técnicas convencionales, 18 sueros de animales vacunados con S19 y 10 vacunados con RB51 fueron negativos en el APIA-LPS (especificidad 100% y la sensibilidad 85%). Los resultados mostraron ausencia de falsos positivos tanto con los sueros no reactivos con los test convencionales, como con los sueros de los animales vacunados, lo que implica no reactividad cruzada del LPS, al menos con los sueros evaluados. Los resultados pueden verse en la Tabla 1.

El LPS ha sido usado previamente en ELISA. Para detectar los anticuerpos de la clase IgG1 contra *B. abortus* en las hembras, fue utilizado el IELISA (kit Ceditest® *B. abortus*) desarrollado por el IASH – Institute for Animal Science and Health, cuyo antígeno se constituyó del LPS de la pared de *Brucella abortus*, demostrando una reactividad óptima (Institute for Animal Science and Health, 2000, Nielsen, 2004, Nielsen, 1996a). Nuestros resultados confirman resultados previos de serología con LPS, donde se demuestra la antigenicidad de esta molécula.

El grado de concordancia entre APIA-LPS y el conjunto de resultados con los test convencionales de brucelosis fue estimada y calculada como valor kappa. El valor de kappa fue de 0,87 indicando muy buena correlación entre los test.

Estos resultados sugieren que el APIA-LPS podría resultar una buena herramienta para un diagnóstico inicial y a la vez podría considerarse un diagnóstico complementario de brucelosis bovina. La elección de la membrana de nitrocelulosa como fase sólida tiene la ventaja de la mayor facilidad para adherir antígenos que los microplatos de poliestireno. APIA no solo tiene alta especificidad, sino también ventajas técnicas, al utilizar menor volumen de muestra y permitir un procesamiento de múltiple sueros en menor tiempo.

La evaluación de los resultados del APIA son visuales, al no utilizar ningún aparato de detección, las membranas pueden ser confeccionadas y luego distribuidas a temperatura ambiente a laboratorios distantes que posean solo requerimientos básicos (Figura 1). Finalmente, se pueden aplicar en las membranas varias antígenas en forma paralela, esto involucra poder realizar un análisis simultáneo para varias enfermedades.

El APIA al diferenciar animales vacunados con S19 y RB51, de los infectados, evitará eliminar animales falsos positivos lo que implica una mayor eficacia en el programa de control.

Para validar el APIA-LPS, se tomaron muestras de 40 animales de status sanitario conocido. Diez sueros de los 40 sueros provenían de animales con síntomas clínicos de brucelosis, y positivos por RB, 2-ME, SAT, BPA y F.P.A. Estos sueros fueron también positivos en el APIA-LPS, los resultados pueden verse en la Figura 1. Luego se obtuvieron muestras de sueros de establecimientos de status sanitario desconocidos de Uruguay y Paraguay. En Uruguay en total se obtuvo 215 sueros de tres establecimientos diferentes y en solo uno de ellos se identificó 6 animales positivos a Brucelosis por LPS-APIA. En Paraguay se evaluaron 359 sueros de 4 diferentes tambos y resultaron positivos en LPS-APIA 8 animales, todos del mismo rodeo.

Los sueros de rodeos de status sanitario desconocidos fueron también evaluados con RB, 2-ME, SAT y F.P.A; resultaron positivos 14 animales tanto con APIA-LPS como con las técnicas convencionales. Los resultados pueden verse en la Tabla 2 y Figura 2.

Este nuevo método puede ser de gran utilidad para aplicar a programas de controles sanitarios de brucelosis bovina, junto con programas de prevención por medio de vacunas, mejorando la situación de la brucelosis en los rodeos, donde las principales herramientas de control son la vacunación masiva, la identificación y rápida eliminación de los animales infectados.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado y realizado en el contexto del proyecto Biotech MERCOSUR UE 1271117.

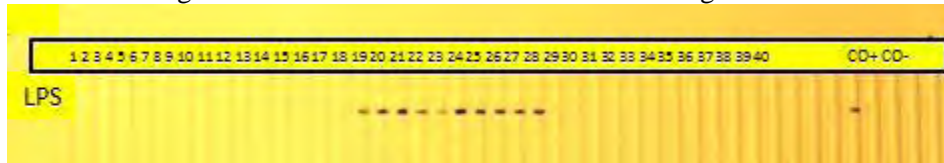
Tabla: 1 Resultados del test APIA utilizando el LPS (APIA-LPS)

Muestras	Positivos APIA-LPS	Negativos APIA-LPS	Total
Positivas RB, 2-ME, SAT, BPA y FPA	85	15	100
Negativas RB, 2-ME, SAT, BPA y FPA	100	100
Vacunados S19	18	18
Vacunados RB51	10	10
Total de Sueros evaluados			228

Tabla 2: Evaluación a campo en Paraguay y Uruguay, del APIA-LPS

	Cantidad total de Muestras	Positivos a APIA	Negativos a APIA
Paraguay	359	8	351
Uruguay	215	6	209
Total	574	14	560

Figura 1: Membranas de nitrocelulosa con antígeno LPS



En figura 1 se ve la evaluación de 40 sueros de animales de establecimientos con status sanitario 5 conocido en Uruguay. Lineas: 19 a 29 corresponden al suero de animales de un rodeo positivo a 6 Brucelosis. Lineas: 1 a 18 y 30 a 40, corresponden a sueros de animales con otras patologías. Co+: 7 Control positivo. CO-: Control negativo.

Figura 2

	<p>Aplicación del lps en la membrana de nitrocelulosa</p> <p>Incubacion de la membrana con las muestras de suero</p>
<p>Incubación de la membrana con la proteína G unida a peroxidasa y desarrollo de color.</p>	

Controles positivos y negativos Muestras positivas de campo de Uruguay y Paraguay

BIBLIOGRAFÍA

1. CHERWONOGRODZKY, J.W., DUBRA, Y. G., MORENO, E., MAYER, H. 1990. Antigens of *Brucella*. In: Nielsen K. y Duncan J.R, (Eds.) Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, 19-64 pp.

2. CLOECKAERT, A., KERKHOFS, P., LIMET, J.N. 1992. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3168-3174.
3. CORBEL, M.J., BRINGLEY MORGAN, W.J. 2009. OIE (World Organisation for Animal Health). In. Manual of Diagnostic and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.8.5. Genus *Brucella*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Krieg N.R, Holt J.G. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, USA, (1984, OIE 2009) 377-388 pp.
4. INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH. Ceditest® *Brucella abortus*. ELISA for detection of antibodies against *Brucella abortus* in bovine serum and milk. Lelystad: I.A.S.H., 2000. 9p.
5. MORENO, E., PITT, M.W., JONES, L.M., SCHURIG, G.G., BERMAN, D.T. 1979. Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *J Bacteriol.* 138(2):361-9.
6. NICOLETTI, P. 1990. Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes* 13:147-68
7. NIELSEN, K., SMITH, P., WIDDISON, J., GALL, D., KELLY, L., KELLY, W., NICOLETTI, P. 2004. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. And *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Vet Microbiol.* 100(1-2):25-30.
8. NIELSEN, K. H., KELLY, L., GALL, D., BALSEVICIUS, S., BOSSÉ, J., NICOLETTI, P., KELLY, W. 1996a. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Prev Vet Med.* 26:17-32.
9. GODFROID, J., NIELSEN, K., SAEGERMAN, C. 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J.* 2010 ;51(4):296-305.
10. NIELSEN, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90:447-459.
11. NIELSEN, K., GALL, D., KELLY, L., VIGLIOCCO, A., HENNING, D., GARCIA, M. 1996b. Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for diagnosis of brucellosis. Monograph. Agriculture and Agri-Food Canada, Animal Diseases Research Institute, Nepean, Ontario, Canada. Cap 17: 68-69.
12. OLSEN, S.C., CHRISTIE, R.J., GRAINGER, D.W., STOFFREGEN, W.S. 2006. Immunologic responses of bison to vaccination with *Brucella abortus* strain RB51: comparison of parenteral to ballistic delivery via compressed pellets or photopolymerized hydrogels. *Vaccine* 24(9):1346-53.
13. OLSEN, S.C., STOFFREGEN, W.S. 2005. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev Vaccines* 4(6):915-28.
14. PAULIN, L.M.S., ANDRADE-PACHECO, W.A., CASTRO, V., FEDERSONI, I.S.P. 2009. Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella abortus* en bovinos. Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil 1252.
15. SAMARTINO, L. 2002. Brucellosis in Argentina. *Vet Micro* 90:1-4.
16. SAMARTINO, L., SCHUST, M., PIAZZA, E., SALUSTIO, E., CONDE, S. 2007. Diagnóstico de la brucelosis animal: Implementación de nuevas tecnologías. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú. Vol. 1.
17. SAMARTINO, L.E., GALL, D., GREGORET, R.J., NIELSEN, K. 1999. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine. *Veterinary Microbiology* 70:193-200.

Volver a: [Enfermedades y problemas reproductivos](#)