

Persistencia de anticuerpos séricos en bovinos Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú vacunados con *Brucella abortus* cepa 19.

Draghi, M. G.^{1*}; Samartino, L. E.²; Torioni de Echaide S.³; Conde S.²; Piazza, E.²; Schust, M.²; Biotti, G. M.¹; Aguirre, N.³

1. Sanidad animal INTA EEA Mercedes, Corrientes.
 2. Instituto de Patobiología, CICV y A, Castelar.
 3. Inmunología, EEA Rafaela, Santa Fe.
- *Correo electrónico: mgdraghi@correo.inta.gov.ar

Palabras clave

Brucelosis, bovinos, *Brucella abortus*, BPA, SAT, ELISA, FPA, vacunación.

RESUMEN

Se evaluó la persistencia de los anticuerpos en terneras Hereford (n=10), 3/8 Hereford (n=10) y 5/8 Cebú (n=10) de 5 meses de edad negativas a brucelosis, después de la vacunación con 2 ml de una vacuna comercial de *Brucella abortus* cepa 19. Se analizaron sueros obtenidos en los días 0, 7, 15, 21, 30, 45, 60 días y luego mensualmente hasta los 300 días post-vacunación, mediante pruebas serológicas convencionales y noveles. Muestras de sangre de los días 0, 150 y 360 PV se analizaron también por la reacción en cadena de la polimerasa para identificar ADN de *Brucella abortus* cepa 19. Mediante las pruebas serológicas convencionales se detectó mayor persistencia de los anticuerpos según la mayor proporción de sangre índica del biotipo bovino. El 5/8 Cebú mostró diferencias significativas ($p < 0.005$) respecto del Hereford con la máxima permanencia de anticuerpos, de más de 200 días, por las pruebas de antígeno bufferado en placa (BPA) y enzimoimmunoensayo indirecto (iELISA); de 150 días por seroaglutinación en tubo (SAT) y -2-Mercaptoetanol (2-ME) y de 90 días por fijación de complemento (FC). No hubo diferencias entre los biotipos bovinos mediante enzimoimmunoensayo competitivo (cELISA) y polarización fluorescente (FPA) y, la persistencia promedio de anticuerpos fue de 60 días. Se detectó ADN de *B. abortus* cepa 19 hasta el día 360 posvacunación sin hallar diferencias significativas entre biotipos. A partir de los 60 días pos vacunación los anticuerpos detectados con las técnicas de FPA y cELISA podrían atribuirse a una infección natural y no a la vacunación.

Keywords

Brucella abortus, BPA, SAT, ELISA, FPA, serology, vaccination.

SUMMARY

Persistence of antibodies in Hereford, 3/8 Hereford and 5/8 Zebu vaccinated with *Brucella abortus* strain 19.

Persistence of antibodies in Hereford (n=10), 3/8 Hereford (n=10) and 5/8 Zebu (n=10) was evaluated after vaccination with *Brucella abortus* strain 19. Ten 5 month old calves, brucelosis negative were analyzed for each biotype vaccinated with 2 ml of a commercial vaccine. Sera samples obtained on days 0, 7, 15, 21, 30, 45, 60 days and then monthly until 300 days post-vaccination (PV), were analyzed using conventional and novel serological tests. Blood samples from days 0, 150 and 360 PV were also analyzed by polymerase chain reaction to detect ADN of *B. abortus* strain 19. Higher persistence of antibodies in 3/8 Hereford and 5/8 Zebu than in Hereford was detected through the conventional tests. The 5/8 Zebu showed significant differences ($p < 0.005$) related to Hereford. They stayed positive up to 200 days by the buffered plate antigen (BPA) test and indirect ELISA; 150 days by the seroagglutination tube and 2-Mercaptoethanol tests, and 90 days by complement fixation test. The antibody titers were detected for 60 days PV and there were no differences between biotypes by competitive ELISA and fluorescence polarization. *B. abortus* S19 DNA was detected until day 360 PV. Competitive ELISA and fluorescence polarization would identify infections after 60 days of the officially vaccinated cattle of different biotypes.

Introducción

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto contagiosa producida por *Brucella abortus*, una bacteria intracelular facultativa que afecta a los animales y se transmite al hombre por vía cutánea o a través de membranas mucosas. El hombre se infecta por vía conjuntival, cutánea o a través de membranas mucosas. Los trabajadores rurales y veterinarios pueden contagiarse por manipular fetos abortados, terneros nacidos vivos de madres infectadas, durante los exámenes ginecológicos o por el tacto rectal. También están expuestos los trabajadores de frigoríficos

y aquellos que consuman leche o sus derivados proveniente de animales infectados. En bovinos, la enfermedad se caracteriza por producir abortos, retención de placenta, orquitis, epididimitis e infertilidad.

Todos los países que han calculado las pérdidas económicas de la brucelosis, han llegado a la conclusión de que son millonarias, aceptándose que la recompenza que se obtiene al controlarla justifica cualquier inversión.

Un comité de expertos en 1964/65 estimó para Argentina un 20 % de infección en ganado de cría y un 25% en lechería, con un índice de aborto en la primera infección de 30 a 40% de in-

fectados y un 1,6 a 2% de esterilidad. De acuerdo a estos datos las pérdidas de carne eran de 1.360.000 de terneros por abortos y de 525.000.000 litros de leche anualmente.

En Argentina la brucelosis bovina es una enfermedad de control obligatorio. El control oficial de la brucelosis se basa en la vacunación de las terneras entre 3 y 8 meses de edad con *B. abortus* cepa 19, el análisis serológico periódico y segregación de los animales positivos con destino a frigorífico^{23,24}. El diagnóstico serológico recomendado por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) se basa en la prueba tamiz del antígeno bufferado en placa (BPA) e

enzimoinmunoensayo indirecto (iELISA) y como confirmatorias seroaglutinación en tubos (SAT) en paralelo con 2-Mercaptoetanol (2-ME) y Fijación de Complemento (FC). Se han incorporado en los últimos años el Enzimo inmunoensayo competitivo (cELISA) y la prueba de polarización fluorescente (FPA)²².

Si bien se han realizado numerosos ensayos, no existe uniformidad de criterio en cuanto a la persistencia de los anticuerpos pos-vacunación (PV). Trabajos de distintos investigadores realizados en *Bos taurus*, sostienen que cuando los animales son vacunados entre los 3 y 8 meses de edad, las inmunoglobulinas G persisten hasta los 8 meses y la detección de anticuerpos después de ese período se debería a una infección natural^{3,5}.

En uno de los trabajos reportados se vacunaron 155 terneras Hereford y/o Flekvieh de 5 a 8 meses de edad con una vacuna de *B. abortus* cepa 19 comercial y evaluaron la respuesta de anticuerpos mediante las pruebas de Rosa de Bengala, SAT, 2-ME y FC. Entre los 5 y 6 días PV el 100% de los animales presentó IgM y el 78% IgG y se detectaron animales positivos mediante 2-ME hasta los 8 meses después de aplicada la vacuna²⁶.

En otro ensayo se vacunaron con *Brucella abortus* cepa 19, 145 terneras Aberdeen angus de 6 a 9 meses de edad, serológicamente negativas a brucelosis, en forma simultánea o después de aplicar la vacuna antiaftosa. Todas las terneras resultaron positivas a BPA, SAT, 2-ME y FC independientemente del momento de su aplicación alcanzando títulos entre 1/50 y 1/400 al 2-ME a las 3 semanas de vacunadas²⁹.

En otro trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral en 52 terneras Holando Argentino, de un establecimiento libre de brucelosis luego de la vacunación con *B. abortus* cepa 19 mediante 7 pruebas serológicas (BPA, RAP: Rapid Automated Presumptive Test, SAT, 2-ME, FC, enzimo inmunoensayo indirecto (iELISA), enzimo inmunoensayo de competición (cELISA) y prueba de polarización fluorescente (FPA)¹. A excepción de FPA las pruebas serológicas resultaron positivas en el 100% de las terneras vacunadas a los 7 días posvacunación. El FPA detectó el 68,5% de ellas y junto a cELISA fueron las pruebas que mostraron mayor precocidad para tornarse negativas, con más del 65% de las terneras negativas a los 2 meses PV. Sin embargo todas las pruebas serológicas fueron negativas en el 100% de las terneras a los 6 meses PV.

En el norte de Argentina el uso de *Bos indicus* y sus cruza está ampliamente difundido ya que las características de rusticidad lo hacen apto para la cría en zonas marginales. La persistencia

de anticuerpos posvacunación complicaría el diagnóstico. En bovinos *Bos indicus* se demostró que el 40% de las terneras vacunadas se mantenían positivas a FC 12 meses después de la vacunación, con una persistencia de anticuerpos significativamente mayor que en *Bos taurus*⁸. El comportamiento de estos anticuerpos en bovinos de diferentes biotipos difundidos ampliamente en el norte del país, no ha sido determinado⁵.

El objetivo del presente trabajo fue establecer la persistencia de anticuerpos contra *B. abortus* cepa 19 en tres biotipos bovinos mediante pruebas serológicas convencionales y de nueva generación y, determinar la persistencia de la cepa vacunal a través de la identificación del ADN en muestras de sangre.

Materiales y métodos

Se seleccionaron al azar 30 terneras de 5 meses de edad, del rodeo de la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Mercedes, Corrientes, distribuidos según los biotipos: Hereford (n=10), 3/8 Hereford (Bradford)(n=10) y 5/8 Cebú (Hereford x Brahman) (n=10). Todos fueron identificados con caravanas numeradas en ambas orejas y permanecieron en un predio de campo natural durante el transcurso de la experiencia.

Las terneras se vacunaron con 2 ml de una vacuna comercial de *B. abortus* cepa 19, conteniendo 15–30 x 10⁹ células viables, aprobada por el SENASA. Se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular los días 0 (previo a la vacunación) 7, 15, 21, 30, 45, 60, días pos-vacunación (PV) y a partir de ese momento una vez al mes hasta los 12 meses. Los sueros fueron centrifugados y almacenados congelados a –20° C hasta su análisis.

Para determinar la persistencia de los anticuerpos PV se utilizaron siete pruebas serológicas. El antígeno bufferado en placa (BPA)^{4,10} fue realizado según las modificaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)²¹. Los resultados se expresaron como positivos o negativos.

Las pruebas de seroaglutinación en tubos (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2-ME) fueron realizadas en paralelo según Alton et. al.² La interpretación de los resultados se hizo siguiendo el criterio del SENASA²²: Sueros con títulos $\geq 1:200$ para SAT y $\geq 1:25$ para 2-ME fueron considerados positivos.

La fijación del complemento (FC) se realizó según Alton et al.². Los resultados se expresaron en unidades internacionales fijadoras del complemento (UIFC) y se consideraron positivos animales con títulos ≥ 41 UFC²¹.

Se realizaron pruebas de enzimoimmunoensayo indirecto (iELISA) y competitivo (cELISA) y la prueba de polarización fluorescente (FPA), fueron realizadas siguiendo la metodología descrita por Nielsen et al^{14,15,16,17,18,19,20}. Los resultados se expresaron en porcentaje de positividad (PP) para iELISA, porcentaje de inhibición (%) para cELISA y en unidades de milipolarización (UmP) para FPA. Valores ≥ 50 PP, ≥ 40 %, de 104 UmP, fueron considerados positivos para cada prueba respectivamente.

Para BPA, SAT-2-ME y FC se emplearon antígenos comerciales y para iELISA, cELISA y FPA, se usaron reactivos cedidos por el Dr. Klaus Nielsen de CFIA Canadá.

Para la identificación del ADN se obtuvieron muestras de sangre en 10% de EDTA como anticoagulante en los días 0, 150 y 360 días PV. Las muestras se conservaron a –20° C hasta el momento de su procesamiento. La extracción de ADN se realizó siguiendo la técnica de Leal Klevezas et.al. (1995)^{11,12,13} con algunas modificaciones^{7,9}.

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una secuencia de 498 pb de un elemento genético IS711 inserto en el genoma de *Brucella spp*, mediante los oligonucleótidos 412F 5'- GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC- 3' y 416R 5'-TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- 3' específicos para *B. abortus*⁷. Se amplificó además otra secuencia del gen erl de *B. abortus* que permite diferenciar *B. abortus* cepa 19 (297pb) de la cepa silvestre y RB51 (1000pb), mediante los oligonucleótidos erl1 5'GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA 3' y oligo2 CCC AGA AGC GAG ACG AAA CG 3'³⁰.

Para cada muestra se utilizó 10X de buffer Tris ClH, 0.2M de DNTP's, 2.5 U de taq polimerasa, 0.5 μ M de cada primer, 3 μ M MgCl₂, 0.2-0.8 μ g de ADN, en un volumen final de 50 μ l y se incluyeron controles de ADN de *B. abortus* cepa 19 y RB51 de especie (bovino) y de reactivos.

Se empleó un termociclador Perkin Elmer que fue programado a 94 °C por 5 minutos; 40 ciclos a 94°C, 50 seg; 58°, 50 seg; 72°, 50 seg; extensión final a 72°C, 4 min y mantenimiento a 4°C. Los productos se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Los productos de PCR se diluyeron en buffer de corrida (0.25% de bromofenol, 0.25% xylene cyanol y 30% de glicerol en agua destilada).

Los 3 tratamientos (biotipos) se evaluaron utilizando un diseño en bloques al azar. Para el análisis estadístico se empleó el test de varianza y el de comparación de medias de Duncan según el paquete estadístico de SAS.

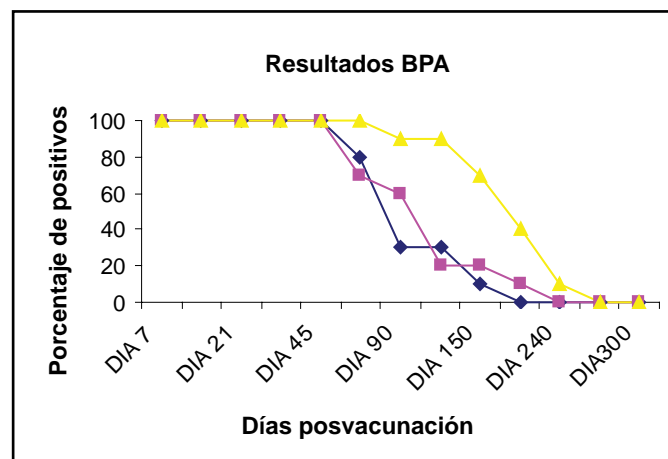
Tabla 1.

Persistencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* cepa 19 en los biotipos bovinos Hereford (H), 3/8 Hereford (3/8 H) y 5/8 Cebú (5/8 C) vacunados a los 5 meses de edad, analizada por diferentes pruebas serológicas utilizadas como Tamiz o confirmatorias. Antígeno bufferado en placa (BPA), Seroaglutinación en tubos (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2Me), Fijación del complemento (FC), Enzimoimmunoensayo indirecto (iELISA) y competitivo (cELISA) y la prueba de polarización (FPA).

Biotipo/Test	BPA	FC	SAT	2 ME	IELISA	CELISA	FPA
Hereford	138.00 b	64.40 b	52.10 b	74.35 b	96.00 b	54.150 a	60.750 a
3/8 H	184.50 a	80.90 b	62.80 b	68.45 b	99.75 b	55.850 a	71.250 a
5/8 Cebú	172.50 a	92.70 a	99.00 a	139.50 a	159.00 a	63.550 a	70.500 a
P	0.059	0.0387	0.0001	0.0001	0.0005	0.2880	0.2289

Figura 1.

Dinámica de los anticuerpos contra *Brucella abortus* cepa 19 en los biotipos bovinos Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú, vacunados a los 5 meses de edad, mediante pruebas serológicas usadas como tamiz. BPA: Antígeno bufferado en placa, i-ELISA Enzimoimmunoensayo indirecto.



◆ Hereford ■ 3/8 Hereford ▲ 5/8 Cebú

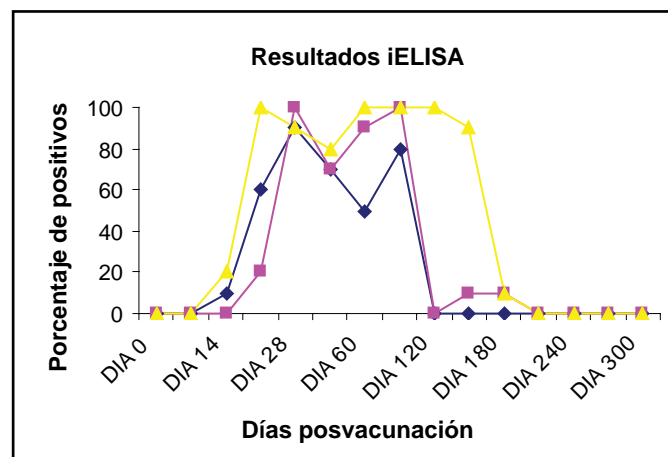


Figura 2.

Dinámica de los anticuerpos contra *Brucella abortus* cepa 19 en los biotipos bovinos Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú, vacunados a los 5 meses de edad, mediante pruebas serológicas usadas como confirmatorias. SAT-2Me: seroaglutinación en tubos – 2 Me (2 a), FC (2b), cELISA (2c), FPA (2d).

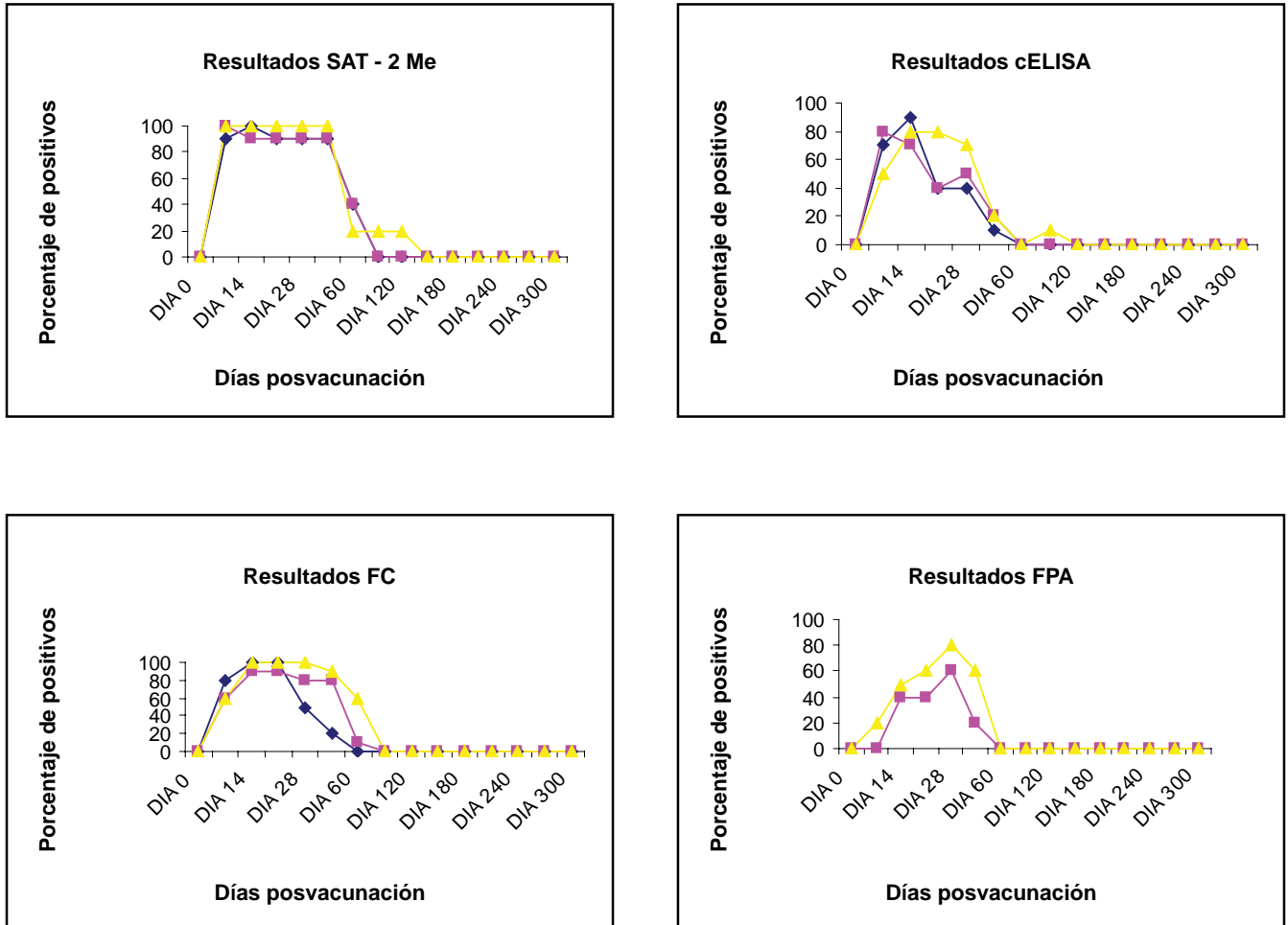
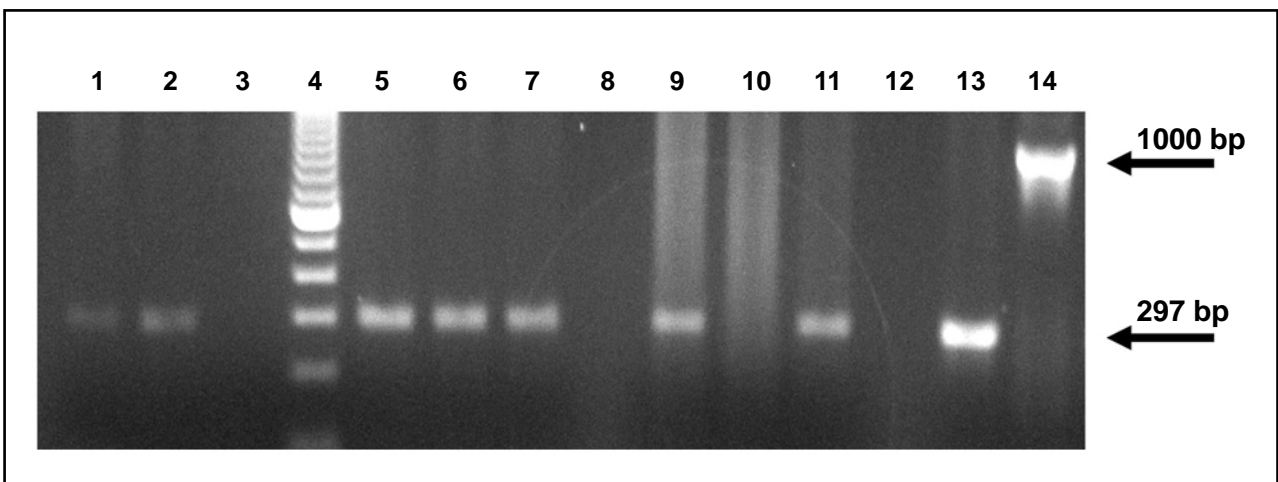


Figura 3.

Producto de PCR obtenido a partir de algunas muestras de sangre de terneras vacunadas con *Brucella abortus* cepa 19 a los 360 días post-vacunación, mediante los primers ERI 1 y OLIGO 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Calles 1 y 5 muestras de terneras Hereford; calles 2, 3, 8, 9, 10 y 11 muestras de terneras 3/8 Hereford, calles 6 y 7 muestras de terneras 5/8 Cebu.; calle 4: marcador molecular de 100 pb; calle 12: control negativo; calle 13: *B. abortus* cepa 19; calle 14: *B. abortus* RB51.



Resultados

Los resultados de la serología se presentan en la tabla 1 y se grafican para su mejor comprensión en las figuras 1 y 2.

Los análisis estadísticos indicaron:

BPA: No hubo diferencias significativas entre los animales 5/8 Cebú y 3/8 Hereford pero si entre éstos y los del biotipo Hereford. .

FC, SAT, SAT-2Me, iELISA: No hubo diferencias entre Hereford y 3/8 Hereford pero si entre estos y los 5/8 Cebú. cELISA y FPA: No hubo diferencias entre biotipos.

PCR: Los diferentes oligonucleótidos evaluados amplificaron la secuencia de 498 pb específica para *B. abortus* (dato no mostrado) y la de 297 pb específica para *B. abortus* cepa 19 y la de 297 pb específica para *B. abortus* cepa 19 (Figura 3). A los 150 días PV resultaron positivas el 80 % de las muestras para Hereford, el 50 % para 3/8 Hereford y 100% para 5/8 Cebú y a los 360 días el 100, 50 y 100 % respectivamente. No hubo diferencias significativas entre biotipos.

Discusión

La persistencia de los anticuerpos detectados mediante la prueba de BPA fue mayor en los biotipos con sangre índica (3/8 Hereford y 5/8 Cebú) que en los británicos. Para FC, SAT, 2-ME, e iELISA hubo diferencias de persistencia de anticuerpos circulantes, entre el biotipo con mayor porcentaje de sangre índica (5/8 Cebú) respecto del Hereford y el biotipo 3/8 Hereford. No hubo diferencias con cELISA y FPA entre los biotipos.

Podemos afirmar que cELISA y FPA son pruebas que permitirían diferenciar reacciones serológicas posvacunales de aquellas de infección tanto en bovinos de origen británico como índico, a partir de los 60 días posvacunación.

Entre los investigadores no existe uniformidad de criterio en lo referente a

persistencia de las inmunoglobulinas PV en terneras inmunizadas con *Brucella abortus* cepa 19.

En este trabajo se observó que los animales se negativizaban en un 100% en BPA a los 240 días, en FC a los 90 días, en SAT a los 150 días, en 2-ME a los 150 días, en iELISA a los 210 días, en cELISA y FPA a los 60 días después de la vacunación con *Brucella abortus* cepa 19.

Trabajos previos vacunando terneras *Bos taurus* con edades comprendidas entre los 5 y 8 meses de edad verificaron la desaparición de anticuerpos vacunales a los 8 meses PV (320 días) para 2-ME, RBT y FC26. En este caso la persistencia de inmunoglobulinas IgG detectadas por las pruebas de FC y 2-ME fue mayor, pero estos autores emplearon vacunas comerciales a las que realizaron controles previos de viabilidad y cuyos recuentos oscilaron entre 83 x 10⁹ y 181 x 10⁹ UFC/dosis.

Se midió la respuesta inmune en terneras Aberdeen Angus vacunadas simultáneamente con vacuna antiaftosa y *Brucella abortus* cepa 19. Todos los animales se seronegativizaron a los 6 meses (180 días) posvacunación a las pruebas de FC y 2-ME 29. En este trabajo se detectó una persistencia de 90 días más para las mismas pruebas. La persistencia reportada en terneras Holando Argentino fue mayor que en este trabajo 1.

Las diferencias encontradas con respecto a los resultados reportados en trabajos previos 8 pueden atribuirse a las cruces empleadas y a la concentración de las vacunas aplicadas.

La mayor persistencia de anticuerpos después de la vacunación podría interferir en la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas convencionales oficiales en el marco de la campaña nacional de control de la brucelosis. Sin embargo, cELISA y FPA reducirían ese problema por registrarse con estas pruebas la extinción precoz de las inmunoglobulinas circulantes^{27, 28}.

También es importante resaltar que existen en la provincia de Corrientes establecimientos que realizan el primer servicio en vaquillas de 18 meses de edad, por lo que cELISA y FPA se transforman en nuevas herramientas para diferenciar anticuerpos de infección de los generados por la vacuna de *B. abortus* cepa 19, principalmente en el caso de producirse un aborto o para la comercialización de esos reproductores con certificado libre de brucelosis según lo exige el SENASA.

Los resultados del estudio de PCR muestran que es un método eficaz para identificar *Brucella abortus* a partir de muestras de sangre. Sin embargo, hubo diferencias entre el tiempo de persistencia de los anticuerpos vacunales medidos con las técnicas serológicas convencionales y la detección de ADN de *Brucella abortus* cepa 19 circulante con PCR. Esta última permitió identificar ADN bacteriano hasta los 360 días posvacunación aunque no permite determinar la viabilidad de *Brucella*. La ventaja de la PCR sobre los cultivos bacteriológicos se basa en que permite trabajar con organismos muertos evitando riesgos de infección para el personal de laboratorio³⁰.

Conclusión

Los resultados permiten concluir que en áreas donde prevalecen bovinos biotipos Cebú y, donde coincidentemente por razones de manejo no siempre se pueden vacunar las terneras a la edad recomendada por el SENASA, las técnicas de diagnóstico convencionales (BPA, FC, SAT, 2-ME e iELISA), deberían ser utilizadas con precaución y complementadas con cELISA y/o FPA para la confirmación de un resultado cuando el caso lo requiera. La PCR utilizando primers que diferencien ADN de cepas vacunales de cepas de campo, sería una herramienta adicional de utilidad cuando el cELISA y FPA no permiten dilucidar el problema.

Agradecimientos

Dr. Klaus Nielsen por la provisión de reactivos.

Al Dr. Eduardo Vicente López del Laboratorio Schering Plough por suministrar las vacunas para el trabajo.

A la Estadística Laura Jiménez y los Dres. Víctor Vanzini y Diego Rochinotti por su apoyo en el análisis de los datos.

Al grupo de Sanidad animal de INTA Mercedes, Corrientes, por su colaboración en el trabajo de campo.

Bibliografía

1. **Aguirre NP, Vanzini VR, Torioni de Echaide S, Valentín BS, De Lucca G, Aufranc C, Vigliocco A, Nielsen K.** Antibody Dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. *J. of Immunoassay and Immunochemistry* 2002; 4: 471-478.
2. **Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM.** Techniques for the brucellosis laboratory. 1988 Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
3. **Alton GG.** Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Aust Vet*; 1978; 54: 551 - 557.
4. **Angus RD, Barton CE.** The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev Biol Stand* 1984; 56: 349-356.
5. **Beh KJ.** Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet. Sci.* 1974; 17: 1- 4.
6. **Berkovich Z.** Maintenance of *Brucella abortus* free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence *The Vet. Quaterly Sci.*1998; 3: 81-88.
7. **Bricker BJ, Halling SM.** Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1640-1642.
8. **Echaide ST de, Aguirre DH, Spath EJA.** Respuesta serológica a la vacunación con *Brucella abortus* cepa 19 en bovinos *Bos taurus* (Hereford y Criolla) y *Bos indicus* (Nelore). *Rev. Med. Vet.* 1988; 1: 28 - 34.
9. **Fekete AJA, Bantle SM Halling, Sanborn MR.** Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriology* 1990; 69:216 -227.
10. **González Tomé JS, Villa LJ, del Palacio E, Gregoret R.** El test de Angus y Barton (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Rev Med Vet* 1989; 1:34- 36.
11. **Leal Klevezas DSA, Lopez M, Martínez Soriano J.P.** Molecular detection of *Brucella spp*: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Arch Med Res* 1995; 26 :263-267.
12. **Leal-Klevezas DS, Martínez-Vásquez IO, López Merino A, Martínez Soriano JP.** Single sep PCR for detection of *Brucella spp* from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3087-3090.
13. **Leal-Klevezas DS, López Merino A, Martínez Soriano JP.** Molecular detection of *Brucella spp.*: rapid identification of *Brucella abortus* biovar 1 using PCR. *Arch. Med. Res.* 1995^a; 26:263- 267.
14. **Nielsen K, Cherwonogrodzky JW, Duncan RJ, Bundle DR.** Enzyme - linked Immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am.J.of Vet. Res.*1989; 50: 5-9.
15. **Nielsen K, Gall D.** Advances in the diagnosis of Bovine Brucellosis: use of Enzyme Immunoassays. *The genetic Engineer and Biotechnologist.* 1994; 4: 25 - 39.
16. **Nielsen K, Kelly L, Gall D, Balsevicius S, Nicolleti P, Kelly W.** Improved competitive enzymeimmunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995; 46:285-291.
17. **Nielsen K, Gall D, Kelly A, Vigliocco A, Henning D, Garcia M.** Immunoassay development application to immunoassays for the diagnosis of brucellosis. *Agriculture and Agri-Food Canada, Nepean, Canada.* 1996.
18. **Nielsen K, Gall D, Jolley M, Leishman G, Balsevicius S, Smith P, Nicolleti P, Thomas F.** Homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J.Immunol. Methods* 1996; 195: 161-168.
19. **Nielsen K, Gall D, Lin M, Massangill C.A, Samartino L, Perez B, Henager S., Dajer A, Nicoletti P, Thomas F.** Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Vet. Immunol.Immunopathol.* 1998; 66: 321-329.
20. **Nielsen K, Gall D, Smith P, Vigliocco, A, Perez B, Samartino L, Nicoletti P, Dajer A, Enrigh F.** Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Vet Microbiol* 1999; 68:245-253.
21. **Office International des Epizooties.2009.** Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines, Office International des Epizooties, Paris, France, Chapter 2.4.3
22. **SENASA 2006.** Servicio Nacional de Sanidad Animal Resolución 438 /2006
23. **SENASA 1999.** Servicio Nacional de Sanidad Animal Resolución 115/99.
24. **SENASA 2002.** Servicio Nacional de Sanidad Animal Resolución 150/2002.
25. **SENASA.** Manual de Diagnóstico Serológico de Brucelosis Bovina versión 3/2009.
26. **Samartino LE, González Tomé J, del Palacio E.** Secuencia y comportamiento de las inmunoglobulinas séricas en terneras vacunadas contra brucelosis. *Rev. Med. Vet.* 1986; 67: 308 - 312.
27. **Samartino LE, Buffoni L, Conde S, Gregoret R.** Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de brucelosis bovina. *Rev. Med. Vet.* 2001; 2:90 – 94.
28. **Samartino LE, Gregoret R, Gall D, Nielsen K.** Fluorescence Polarization Assay. Application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J Immunoassay.* 1999; 3: 115-126.
29. **Samartino LE, Fort MC, González Tomé JS, Marduel M, Piazza E, Salustio E., Gregoret R.** Evolución de la protección antibrucélica otorgada por la cepa 19 en bovinos vacunados simultáneamente con vacuna antiaftosa oleosa. *Rev. Med. Vet.* 1999; 3:186- 189.
30. **Sangari F, Aguero J.** Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at ery locus. *Vaccine* 1994; 12, 435-438.