



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE  
*BRUCELLA ABORTUS* EN CABALLOS EN MÉXICO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

**LAURA OLIVIA HERNÁNDEZ ALCÁZAR**

ASESORA: **DRA. MARISELA LEAL HERNÁNDEZ.**

COASESOR: **M.V.Z. WILFRIDO RAMÍREZ VALADEZ.**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Importancia Económica .....	3
1.2 Género <i>Brucella</i> .....	4
1.3 Propiedades antigénicas .....	5
1.4 Factores de Virulencia.....	6
1.5 Inmunología.....	7
1.6 Enfermedad en el Caballo .....	8
1.6.1 Signos Clínicos .....	9
1.6.2 Patogenia.....	11
1.7 Diagnóstico .....	12
2. JUSTIFICACIÓN .....	14
3. HIPÓTESIS .....	14
4. OBJETIVOS .....	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6. RESULTADOS.....	18
7. DISCUSIÓN .....	20
8. CONCLUSIONES .....	23
9. REFERENCIAS.....	24

## RESUMEN

La brucelosis sigue siendo una enfermedad con distribución mundial que afecta a varias especies de animales domésticos y silvestres. En los caballos es conocida como Mal de la Cruz, Fístula de la Cruz o Mal de la Nuca y es ocasionada por *Brucella abortus*. La brucelosis de los caballos es de presentación generalmente subclínica; y por diferentes funciones zootécnicas que desempeña, así como su estrecha convivencia con bovinos y caprinos, puede ser considerado como un factor de riesgo en la transmisión de la enfermedad. El diagnóstico de brucelosis en equinos resulta complicado, ya que de manera oficial no existen pruebas que puedan validar a un animal como positivo o negativo, sin embargo; en algunos países se ha tratado de establecer un diagnóstico empleando las pruebas que se utilizan para bovinos. El objetivo del trabajo fue determinar la seroprevalencia de *Brucella abortus* en caballos en México. Se obtuvieron muestras de suero de 282 caballos de diferentes estados de la República Mexicana. Se emplearon las pruebas de tarjeta al 3 y 8%, Rivanol y un ELISA indirecto. Dentro de los resultados obtenidos de la prueba de tarjeta fueron considerados como positivos todos los sueros que presentaron cualquier tipo de aglutinación a la prueba. El 5% de caballos dió como resultado positivo a la prueba de tarjeta al 8%, 7% de los caballos fue positivo a la prueba de tarjeta al 3%, y el 3% de los caballos fueron positivos a ambas concentraciones de la prueba de tarjeta (3 y 8%) y el 85% de caballos resultaron negativos. A todos los sueros positivos a tarjeta se les realizó la prueba de Rivanol; dando como resultado negativos todos los sueros. El ELISA indirecto se les realizó a todas las muestras empleando como antígeno el LPS-liso obtenido a partir de la cepa 19 de *Brucella abortus*, y como conjugado se empleó una anti IgG de caballo conjugada con peroxidasa. La seroprevalencia empleando la prueba de ELISA indirecto fue de 16.7%; mientras que el 85.3% de los sueros fueron negativos. La especificidad del ELISA indirecto obtenida fue de 86%, y una sensibilidad de 55%. Debido a la baja sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA indirecto al utilizar LPS como antígeno, se recomienda evaluar otro tipo de antígenos para su uso en caballos, y ya que una reacción positiva no corresponde necesariamente con el verdadero estado de enfermedad, se debe seguir tratando de buscar una prueba que sea adecuada para el diagnóstico de brucelosis en esta especie.

**Palabras Clave:** Diagnóstico, *Brucella abortus*, Caballos

# 1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad con distribución mundial que afecta a varias especies de animales domésticos y silvestres, a pesar de los esfuerzos que se siguen haciendo desde hace mucho tiempo para controlar y erradicar la brucelosis, esta enfermedad sigue siendo una zoonosis importante en el mundo entero que genera graves consecuencias tanto para la salud pública como para la economía<sup>23, 26, 38</sup>.

El éxito de los programas sanitarios dependen, principalmente, de contar con estudios epidemiológicos correctos que permitan aplicar métodos efectivos para frenar y reducir la transmisión del agente<sup>26</sup>. Su persistencia se puede atribuir a la diversidad existente en el género *Brucella*; a la gran variedad y a la distribución geográfica de los animales susceptibles; así como la sobrevivencia y a los mecanismos de transporte de un hospedador a otro que presenta la bacteria<sup>38</sup>.

En el hombre la enfermedad se conoce como fiebre ondulante, enfermedad grave que los incapacita físicamente y puede volverse crónica para producir una invalidez permanente. El humano la contrae por contacto directo, durante el manejo de animales, o por ingestión de productos lácteos frescos contaminados<sup>38</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) Clasifica a la brucelosis en el grupo III de enfermedades zoonóticas de riesgo. Mientras que la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) incluye a la brucelosis en la lista B de enfermedades, las cuales se definen como “enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista económico y sanitario, y cuyos efectos para el comercio internacional de animales y productos pecuarios no son desdeñables”<sup>15, 28</sup>.

## 1.1 Importancia Económica

La importancia económica que representa la brucelosis es debida a las pérdidas que ocasiona en los animales productivos, al causar abortos, infertilidad, esterilidad, disminución de la producción láctea de un 10 a un 20% e interrupción de los programas genéticos<sup>4, 31</sup>.

La importancia de la enfermedad en los caballos es por las diferentes funciones zootécnicas que desempeña; principalmente el servicio que le proporciona a los agricultores y ganaderos, ya que es utilizado como medio de transporte tanto de carga, como de personas, además de ser empleado como auxiliar en el arreo de ganado bovino, ovino y caprino en explotaciones ganaderas extensivas <sup>31</sup>.

La estrecha convivencia del equino en el área rural con bovinos y caprinos, puede ser considerado como un factor de riesgo que puede adquirir cualquiera de las especies a las que es susceptible (*Brucella abortus o melitensis*) <sup>25</sup>.

## 1.2 Género *Brucella*

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano causada por bacterias del género *Brucella*, cuya característica principal es ser intracelular facultativa, son cocobacilos gram negativos de 0.6-1.5  $\mu\text{m}$  aproximadamente, inmóviles no esporulados, aerobios, microaerofílicos, catalasa y ureasa positivos, carecen de cápsula, y de plásmidos; tienen predilección por el sistema reticuloendotelial y órganos reproductores <sup>5,10,21</sup>.

Las bacterias de este género se pueden clasificar según la naturaleza del LPS en especies de fenotipo liso y de fenotipo rugoso. Entre las especies de *Brucella* que poseen LPS liso están: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti* y *B. microti*; mientras que las especies rugosas (*B. canis* y *B. ovis*) carecen de la cadena O que se encuentra afectada por mutaciones naturales <sup>9,21,29</sup>.

Las diferentes especies tienen un hospedero preferencial, aunque algunas de éstas pueden afectar a más de una especie animal: *B. abortus* afecta principalmente al ganado bovino, aunque también causa enfermedad en ovinos, caprinos y equinos. *B. melitensis*, afecta caprinos, ovinos y bovinos. *B. suis*, su huésped preferente es el cerdo, pero también afecta a los bovinos. *B. ovis*, solo afecta ovinos. *B. canis*, afecta a cánidos, bovinos. *B. neotomae* ha sido aislada de la rata del desierto. En mamíferos marinos se han identificado *B. ceti* aislada de cetáceos y *B. pinnipedialis* encontrada en pinnípedos. De las especies arriba mencionadas, cuatro resultan patógenas para el humano: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* <sup>9,16,17,29</sup>.

En el 2007 se describió una especie nueva de brucela, *B. microti* la cual fue aislada en el ratón de campo (*Microtus arvalis*) y en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*). En 2009 se identificó a *B. inopinata* como una nueva especie, aislada originalmente de un implante mamario de una mujer de 71 años de edad. En ese mismo año se identificaron mediante pruebas bioquímicas, PCR y secuenciación unos aislamientos de primates no humanos (*Papio spp*), los cuales tienen semejanza morfológica con *Brucella*; dichos aislamientos fueron asociados a retención de placenta, aborto y nacimiento de crías muertas. Al realizar el análisis de las secuencias, estos aislamientos representan un linaje nuevo dentro del género. Sin embargo, aun no se han llegado a confirmar características de alguna especie de las ya conocidas, por lo que probablemente será una especie nueva <sup>22, 33, 34, 35</sup>.

### 1.3 Propiedades antigénicas

La envoltura celular de la *Brucella* está compuesta por una membrana plasmática interna rodeada de una capa rígida de péptido glicano o mureina (la cual puede intensificar la respuesta inmunológica por su actividad coadyuvante) asociada con una membrana externa (ME) que contiene principalmente fosfolípidos, lipopolisacárido (LPS) y proteínas (PME) <sup>13, 19</sup>.

#### A) Antígenos de Superficie:

En la membrana externa las moléculas mejor caracterizadas corresponden a dos grupos: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (OMPs: “outer membrane proteins”) <sup>14</sup>.

El LPS-L consta de una parte glicolípídica (lípidos A), inserta en la membrana externa y otra polisacáridica expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el “core” o núcleo, más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO). Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*). El PSO es el antígeno (Ag) 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 (Ac) protectores <sup>14</sup>.

Por otro lado, el PSO posee epitopes 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 Ac hacia este Ag <sup>13, 14, 32</sup>.

Cabe mencionar que el lipopolisacárido interviene en pruebas de diagnóstico y en actividad protectora de vacunas, además las moléculas LPS-L son portadoras de los epítomos A, M y C que confieren protección contra el poder bactericida intracelular y hacen posible la supervivencia, así como la multiplicación de las bacterias dentro de los leucocitos y macrófagos. También en la superficie se localizan el Polisacárido B (poli-b) y el hapteno nativo NH <sup>13,19</sup>.

#### B) Antígenos Internos:

En análisis inmunolectroforéticos revelan por lo menos veinte antígenos proteínicos, en su mayoría de origen intracelular que se precipitan con antisueros de titulaciones elevadas <sup>18</sup>. Estos antígenos internos han sido identificados como proteínas periplásmicas inmunogénicas cuyos genes han sido clonados, tales como la superóxido dismutasa (SOD) dependiente de Cu y Zn, BP26 o CP28 y P39 <sup>14</sup>.

Entre las proteínas citosólicas se han caracterizado las proteínas del estrés térmico: GroEL, GroES, DnaK, HtrA; las proteínas YajC, UvrA; la bacterioferritina (BFR), la gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y las proteínas ribosomales: L7/L12 y cp24. También se han identificado y purificado proteínas de actividad desconocida con pesos moleculares de 14 kDa, 22,9 kDa y 32,2 kDa <sup>14</sup>.

No se ha demostrado la producción de exotoxinas, la capacidad de esta bacteria para producir una reacción inflamatoria en los tejidos de los animales hospedadores es considerada por acción de una endotoxina. Estas bacterias son capaces de producir un estado alérgico en los individuos afectados que puede persistir indefinidamente <sup>19</sup>.

## 1.4 Factores de Virulencia

Los elementos de virulencia de *Brucella* son los determinantes moleculares que le permiten invadir, resistir la muerte intracelular y buscar su replicación dentro de los fagocitos<sup>3</sup>. La bacteria tiene diferentes mecanismos que le ayudan a establecerse para producir la enfermedad <sup>21</sup>:

- Interferencia en la formación del fagolisosoma y modificación del tránsito intracelular.
- El LPS es portador de los antígenos inmunodominantes, que éste provoca la inducción de la respuesta inmune humoral debido a la activación de los linfocitos B (LB), además de que interviene en la adherencia y sobrevivencia intracelular.
- El peptidoglicano está asociado con la proteínas de la membrana externa (ME) de la bacteria, interfiriendo con la capacidad bactericida del suero, además de permitir que la bacteria resista los mecanismos de lisis ejercidos por los anticuerpos y el Complemento.
- Las proteínas de choque térmico permiten la adaptación de la bacteria al pH bajo, al aumento de la temperatura y otros factores de estrés microambientales <sup>5</sup>.

*Brucella* una vez opsonizada es internalizada vía complemento y por receptores Fc de monocitos y macrófagos, una vez dentro de la célula, la bacteria va a encontrarse dentro de una vacuola, la cual fue establecida por la célula hospedera, minutos después, la bacteria se localiza dentro de un compartimento multi-membranoso autofagosomal y continuando con la maduración de la vacuola en los tiempos tardíos de la infección, las brucelas virulentas se encontrarán presentes dentro del retículo endoplásmico, dentro del cual se replican <sup>3,18</sup>.

## 1.5 Inmunología

El caballo, como todas las demás especies animales y el hombre, está constantemente en contacto con una gran variedad de microorganismos patógenos y apatógenos que comparten el mismo entorno. El estado de enfermedad es evidente cuando los microorganismos causan una oportuna infección en el individuo al estar comprometido el sistema inmune del mismo. Los mamíferos, en general, han desarrollado una gran variedad de medidas defensivas para prevenir las infecciones. La primera línea de defensa incluye barreras físicas como son la piel, las superficies mucosas del tracto respiratorio, digestivo y urinario. Si se llegasen a superar estas primeras líneas de defensa contra los microorganismos que pueden llegar a causar daño, el individuo cuenta con otras medidas de defensa internas como son la respuesta inmune celular, humoral y el Complemento <sup>37</sup>.

La infección por *Brucella* por lo general induce respuestas inmunológicas humorales y mediadas por células. En magnitud y duración de estas respuestas pueden influir muchos factores, como la virulencia de la cepa infectante, la cantidad de inóculo, la edad, sexo, gestación, especie y estado inmunológico del huésped<sup>15</sup>.

Con respecto a la inmunidad humoral cinco diferentes clases de anticuerpos han sido identificados en la mayoría de las especies incluyendo el caballo: IgD, IgM, IgG, IgA, e IgE. En el caballo la clase IgG es subdividida en 4 subclases o isotipos IgGa, IgGb, IgGc, e IgG(T), debido a sus diferentes composiciones y propiedades fisicoquímicas<sup>37</sup>.

Poco después de la infección por *Brucella* aparece la IgM la cual puede detectarse por aglutinación y en parte por medio de la reacción de fijación de Complemento. Después son demostrables la IgG con la reacción de fijación de Complemento. Sigue más tarde la producción de IgA comprobable con la aglutinación. El nivel de la IgM baja paulatinamente en tanto que la IgG y la IgA persisten a concentraciones altas<sup>19</sup>.

Como parásitos intracelulares facultativos las brucelas promueven la sensibilización de los linfocitos T y la activación de los macrófagos muy poco después de la infección, mientras tanto, el interferón Gamma aumenta la capacidad de los macrófagos para matar las bacterias invasoras causando esta activación fundamental para la resistencia a microorganismos. La activación de los macrófagos se produce cuando los linfocitos T del subconjunto apropiado son estimulados para liberar linfocinas (interleucinas), y por lo tanto la liberación de estos factores activadores depende del reconocimiento del antígeno apropiado por el linfocito T y está regulada por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Los microorganismos vivos capaces de establecer una infección intracelular persistente y ciertos tipos de antígenos, con o sin un coadyuvante son los inductores más eficaces de la inmunidad mediada por células<sup>3,19,21</sup>.

## **1.6 Enfermedad en el Caballo**

En caballos la brucelosis es conocida como Mal de la Cruz, Fístula de la Cruz o Mal de la Nuca y es ocasionada principalmente por *Brucella abortus*.

La brucelosis de los caballos es de presentación subclínica generalmente, llegándose a observar envaramientos, fluctuaciones de la temperatura y letargia. Algunos investigadores comunican el aborto de yeguas por la intervención directa de brucelas, sin embargo, es notable que el agente no parece participar de modo especial en el

denominado aborto epizoótico de la yegua, en contra posición con lo que sucede en los bovinos. Su acción estaría relacionada más bien al cuadro febril que a su localización intrauterina, siendo esta infección por ende, de baja incidencia en el aparato genital equino <sup>23, 25</sup>.

En los caballos las vías más comunes de infección por *Brucella* son las mucosas de vías digestivas, conjuntival, genitales y la piel <sup>19, 20</sup>.

Por otro lado la exposición indirecta a las brucelas puede estar mediada por animales silvestres, pájaros, agua contaminada, orina, descargas uterinas, materia fecal o fluidos de vacas que han abortado. La contaminación en los corrales o pasturas ocurren cuando vacas infectadas abortan o paren en esos espacios. La eliminación en la descarga vaginal, loquios de las vacas enfermas puede ocurrir tan rápido como a los 39 días después de la infección. Una masiva eliminación de *Brucella* comienza después del parto o aborto y puede continuar por 15 días. Algunas vacas pueden quedar como portadoras y eliminar bacterias de manera intermitente por muchos años <sup>36</sup>.

### **1.6.1 Signos Clínicos**

En los equinos los padecimientos que se pueden observar o ser explorados precozmente son abscesos en las regiones de la nuca y de la cruz, cuya incisión da paso a un exudado claro que forma hebra, o bien mucoso y amarillo ámbar. El contenido de los abscesos, más tarde se hace purulento y en casos todavía más avanzados, el proceso presenta el cuadro de la matadura de la cruz <sup>8, 19, 31</sup>.

La fístula de la cruz es el término que se utiliza para describir la bursitis supraespinosa ocasionada en su mayoría por una infección localizada de *Brucella abortus*. Ocasionalmente el organismo se localizará en la bursa del atlas. Estas condiciones se ven con poca frecuencia en la práctica veterinaria actual sin embargo, es todavía una condición difícil de tratar porque muchos casos tienden a recurrir dado que la infección se localiza en varios tejidos alrededor de la bursa <sup>12, 19</sup>. El signo de la fístula de la cruz, la cual puede ser confundida con la ulcera de la nuca, es un trastorno inflamatorio del caballo que solo se diferencian entre sí esencialmente en su localización en las bursas supraespinosa y supra-atlantal respectivamente <sup>19</sup>.

En la primera etapa de la enfermedad no existe fístula pero cuando el saco bursal se rompe o abre, al tener poco cubrimiento de soporte o para proporcionar drenaje quirúrgico, ocurre una infección secundaria con bacterias piógenas que generalmente asumen un carácter verdaderamente fistuloso <sup>19</sup>.

La inflamación provoca una distensión y por lo tanto un engrosamiento de la pared de la bursa, la tumefacción puede ser dorsal, unilateral o bilateral dependiendo de la posición de los sacos bursales entre las capas de tejido. En los casos más viejos y avanzados están afectados el ligamento y las espinas vertebrales dorsales y a veces se observa necrosis en esas estructuras <sup>19</sup>. Además de los procesos morbosos mencionados las brucelas pueden producir artritis (Osteitis crónicas deformantes y Osteitis crónicas sero fibrinosas), tendobursitis, dolores musculares tipo reumática con o sin fiebre, y cojeras intermitentes causadas por la bolsa navicular. Se ha comprobado claudicaciones intermitentes ambulatorias, como también trastornos generales similares a los de la influenza <sup>11, 19, 23</sup>.

Otro signo relevante que se puede llegar a presentar por esta enfermedad es la uveitis; la cual puede inducir ceguera en los caballos. Esta es provocada por diferentes patologías inmunomediadas de diferentes orígenes. Cabe mencionar que se ha visto que este tipo de patología del ojo se presenta en ejemplares que han sufrido de otras infecciones, en los cuales se encontró que tenían elevados títulos de anticuerpos contra *Leptospira*, *Brucella* y *Toxoplasma*. Sin embargo; no todos los ejemplares seropositivos llegan a presentar la uveitis<sup>7</sup>.

#### *Proceso de la Osteomielitis Vertebral*

Este trastorno es relativamente raro en caballos adultos y cuando ocurre por lo general es causado por infecciones por *Mycobacterium spp* o *Brucella spp* <sup>19</sup>.

La osteomielitis es más común en potros (menos de seis meses de edad) y caballos jóvenes, debido a la diseminación hematógena de organismos a los cuerpos vertebrales secundario a la septicemia (ej: fiebre, letargo y depresión) <sup>19</sup>.

## **1.6.2 Patogenia**

El periodo de prepatencia desde la infección hasta la aparición de anticuerpos es de semanas, a varios meses, dependiendo de la virulencia de la bacteria, dosis, vía de infección y susceptibilidad del animal <sup>19</sup>. La enfermedad se adquiere mediante ingestión, penetración de la conjuntiva y piel intacta <sup>7, 14, 19, 20</sup>. Después de la invasión inicial, se produce multiplicación en los nodos linfáticos que drenan la zona y después por la misma vía se propagan al conducto torácico, posteriormente por medio de la corriente sanguínea se propagan a otros tejidos linfoides incluyendo el bazo y nodos linfáticos mamarios e iliacos, cápsulas articulares y bursas <sup>19</sup>.

La propagación en el organismo tiene lugar después de la fagocitosis donde *Brucella*; que puede vivir dentro de los macrófagos, los cuales son resistentes a los efectos de las enzimas lisosómicas de los mismos, se multiplica en el interior de estas células fagocíticas en las que provocan un tipo de hipersensibilidad <sup>19, 21</sup>.

Las brucelas cuando penetran en el caballo por las vías digestivas llegan pronto a la sangre y causan un incremento de la temperatura corporal, las elevaciones térmicas ciertamente son tan imperceptibles que pasan inadvertidas <sup>19</sup>. La bacteria en los caballos llega a colonizar tejidos ligamentosos y tendinosos del ligamento cervical y así producir procesos inflamatorios. La inflamación no tiene carácter purulento pero, luego en los tejidos inflamados, por el hecho de traumatismos intervienen microorganismos piógenos y sobrevienen extensas supuraciones que originan fístulas <sup>19</sup>.

El eritritol producido por el feto y que estimula el crecimiento de *B. abortus*, ocurre naturalmente en concentraciones muy elevadas en la placenta y líquidos fetales de los bovinos. Por lo que las yeguas al carecer de este carbohidrato probablemente la localización en el caballo en sitios específicos, no involucran directamente el tracto reproductivo de las yeguas pues en enfermedades que producen esta anomalía como es el aborto epizoótico, o en la Metritis Contagiosa de las Yeguas (MEC) en las yeguas no se ha aislado el microorganismo <sup>15, 20</sup>. Solo existe la relación de 0,01% de la presencia de esta bacteria en los abortos de las yeguas en los tres últimos meses de gestación. Sin embargo; parece que las manifestaciones más comunes son la localización del microorganismo es en los tejidos de los músculos, tendones y articulaciones <sup>19</sup>.

## 1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la brucelosis en equinos resulta un tanto complicado, ya que de manera oficial no existen pruebas que nos puedan validar a un animal como positivo o negativo, sin embargo, en algunos países se ha tratado de establecer un diagnóstico empleando y adaptando las pruebas que se utilizan para bovinos <sup>24, 32</sup>.

Entre las pruebas que se pueden realizar para diagnosticar la enfermedad son las siguientes:

### *Diagnóstico Bacteriológico*

En casos donde hay una fístula, no vale la pena tomar frotis para microbiología porque se aislará una gran cantidad de bacterias. Sin embargo, en las etapas tempranas de la condición, antes de que desarrolle una fístula, es posible aspirar el fluido de la bursa supraespinosa para el cultivo, identificación y tipificación de bacterias <sup>13, 19</sup>.

### *Sensibilidad y Especificidad de la Pruebas Serológicas*

Los animales pueden ser considerados como sanos cuando en realidad no lo son. Esto constituye un resultado falso positivo y hace el diagnóstico erróneo. La sensibilidad de un método diagnóstico es la proporción de verdaderos positivos que son detectados por el método en cuestión. La especificidad del método es la proporción de verdaderos negativos que son detectados. La sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica son importantes a la hora de decidir el valor de dicha prueba <sup>19</sup>.

### *Prueba de Tarjeta o de Rosa de Bengala*

También llamada prueba del antígeno tamponado por su capacidad de mantener estable un pH determinado; en consecuencia es un procedimiento cualitativo de aglutinación macroscópica que se realiza en una sola dilución y que detecta principalmente inmunoglobulina del tipo IgG1 igualmente reacciona ante las IgM pero no en su totalidad como tampoco lo hace con las IgG2, el colorante empleado es el Rosa de Bengala con una concentración celular del 8%, a un pH 3.64. Esta prueba es considerada la prueba tamíz, posee una sensibilidad de 97 al 100%, y una especificidad baja del 77.6% y es común que se presenten falsos positivos, por lo que es necesario que se realice una prueba confirmatoria <sup>1, 27</sup>.

### Prueba de Rivanol

Es una prueba complementaria a la de tarjeta, presenta una sensibilidad del 83% y una especificidad del 93%. Esta prueba se utiliza para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, para diferenciar animales vacunados de no vacunados. La prueba se basa en que el rivanol (un colorante de acridina) en una primera etapa precipita la albúmina y los anticuerpos de tipo IgM, los cuales predominan en el caso de una vacunación o infección primaria. Quedando viables en el sobrenadante los de tipo IgG, los cuales se encuentran en mayor cantidad sólo en estimulaciones inmunogénicas posteriores <sup>1,13,27</sup>.

### Prueba de ELISA

Es una técnica dentro de la cual existen diversas variantes dependiendo de lo que se pretenda determinar <sup>30</sup>. En el ELISA indirecto y directo el antígeno se absorbe sobre la fase sólida (placas de poliestireno de 96 pozos); el directo se utiliza para cuantificar antígenos conocidos, el indirecto se utiliza para buscar y cuantificar anticuerpos contra antígenos conocidos <sup>39</sup>.

En el diagnóstico de brucelosis se han utilizado antígenos elaborados con la bacteria completa, así como con diferentes fracciones purificadas, diversos conjugados antiglobulínicos y sustrato <sup>19</sup>. Se ha encontrado que el ELISA indirecto con LPS como antígeno tiene una especificidad del 98% <sup>13</sup>.

### **Diagnóstico Diferencial**

La brucelosis se manifiesta por la presentación de abrasiones y mataduras de la cruz con tumores y fístulas. Debe diferenciarse con traumatismos, osteomielitis y cuerpos extraños (ectoparásitos). Es notable que *Brucella abortus* no parece intervenir en el llamado Aborto Epizootico de las Yeguas <sup>19,25</sup>.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los caballos son animales de alta estima que desempeñan diferentes funciones zootécnicas (trabajo de carga, deporte, compañía, etc.), por lo que en algunos casos pueden estar en estrecha convivencia con bovinos y caprinos, siendo esto un factor de riesgo para la transmisión de enfermedades como lo es *Brucella*. El diagnóstico de la enfermedad en equinos tiene las limitaciones que de manera oficial no existen pruebas serológicas que puedan validar a un animal como positivo o negativo, pese a esta situación en algunos países se ha intentado el establecimiento de pruebas diagnósticas empleando modificaciones en las que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad en bovinos. Ésta enfermedad, al ser una de las zoonosis más importantes, genera graves consecuencias para la salud pública y para la economía, por lo que se considera que es importante conocer el estatus de esta enfermedad en caballos ya que son pocos los reportes que existen sobre brucelosis en esta especie.

## 3. HIPÓTESIS

La brucelosis en caballos generalmente es de presentación subclínica, pero si la población en estudio ha estado en contacto con la *Brucella* montando una respuesta inmune, entonces los animales tendrán títulos de anticuerpos que podrán ser detectados mediante las pruebas empleadas para otras especies, con algunas modificaciones.

## 4. OBJETIVOS

### *Objetivo General*

Determinar la seroprevalencia de *Brucella abortus* en caballos en México

### *Objetivos Particulares*

1. Determinar los títulos de anticuerpos contra *Brucella abortus* en caballos, empleando las pruebas de tarjeta al 3 y 8% y rivanol.
2. Estandarizar una prueba de ELISA indirecta para la detección de *Brucella abortus* en caballos.
3. Realizar la prueba de ELISA indirecta para la detección de *Brucella abortus* en caballos.
4. Determinar la seroprevalencia de brucelosis en caballos.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### Toma de muestras

Se realizó un muestreo de conveniencia a una población de 282 caballos provenientes de diferentes estados de la República Mexicana, se obtuvieron muestras de sangre por venopunción de la vena yugular en tubos tipo vacutainer sin anticoagulante para obtener el suero mediante centrifugación.

Se obtuvo una muestra de semen fresco de un caballo que era empleado como semental, para intentar el aislamiento de *Brucella abortus*, ya que este fue positivo a la prueba de tarjeta en ambas concentraciones. La siembra de la muestra se realizó en placas de agar Farrell (Oxoid), así como en agar tripticasa soya, se incubó a 37° durante 10 días.

### Antígenos

Prueba de tarjeta: se empleó un antígeno brucelar amortiguado estable, obtenido a partir de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, a una concentración celular del 8% en amortiguador de lactato; a pH 3.5 y teñido con Rosa de Bengala (PRONABIVE) <sup>27</sup>.

Prueba de rivanol: se utilizó antígeno elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* a una concentración celular 4%, con un pH 5.8 a 6.2 Teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta (PRONABIVE) <sup>27</sup>.

Prueba de ELISA: se utilizó LPS-L elaborado a partir de la cepa 19 de *B. abortus* a una concentración de 2.5µg/ ml.

### Obtención de LPS de *Brucella abortus* C-19

Obtención de células: Se cultivó la cepa 19 en placas de agar triptica soya por 48 hrs a 37°C, posteriormente se realizó la tinción de Gram para comprobar la pureza de la cepa. Para cultivar las bacterias se utilizaron 2 litros de caldo tripticasa soya y se incubó 72hrs en agitación. Se inactivó con 20ml de solución fenolada al 90% durante 72hrs, sembrándose posteriormente para comprobar la inactivación. Posteriormente se

centrifugó a 7500 x g (Centrífuga Jouan GR 2022) por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se pesó el sedimento.

#### *Procesamiento del paquete celular*

Se hicieron 3 lavados del sedimento con una solución de cloruro de sodio al 0.85% estéril. Posteriormente se rompieron las células en autoclave con vapor fluente a 120° C durante 30 minutos. Se centrifugó a 5000 x g por 20 minutos a 4° C, el sobrenadante se precipitó con 3 volúmenes de etanol en refrigeración a 100 rpm durante 24hrs. Se dializó en un cassette (Slide-A-Lyzer 10k, 10000 MWCO) en agua destilada en refrigeración a 4°C durante 24 h realizando el cambio de agua cada 8 hrs.

#### *Determinación de Proteínas*

La determinación de proteínas por el método de Bradford se realizó en una placa de microaglutinación (placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano Nunc). Se preparó una solución stock de albúmina sérica bovina (ASB) a 1.0 mg/ml, para realizar una curva estándar con albúmina sérica bovina de menor a mayor concentración en PBS a una concentración final de 1µg/ml. Posteriormente, se colocaron 10 µl de la muestra problema por duplicado y se adicionaron 190 µl del reactivo de Bradford y se puso en agitación durante 5 minutos. Finalmente la placa fue leída a 595 nm en lector de ELISA (Perkin Elmer Victor 3 1420 multilabel counter) y por regresión lineal se obtuvo la cantidad de proteína en la muestra problema.

### **Elaboración de pruebas**

#### *Prueba de Tarjeta*

Se realizaron las pruebas de tarjeta al 3 y 8% a todos los sueros, considerando positivos a los que presentaron cualquier tipo de aglutinación como se describe en la NOM-041-ZOO-1995<sup>27</sup>.

#### *Prueba de Rivanol*

A todos los sueros de los animales que resultaron positivos a la prueba de tarjeta, se les realizó la prueba confirmatoria de Rivanol.

### Prueba de ELISA indirecta

Se utilizaron placas de poliestireno fondo plano de 96 pozos (Nunc). Se realizó la adsorción pasiva del antígeno adicionándose 100µl por pozo de la solución LPS-L en solución de carbonatos (0.06 M pH 9.6) a una concentración de 5.39µg/µl, la microplaca se incubó durante 24h a temperatura ambiente. El antígeno que no se adsorbió fue eliminado mediante 4 lavados con 200µl de PBS + Tween 20 (Sigma Aldrich) al 0.5%, por cada pozo.

### *Bloqueo de las placas*

Se realizó el bloqueo de la placa utilizando una solución de gelatina al 3% en PBS. Se agregaron 100µl de esta solución a cada pozo y se incubó durante 1 hr a 37°C.

Posteriormente se realizaron 5 lavados con 200 µl de PBS Tween 20 al 0.5% en cada pozo. Las placas se refrigeraron a 4°C hasta su uso.

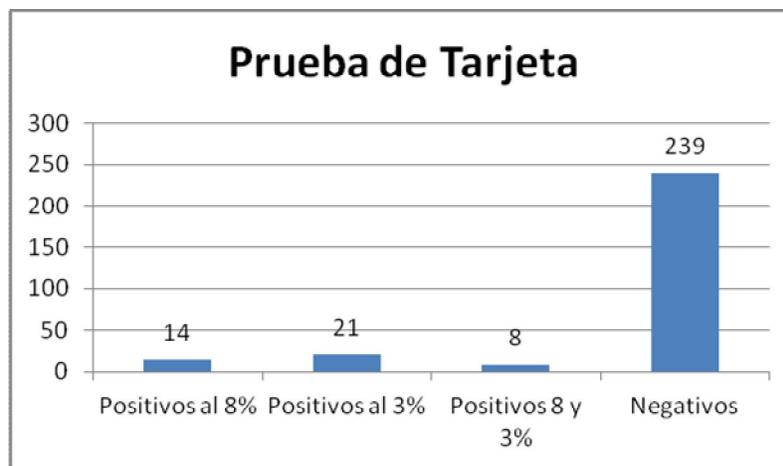
### *Realización de la Prueba*

Los sueros problema se diluyeron a 1:200 en PBS y se adicionaron 100µl de los sueros a cada pozo por duplicado, incubando por 1hr a 37°C. Se realizaron 4 lavados 200 µl con PBS Tween 20. Posteriormente se agregan 100µl de la IgG conjugada con peroxidasa Goat Anti- horse IgG (Jackson immunoresearch 108-035-003) a una concentración 1:2000, se incubó por 1hr a 37°C, pasado el tiempo de incubación se realizaron 4 lavados con 200µl PBS Tween 20. Se colocaron 100 µl a cada pozo del sustrato Ácido aminosalicílico (5-Aminosalicylic acid 5- Amino-2-hydroxybenzoicacid; mesalamine SIGMA-Aldrich ST- Louis MO) y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, la reacción fue parada con NAOH 3N y se realizó la lectura a 490nm en el espectrofotómetro (Victor 3 1420 multilabel counter, Perkin Elmer).

## 6. RESULTADOS

### Prueba de tarjeta

En la gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de tarjeta practicada a 282 sueros de caballos. Los sueros que presentaron cualquier tipo de aglutinación a la prueba fueron considerados como positivos. Obteniendo 4 grupos: 5% de caballos positivos a la prueba de tarjeta al 8%, 7% de caballos positivos a la prueba de tarjeta al 3%, 3% de caballos positivos a la prueba de tarjeta al 8 y 3% y 85% de caballos negativos.



**Gráfica 1:** Resultados de la prueba de tarjeta

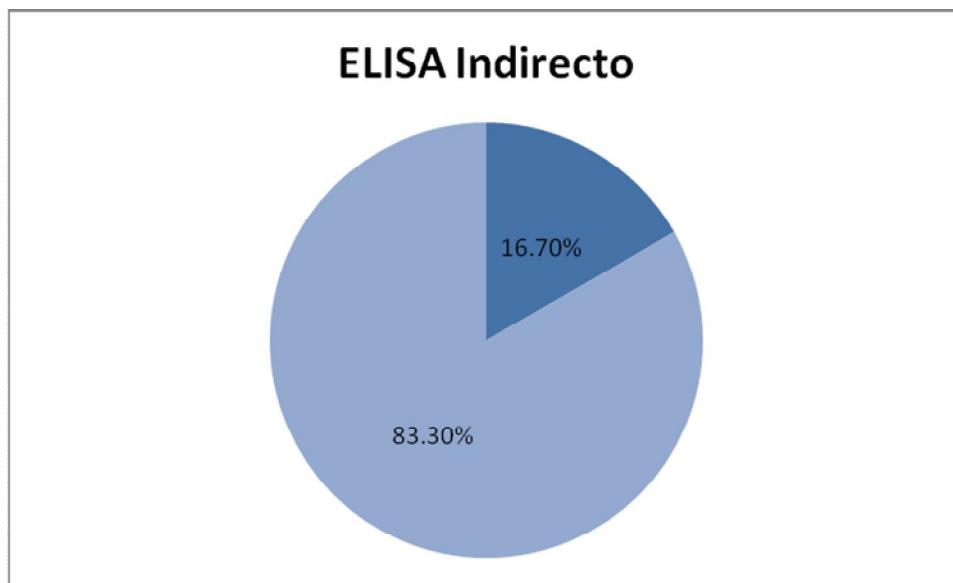
### Prueba de Rivanol

Los caballos que fueron positivos a la prueba de tarjeta al 8 y 3%, posteriormente se les realizó la prueba de rivanol, resultando todos negativos a esta prueba.

### Prueba de ELISA indirecto

En la Gráfica 2 se observan los resultados obtenidos de la seroprevalencia donde el 16.7% (47 caballos) fueron positivos a la prueba de ELISA-I, mientras que el 83.3% (235 caballos) fueron negativos. Para establecer el punto de corte se tomaron en cuenta los resultados de las pruebas de tarjeta buscando el resultado de la densidad óptica más alta de los 43 sueros positivos y la más baja de los sueros negativos; obteniendo un punto de corte 0.320. Todo resultado que estuviera una desviación estándar por arriba del punto de corte se consideró como positivo a la prueba.

Sin embargo; la especificidad del ELISA indirecto obtenida fue de 86% y una sensibilidad de 55%.



Gráfica 2: Porcentaje de Caballos positivos y negativos a la prueba de ELISA-I.

### Aislamiento del agente

Al intentar el aislamiento de *Brucella abortus* a partir de la muestra de semen, el resultado fue negativo al aislamiento de la bacteria.

## 7. DISCUSIÓN

La brucelosis de los caballos generalmente es de presentación subclínica, y debido a las diferentes funciones zootécnicas que esta especie desempeña, así como su estrecha convivencia con bovinos y caprinos puede ser considerado como factor de riesgo para la transmisión de esta enfermedad <sup>25</sup>.

La limitante que existe en el diagnóstico de la brucelosis en equinos, al no existir pruebas serológicas que puedan validar a un animal como positivo o negativo, es que algunos investigadores de otros países han intentado el establecimiento del diagnóstico empleando las pruebas que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad en bovinos <sup>24,32</sup>.

En el presente trabajo se realizó la prueba de tarjeta al 8% (las muestras se consideraron positivas cuando presentaron cualquier grado de aglutinación, como lo establece la NOM 041 ZOO1995), de los 282 sueros se obtuvo que el 5% (14) de los sueros fueron positivos; es un porcentaje similar a lo encontrado por otros investigadores, por ejemplo, en un estudio realizado por Rivera *et al.*, en 1996 reportan el 9.74% fueron positivos a la prueba de tarjeta al 8%, en una población de 318 equinos en Guatemala; mientras que Aricapa HJ *et al.*, en 2008, en Colombia el 9.8% fueron positivos cuando realizaron la prueba de tarjeta al 8% a 792 sueros de equinos (caballos, burros y mulas). Sánchez AV *et al.*, en Venezuela 2010, reporta que el 19.5% resultaron positivos a la prueba de tarjeta al 8%, de 82 sueros equinos. Sin embargo; en un estudio realizado en Tamaulipas, México por Acosta-González *et al.*, en 2006, el resultado que obtuvieron a la prueba de tarjeta al 8% en 420 sueros de caballos fue de tan solo el 0.238%, siendo un resultado más bajo que lo que se obtuvo en el presente trabajo.

Con la finalidad de buscar aumentar la sensibilidad de la prueba de tarjeta, se realiza la prueba al 3% ya que aporta resultados más certeros; esto ha sido observado en ovinos y caprinos, es por ello que se realizó la modificación de la prueba <sup>13, 32</sup>. En este trabajo los resultados que se encontraron cuando se realizó la prueba de tarjeta al 3% fueron que el

7% (21 caballos) fueron positivos. En el trabajo llevado a cabo en el Tamaulipas, México ningún suero reaccionó a la prueba de tarjeta a esta concentración <sup>2</sup>. En cambio Sánchez *et al.*, en 2010 en su trabajo para diagnosticar brucelosis en caballos Pura Sangre de carreras, el resultado obtenido a la prueba de tarjeta al 3% fue de 3.7%. Siendo un resultado más elevado a lo que se encontró en este trabajo.

La prueba rosa de bengala, es una prueba altamente sensible (97 al 100%), pero con baja especificidad (77.6%)<sup>1</sup>. Debido a la sensibilidad que presenta esta prueba, las reacciones positivas pueden deberse a reacciones cruzadas por la presencia de anticuerpos a nivel de LPS de otros microorganismos Gram negativos como *E. coli* O:116 y O:157, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Salmonella* serotipos Kauffman-White del grupo N, *Salmonella landau*, *Pseudomonas maltophilia* y *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9, que poseen derivados de perosamina en su LPS y que pueden dar reacciones cruzadas con el LPS del género *Brucella*<sup>13, 14, 32</sup>. Sin embargo, por su baja especificidad se acompañan de limitados valores de predicción positiva, por lo que una reacción positiva en caballos no corresponde en forma directa con el verdadero estado de salud del animal <sup>32</sup>. Debido al inconveniente de las reacciones cruzadas con otras bacterias, no sólo en equinos sino en todas las especies en las que se emplea esta prueba, el diagnóstico se debe de complementar con una prueba más específica<sup>20</sup>.

En un trabajo realizado en Venezuela, efectuaron la prueba de rivanol dando como resultado que el 5.82% de los caballos fueron positivos <sup>24</sup>. Rivera *et al.*, 1996, trabajó con 31 caballos que convivían con bovinos, de los cuales 21 provenían de una zona con alta prevalencia y 10 de una zona con baja prevalencia de brucelosis bovina, de 31 caballos positivos a la prueba de tarjeta, 30 caballos resultaron positivos a la prueba de rivanol en las diluciones de 1:25 hasta 1:50, al haber una estrecha convivencia con los bovinos positivos es un factor de riesgo que puede explicar que se hayan obtenido resultados positivos en ambas pruebas. En el presente trabajo todas las muestras fueron negativas cuando se realizó la prueba de Rivanol, se pensaría que todo resultado positivo a la prueba de tarjeta en ambas concentraciones, puede deberse a reacciones cruzadas y por lo tanto, no ser verdaderos positivos <sup>32</sup>.

En el estudio realizado en Venezuela, en el cual se examinaron caballos provenientes de diferentes cuadradas, reportaron la presencia de bursitis supurativa, infertilidad y abortos signos clínicos de enfermedad, cuando realizan las pruebas para brucelosis encuentran resultados positivos a las pruebas serológicas obteniendo una prevalencia de 79.46%, además de que logran aislar *Brucella abortus* biotipo 1 a partir de muestras de fetos de yeguas abortadas, caballos seriamente afectados con bursitis y osteoartritis<sup>24</sup>. Rivera *et al* 1996; encontró a 5 caballos que presentaban fístula de la cruz, de los cuales sólo 3 fueron positivos a la prueba de tarjeta y de rivanol<sup>31</sup>. En el presente trabajo no se observaron animales con signos clínicos, además de que cuando se intento el aislamiento a partir de la muestra de semen, no se logró aislar la bacteria del semental que dio positivo a la prueba de tarjeta en ambas concentraciones.

En el 2010 Sánchez y cols., realizan un estudio con la técnica ELISA competitivo comercial para detectar anticuerpos contra *B. abortus*, no obtuvieron resultados positivos tras analizar muestras que previamente fueron positivas a la prueba de tarjeta. En un estudio realizado en Mali, con 33 casos de burros con fístula en la cruz, utilizaron una prueba de ELISA para diagnóstico de brucelosis, los resultados obtenidos fueron negativos a *Brucella abortus*, a lo que refieren que los caballos que presentaron fístula de la cruz, no necesariamente se debió a brucelosis, ya que este signo puede ser ocasionado por traumas, o por otros agentes infecciosos como *Actinomyces bovis*, *A.pyogenes* y *Streptococcus spp*<sup>12</sup>. De igual forma en el presente trabajo fue difícil poder establecer la estandarización de la técnica de ELISA -I para evaluar los sueros de caballos, debido que no se contaba con una muestra de un caballo con aislamiento positivo que evidenciara la presencia de la enfermedad, Peraza y col, refieren que para obtener un diagnóstico correcto, utilizando ésta técnica, se requieren de muestras negativas y positivas de animales con signos clínicos de enfermedad<sup>30</sup>. Sin embargo, bajo las condiciones de este estudio el 16.7 % de los sueros fueron positivos a la prueba de ELISA-I.

## **8. CONCLUSIONES**

Se aumento la sensibilidad de la prueba de tarjeta cuando esta se realizó al 3%, logrando detectar un mayor número de animales positivos a esta prueba.

Si se encuentra un caballo con signos clínicos de brucelosis y positivo a la prueba de tarjeta, el diagnóstico debe complementarse con otras pruebas como el aislamiento del agente etiológico.

Debido a la baja sensibilidad y especificidad de la ELISA- I al emplear LPS como antígeno, se recomienda evaluar otro tipo de antígenos para su uso en caballos.

En este estudio una reacción positiva a estas pruebas evaluadas puede no corresponder necesariamente con el verdadero estado de salud del animal.

Se debe seguir buscando una prueba que sea adecuada para su diagnóstico

## 9. REFERENCIAS

1. Acosta M, Ortíz M. Pruebas diagnósticas en Brucelosis Bovina. SENASA. Citado (5 mayo 2012 13:35hrs) on line [http://www.senasa.gob.pe/repositorioAPS/0/4/JER/INFOINTER/Pruebas diagnosticas en Brucelosis Bovina.pdf](http://www.senasa.gob.pe/repositorioAPS/0/4/JER/INFOINTER/Pruebas%20diagnosticas%20en%20Brucelosis%20Bovina.pdf)
2. Acosta RIG, González IR, Flores GH. Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in Equines of a Tropical Region of Mexico. The Canadian Journal of Veterinary Research 2006; 70: 302-304.
3. Alba CR. Respuesta inmune humoral al antígeno LPS liso, de vacas revacunadas con RB51 en hatos con diferentes prevalencias (tesis de Licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México, 2007.
4. Alvarado E.M. Determinación de la seroprevalencia de brucelosis bovina en 56 establos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo (Tesis de Licenciatura). México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1997.
5. Aréstegui MB, Gualtier SC, Domínguez J, Scharovsky OG. El género *Brucella* y su interacción con el sistema monocuclear fagocítico. Veterinaria México. 2001;32:2:131-139.
6. Aricapa HJ, Jaramillo A, Pérez JE, Londoño L, Castrillón A, Amaya C *et al.* Prevalencia de Brucelosis bovina, equina y humana en Caldas-Colombia- Sur América. Biosalud, vol.7, enero-diciembre, 2008.
7. Brooks, DE. Equine Recurrent Uveitis: Medical Surgical Therapy. Ophthalmology, Congreso AVEF, Francia 2007.
8. Caro RR. Diagnóstico de enfermedades infecciosas en Equinos en la República de Argentina, 2003. Citado (20 enero 2011 11:30hrs) on line [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_equinos/curso\\_equinos\\_I/15-diagnostico\\_enfermedades\\_infecciosas.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_equinos/curso_equinos_I/15-diagnostico_enfermedades_infecciosas.pdf)
9. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, María-Jesús DM, Martín-Martín AI, Cloeckert A, María-Jesús G, and Vizcaíno N. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. Infect Immun. 2007; 75: 8: 4050-4061.

10. Carter G.R, Chengappa M.M, Claus W, Lemus A, Rikihisa Y, Carsolio R, Bacteriología y Micología Veterinarias Aspectos Esenciales.El Manual Moderno,S.A. de C.V., segunda edición, México 1991.pp351
11. Cuello FG, Anguiano B, Uceda EG, Serrano de Burgos J, Garrido AC, Brucelosis equina, Estudio Serológico de Algunos Casos., Departamento de Microbiología e Inmunología Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba España. Archivos de Zootecnia, 32:123, 1983
12. Doumbia A. Fistulous Withers: A Major Cause of Morbidity and Loss of Use Amongst Working Equines in West Africa: An Evaluation of the Aetiology and Treatment of 33 Cases in Mali. Proceeding of the 9<sup>th</sup> International Congress of World Equine Veterinary Association. January 22-26, 2006 Marrakech, Morocco.
13. E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano, *et al.* Diagnóstico de Brucelosis Animal., Segunda edición. México 2000.
14. Estein SM. Brucelosis: Inmunidad y Vacunación (revisión bibliográfica) Revista electrónica de Veterinaria REDVET [serial online] 2006 Mayo (citado 4 junio 2012) Vol. VII, N° 05 [25 páginas] Available from URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506/050601.pdf>
15. FAO-OIE-WHO. Anuarios de sanidad animal. 1993-1995. Sanidad Animal.
16. Fugier E, Pappas G and Gorvel JP. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. Exp. Rev Mol Med. 2007. 9:1-10. DOI: 10.1017/S1462399407000543.
17. Geoffrey Foster, Bjorn S. Osterman, Jacques Godfroid, Isabelle Jacques, and Axel Cloeckaert. *Brucella ceti sp. nov.* and *Brucella pinnipedialis sp. nov.* for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol 2007, 57, 2688–2693.
18. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol. 2002; 90: 281- 297.
19. Gonzales Paniagua J. Prevalencia de Brucelosis Equina (Tesis de Licenciatura) Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Provincia German Busch-Dpto. de Santa Cruz de la Sierra-Bolivia 2002.
20. Gul ST, Khan A, Ahmad M, Hussain I. Seroprevalence, and Hematological and Biochemical parameters of brucellosis in horses. Department of Veterinary

- Pathology, Department of Theriogenology, Department of Veterinary Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, Octubre 2008.
21. Hirsh, DC, MacLachlan NJ y Walker R. Veterinary Microbiology. Blackwell Publishing., 2a ed., U.S.A. 2004. pp 105-112.
  22. Hubálek Z, Scholz HC, Sedláček I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbová J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). Vector Borne Zoonotic Dis. 2007; 7: 4:679-87.
  23. Lasta CS, Dasso MG, Merini LP, Tostes de Oliveira S, Beck CA, Felix HD, Moraes BA, Moura da Silva VR. Anti-Brucella Serological Inquiry in Rig Pulling Horses in Porto Alegre/rs- Brazil. Proceedings of the 11th International Congress of the world Equine Veterinary Association. 2009 Septiembre 24-27; Guarujá Brazil. International Veterinary Information Service.
  24. Lord, VR, Laserna RH y Meléndez G. Seroprevalencia de brucelosis en caballos de Venezuela. Veterinaria Tropical 11:31-42, 1986.
  25. Miranda A.O., Núñez S.E., Ledesma P., 65-Brucelosis equina: Relevamiento seroepidemiológico en la provincia de Corrientes (Argentina). XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas 2005 85° Aniversario- Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional del Nordeste. Laboratorio Inmunodiagnóstico e Inmunobiológicos Anexo cátedra Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE.
  26. Nicola AM, Samartino L, Alonso B, Barcos LO, Ramos M, Bagnat E, et.al. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis-VI Congreso argentino de Zoonosis. Junio 2008. Citado (14 abril 2011 a las 10:45am) on line [http://www.rr-america.oie.int/es/proyectos/zoonosis/es\\_brucelosis.html#II](http://www.rr-america.oie.int/es/proyectos/zoonosis/es_brucelosis.html#II).
  27. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
  28. Organización Mundial de la salud. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for terrestrial animals (mammals, birds, and bees) 2004:vol.1. París Francia.
  29. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. N Engl J Med. 2005. 352:2325-36. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>

30. Peraza C, Valdés O, Fonseca N, Izquierdo L, García M y Alvaréz M. Use of an Indirect ELISA for *Brucella abortus* Diagnosis in Cuba. Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario. La Habana Cuba.
31. Rivera, M D. Prevalencia de Brucelosis Equina en el Municipio de Chiquimulilla, departamento de Santa Rosa Guatemala. (Tesis de Licenciatura), Universidad de San Carlos de Guatemala. Noviembre 1996.
32. Sánchez AV, Rodríguez MV, Becerra LR, y Cordero R. Utilidad de las Técnicas Fluorescencia Polarizada y del Inmunoensayo Enzimático de Competencia para Diagnóstico de Brucelosis en caballos Pura Sangre de Carreras. Interciencia febrero del 2010. 35:2:131-135.
33. Sccholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P. *et al. Brucella microti sp. Nov.*, isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Sys Evol Microbiol. 2008. 58: 375 - 382.
34. Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR, Koylass MS, Cummins LB, Dick ED, Snider CL, Cappelli D, Ebersole JL, Nathanielsz PW & Hubbard GB. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. J Med Primatol J Med Primatol. 2009. 38:70-73.
35. Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Pfeiffer M, Krüger M, Cloeckert A, Tomaso H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2009; 9:2: 153-155.
36. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). República de Argentina. 2006. Citado (20 enero 2011) Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/comun\\_varias\\_especies/16-brucelosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/comun_varias_especies/16-brucelosis.pdf).
37. Stephen MR, Warwick MB and Debra CS. Equine Internal Medicine. Saunders Elseiver. Tercera edición. St Louis 2010;1:15-99.
38. Vega Medellín DM, *Brucella abortus*. Antecedentes y Avances en Aspectos de Patogénesis, Diagnóstico y Control. (Tesis de Licenciatura). Bogotá, D.C. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Agosto 2006.

39. Zola, Heddy. *Laboratory Methods in Immunology. Volume I.* CRC Press, Inc. USA, 2000.