



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE
FIJACIÓN DE COMPLEMENTO AL 50% Y
100% DE HEMÓLISIS EN EL DIAGNÓSTICO
SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS BOVINA Y
CAPRINA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

LILIANA MIRANDA FLORES

ASESORES:

MVZ MYRNA ALICIA VICENCIO MALLÉN

MVZ ANDRÉS DUCOING WATTY

MVZ MARTHA ISABEL ROSADO RODRÍGUEZ



MÉXICO, DF. ABRIL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Anita Flores López y Marino Miranda Castro.

Gracias por confiar en mí y apoyarme en este proyecto de vida, Uds. me han enseñado que siempre es posible salir adelante, no importa cuán difícil sea, siempre hay una enseñanza al final del camino.

A mi hermana Griselda Miranda Flores.

Hermosa mujer siempre has sido mi ejemplo y mi motor para seguir adelante, a pesar de lo nublado que se encuentre el paisaje juntas hemos sabido salir adelante y esto es una prueba más superada.

A mi hermano Juan Saúl Miranda Flores.

La felicidad no siempre es dinero ni bienes materiales, sino la confianza y la seguridad de nosotros mismos. Has sido pieza clave en mi vida hermanito y me siento afortunada por tenerte en mi vida y que seas mi hermano, Dios no pudo haberme dado un ser más perfecto que tú para mí.

AGRADECIMIENTOS

Un sincero agradecimiento a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, institución que me aceptó hace ya más de 5 años, me formó y puso en mi camino a muchos de los mejores médicos en medicina veterinaria y gracias a ella ahora soy una mujer con elementos para defenderla y siempre estar orgullosa de esta hermosa **Universidad Nacional Atonóma de México**.

Al **Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal** (CENASA - Tecamac). Gracias por haber apoyado en todo momento este proyecto, con el cual comenzaré una nueva vida y sin su apoyo nunca lo hubiera logrado.

A la **MVZ Myrna Alicia Vicencio Mallén**, a quien jamás encontraré la forma de agradecer su apoyo, comprensión y confianza, esperando comprenda que mis logros son también suyos y hago de este trabajo un triunfo que quiero compartir con usted.

A la **MVZ Martha I Rosado**, por la excelencia y formación profesional, gracias a su cariño, guía y apoyo. Este presente simboliza mi gratitud por toda la responsabilidad e invaluable ayuda que siempre me han proporcionado.

Al **Dr. Andrés Ducoing Watty**, al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quien con su ayuda y apoyo me alentó a lograr esta hermosa realidad. ¡Gracias!

Al **Laboratorio Ángel Usabiaga Villanueva**, perteneciente a la Unión Ganadera Regional de Guanajuato. Quien cooperó de manera desinteresada en este proyecto, que para mi es el comienzo de mi vida profesional.

A la **MVZ Evelia Aguilar Becerra y al Dr. Alejandro Enriquez Vázquez**, quienes me acompañaron en este proceso tan importante en mi vida, apoyando con material para lograr este proyecto.

A **Eloy García Martínez**, por ser el responsable de las risas y retos en el laboratorio, mi confidente y amigo en todo momento, sin mencionar la gran ayuda que siempre recibí de ti y claro, no pueden faltar los regaños que necesité para lograr este proyecto.

Al **MVZ Miguel Galarde López**, por el cariño y apoyo incondicional que siempre he recibido y con el cual he logrado culminar mi esfuerzo, terminando así mi carrera profesional, que es para mi la mejor prueba de cariño y agradecimiento.

Con amor... Liliana Miranda Flores.

Contenido

LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 SITUACIÓN ZOOSANITARIA DE BRUCELOSIS EN MÉXICO	3
1.2 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>BRUCELLA</i> SPP	4
1.2.1 <i>Membrana externa</i>	4
1.2.2 <i>Lilpopolisacárido (LPS)</i>	5
1.2.3 <i>Hapteno nativo (HN)</i>	6
1.3 ENFERMEDAD EN EL HOSPEDERO	6
1.3.1 <i>Enfermedad en el humano</i>	7
1.3.2 <i>Enfermedad en los animales</i>	7
1.4 RESPUESTA INMUNE	8
1.5 DIAGNÓSTICO	9
1.5.1 <i>Diagnóstico de brucelosis por pruebas directas</i>	10
1.5.2 <i>Diganóstico de brucelosis por pruebas indirectas</i>	10
1.6 TRATAMIENTO	13
1.7 PROFILAXIS Y CONTROL	13
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVOS GENERALES	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SEROLÓGICAS DE GANADO BOVINO	15
4.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SEROLÓGICAS DE GANADO CAPRINO.....	16
4.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	17
4.4 PRUEBAS DE TARJETA Y RIVANOL.....	17
4.5 PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO.....	18
4.5.1 <i>Elementos utilizados en la prueba</i>	18
4.5.2 <i>Técnica de Fijación de Complemento al 100% de hemólisis</i>	19
4.5.3 <i>Técnica de Fijación de Complemento al 50% de hemólisis</i>	19
4.5.4 <i>Técnica en microplaca de FC</i>	20
4.5.5 <i>Interpretación de los controles de la prueba</i>	20

4.5.6	<i>Interpretación de la lectura</i>	21
4.5.7	<i>Interpretación de resultados</i>	21
4.6	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	22
5	RESULTADOS	24
5.1	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN LOS SUEROS DE BOVINO	24
5.2	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN SUEROS DE CAPRINO	25
5.3	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FC	26
	<i>5.3.2 Resultados de la prueba de FC al 100% de hemólisis</i>	26
6	DISCUSIÓN	28
7	CONCLUSIONES	31
8	REFERENCIAS	32

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Situación zoonositaria de la brucelosis en México	3
Cuadro 2.	Estados de la República Mexicana con mayor incidencia de brucelosis humana, para el año 2011	4
Cuadro 3.	Especies animales afectadas por brucelas lisas	5
Cuadro 4.	Especies animales afectadas por brucelas rugosas	6
Cuadro 5.	Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de brucelosis en los animales	9
Cuadro 6.	Procedencia de las muestras serológicas que se utilizaron para la comparación de los resultados de la prueba de FC en el diagnóstico de brucelosis	16
Cuadro 7.	Origen y número de muestras serológicas de ganado caprino	17
Cuadro 8.	Técnica de fijación de complemento en microplaca	20
Cuadro 9.	Interpretación de controles de la prueba de fijación de complemento al 100% de hemólisis	20
Cuadro 10.	Interpretación de controles de la prueba de fijación de complemento al 50% de hemólisis	21
Cuadro 11.	Valores de concordancia de Kappa	24
Cuadro 12.	Número de muestras serológicas de bovino de acuerdo al título obtenido en la prueba de rivanol	25
Cuadro 13.	Comparación de los resultados de las pruebas de fijación de complemento en muestras de ganado bovino	27
Cuadro 14.	Comparación de los resultados de las pruebas de fijación de complemento en muestras de ganado caprino	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de la membrana externa del género <i>Brucella</i> spp.	5
-----------	---	---

RESUMEN

MIRANDA FLORES LILIANA. Comparación de la prueba de Fijación de Complemento al 50% y 100% de hemólisis en el diagnóstico serológico de brucelosis bovina y caprina. Bajo la dirección de: MVZ Myrna Alicia Vicencio Mallén, MVZ PhD Andrés Ernesto Ducoing Watty y MVZ Martha Isabel Rosado Rodríguez.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa del ganado, que reduce de manera importante el rendimiento reproductivo y productivo de los animales, por lo cual es considerada como causa de grandes pérdidas económicas en la ganadería nacional, sin mencionar los gastos en salud pública y asistencia médica requerida por las personas afectadas. El diagnóstico para esta enfermedad es y ha sido una limitante importante para la erradicación y control de la misma. En México la prueba de Fijación de Complemento (FC) es una prueba confirmatoria oficial, de igual manera para el comercio a nivel internacional; la prueba cuenta con dos modalidades: al 50% de hemólisis y al 100% de hemólisis. En este estudio se comparó la técnica de FC al 100% de hemólisis para el diagnóstico serológico de brucelosis en bovinos y caprinos, con respecto a la técnica de FC al 50% de hemólisis. Se realizó la prueba en 456 sueros de bovino y en 346 sueros de caprino. Para comparar ambas pruebas serológicas se determinó la sensibilidad y especificidad relativas (SR y ER), teniendo como resultado que la prueba de FC al 100% de hemólisis tiene una SR para bovinos de 98.44% y una ER de 96.59% y para los sueros de caprino una SR de 93.75% y una ER de 98.0%. Por lo cual este estudio demostró que es altamente confiable en el diagnóstico de brucelosis, además de ser una prueba menos compleja, dejando la oportunidad para que pueda ser utilizada por más laboratorios en México.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida hoy en día como brucelosis, fue descrita por Hipócrates en sus escritos de epidemia hace más de 2000 años (Currier, 1925) pero fue hasta 1887 cuando se llevaron a cabo investigaciones por parte del médico del ejército británico David Bruce, quien identificó un microorganismo denominado *Micrococcus melitensis* a partir del bazo de cuatro soldados enfermos que combatieron en la guerra de Crimea (Vega *et al.*, 2008).

A inicios del año 1897 el médico veterinario danés Bernhard Bang, aisló de animales enfermos de “aborto contagioso” un microorganismo, al cual llamó *Bacillus abortus* mismo que fue denominado posteriormente *Brucella abortus* al encontrar estrecha similitud con lo descrito por David Bruce (Vega *et al.*, 2008; Wyatt, 2013).

El Dr. Themistocles Zammit en 1904 realizó diversos experimentos, uno de los más importantes fue proporcionar leche de cabras infectadas con *Brucella* a cabras sanas, con lo cual demostró que a través de la leche se podía transmitir la enfermedad a los seres humanos (Wyatt, 2005).

En 1905 en la República Mexicana, se identificó por vez primera el género *Brucella* por los doctores Carvajal y Valenzuela (Vega *et al.*, 2008; Wyatt, 2013).

En 1920, Alice Evans comprueba la semejanza entre los agentes aislados por Bang y Bruce, decidiendo designarle al agente causal el nombre de *Brucella* (Vega *et al.*, 2008; Wyatt, 2013).

En 1930 comenzaron a cesar los casos de brucelosis en humanos, mejorando la higiene en la práctica de ordeño (Wyatt, 2013). Para este mismo año, se desarrolló una vacuna a partir de una cepa de baja virulencia llamada *Brucella abortus* cepa 19, la cual se ha utilizado durante décadas como el principal agente inmunizante para el control de la brucelosis bovina (Rahman *et al.*, 2006).

1.1 Situación zoonosanitaria de brucelosis en México

La mayoría de los sistemas de producción agropecuaria en el medio rural de México son de traspatio, con pastoreo en tierras comunales, poca tecnificación y deficiencias zoonosanitarias, condiciones que propician el riesgo de contagio de brucelosis en las personas (García *et al.*, 2014). Debido a esto y a las grandes pérdidas económicas que genera en la ganadería del país, se pretende erradicar la brucelosis por medio de las medidas de diagnóstico y control establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. *Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales*, además de estar sujeta esta enfermedad a vigilancia epidemiológica y a notificaciones por parte de médicos cirujanos y médicos veterinarios; así como por los laboratorios autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). A pesar de 20 años de esfuerzos por erradicar la brucelosis de la República Mexicana, éstos no han sido suficientes, ya que tan sólo una entidad federativa se encuentra libre de esta enfermedad. En el cuadro 1 se describe la situación zoonosanitaria de la brucelosis en México (SENASICA, 2015).

Cuadro 1. Situación zoonosanitaria de la brucelosis en México (Senasica, 2015)

ESTADO	SITUACIÓN ZOOSANITARIA	DESDE EL AÑO
Sonora	Libre	2003
Yucatán	Erradicación	2002
Baja California Sur		2010
Campeche		2011
Quintana Roo		2012
Colima		2013
Nayarit		2014
Guerrero		2015
Chiapas		2015
Región Huasteca de Hidalgo		2015
El resto del país se encuentra en fase de control		

Del período comprendido del año 2000 al 2011 se registraron 12, 214 casos de brucelosis en humanos siendo Sinaloa el estado más afectado con una incidencia

de 21 casos por cada 100,000 habitantes (Chertorivski *et al.*, 2012). En el cuadro 2 se muestran los estados de la república mexicana más afectados por brucelosis en humanos.

Cuadro 2. Estados la República Mexicana con mayor incidencia de brucelosis humana, para el año 2011 (Chertorivski *et al.*, 2012).

ESTADO	INCIDENCIA POR 100,000 HABITANTES
Sinaloa	21.0
Tlaxcala	14.3
San Luis Potosí	12.6
Guanajuato	8.2
Zacatecas	7.0
Nuevo León	5.5
Michoacán	5.1
Puebla	4.6
Chihuahua	4.5
Coahuila	4.4

1.2 Características del género *Brucella* spp

Las bacterias del género *Brucella* son pequeños cocobacilos inmóviles, Gram negativos de bordes rectos o ligeramente convexos y de extremos redondeados, que miden 0.5-0.7 μm de ancho por 0.6-1.5 μm de largo (Corbel y Morgan, 1982).

1.2.1 Membrana externa

La membrana externa es relativamente hidrofóbica, resistente a algunos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales. Esta membrana no protege a la bacteria de agentes hidrófobos como sales biliares, detergentes o ciertos colorantes, lo cual explica que no puedan desarrollarse en medios selectivos que contienen tales compuestos como el medio McConkey (Corbel y Morgan, 1982). La Figura 1 muestra la estructura de la membrana externa.

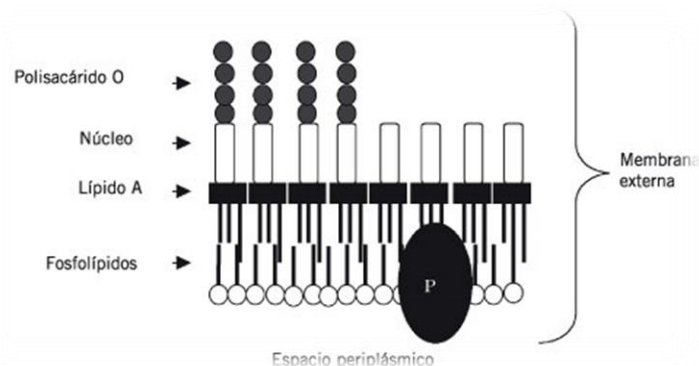


Figura 1. Estructura de la membrana externa de *Brucella* spp (Castro *et al.*, 2005).

1.2.2 Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es el mayor determinante de virulencia, se encuentra en la membrana externa (Vega *et al.*, 2008). Está compuesto por una parte glucolipídica (lípido A), misma que se encuentra inserta en la membrana externa y otra heteropolisacáridica dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo y la cadena O la cual proporciona la característica lisa (LPS-S), como se muestra en la figura 1 (Romero *et al.*, 2010). La cadena ó antígeno “O” es el antígeno inmunodominante, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales (Plommet, 1988). En el Cuadro 3 se detallan las especies animales afectadas por brucelas lisas. (Xavier *et al.*, 2009; Spickler, 2009).

Cuadro 3. Especies animales afectadas por brucelas lisas (Spickler, 2009; Xavier 2009; Siadat, 2010; Castillo, 2015).

Especie	Animales afectados
<i>B. melitensis</i>	borregos y cabras
<i>B. abortus</i>	vacas, búfalos de agua, bisón, búfalo africano, alce y camellos
<i>B. suis</i>	cerdos
<i>B. neotomae</i>	ratas del bosque
<i>B. pinnipedialis</i>	lobos marinos, osos marinos, focas, elefantes marinos y morsas
<i>B. ceti</i>	ballenas delfines y orcas
<i>B. microti</i>	ratón de montaña , zorro rojo
<i>B. inopinata</i>	desconocido
<i>B. papionis</i>	babuinos

En cambio el LPS de las especies rugosas (LPS-R), no cuentan con la cadena “O” (Romero *et al.*, 2010). En el Cuadro 4 las especies afectadas por el género *Brucella* de tipo rugoso. (Xavier *et al.*, 2009; Ficht, 2011; Doganay y Doganay, 2013).

Cuadro 4. Especies afectadas por brucelas rugosas
(Xavier, 2009; Ficht 2010, Doganay, 2013).

BRUCELAS CON LPS RUGOSO (R)	Animales que afecta
<i>B. ovis</i>	borregos
<i>B. canis</i>	perros

1.2.3 Hapteno nativo (HN)

Además de la cadena “O” del LPS, las brucelas contienen otro polisacárido que es químicamente idéntico a la cadena O, denominado hapteno nativo (HN); sin embargo éste no se encuentra unido al núcleo (Castro *et al.*, 2005). Su papel biológico podría ser diferente, pues el HN podría presentar una molécula de superficie que al estar inserta entre los LPS-S contribuiría a dar a la superficie características de tipo liso sin incrementar la cantidad del lipopolisacárido y sus secreciones internas (Díaz *et al.*, 2001).

1.3 Enfermedad en el hospedero

Las bacterias del género *Brucella* pueden ingresar al organismo por vía nasofaringea, conjuntival, cutánea o vaginal, pudiendo ser fagocitada por polimorfonucleares (PMN) y/o macrófagos para ser transportada a los linfonodos regionales y ahí poder multiplicarse en un período de 14 a 180 días. Se transmite principalmente cuando un animal infectado aborta o pare, las secreciones durante dichos sucesos contaminan alimento y agua contagiando así a otros animales (Adams, 2002; Carvalho *et al.*, 2010). Debido a que son bacterias intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene a salvo de la acción de los antibióticos y de los mecanismos de defensa por largos periodos de tiempo, además de poder multiplicarse dentro del fagocito, logran con esto la diseminación de la infección a diferentes órganos con abundante trama linforreticular como el bazo, el hígado o la

médula ósea, provocando sucesivas ondas bacterémicas que generalmente producen un periodo febril en el hospedador (Adams, 2002; Carvalho *et al.*, 2010; Comerci, 2002; Díaz *et al.*, 2001).

1.3.1 Enfermedad en el humano

Se considera que el 90% de los casos de brucelosis en humanos se deben a *B. mellitensis* (Martínez, 2009), siendo en menor proporción la infección por *B. abortus* y *B. suis* (Díaz *et al.*, 2001). Su transmisión se da por medio de la ingesta de carne cruda de animales infectados, así como leche y sus derivados cuando no existe un proceso de pasteurización efectivo o al estar en contacto con animales infectados (Ritchie, 2011), así como por manipulación de desechos o tejidos de animales enfermos, por inoculación de brucelas o inhalación de polvo de corrales o mataderos donde éstas se encuentran (NOM-022-SSA2-1994). Debido a la presencia de síntomas inespecíficos tales como: fiebre intermitente o irregular, cefalea, debilidad, sudor abundante, escalofríos, pérdida de peso y dolor generalizado, el diagnóstico se vuelve difícil (Comerci, 2002; Sbriglio *et al.*, 2007, Ritchie, 2011). La brucelosis crónica puede presentarse varios meses o años después de la infección manifestándose complicaciones osteoarticulares, endocarditis, abscesos hepatoesplénicos y desordenes neurológicos (Comerci, 2002).

1.3.2 Enfermedad en los animales

En los animales gestantes la bacteria coloniza el útero y los cotiledones placentarios manifestándose como placentitis (Comerci, 2002), logrando con esto atravesar la placenta e invadir al feto, principalmente en pulmón, bazo, hígado, miocardio y contenido abomasal; alterando la nutrición y respiración del feto, lo cual provocará la muerte y expulsión del mismo, generalmente los partos posteriores son normales, pudiendo colonizar posteriormente la glándula mamaria y con ello disminuir la producción de leche (Ritchie, 2011).

Si el animal no está gestante, la localización usual es la ubre, donde se produce mastitis intersticial, afectando a los linfonodos adyacentes. También se pueden localizar en hígado, pulmón y bazo donde se producen focos granulomatosos, quedando las hembras infectadas de por vida (Díaz *et al.*, 2001).

Después del parto la bacteria se elimina por medio del calostro y la leche sobre todo en la primera etapa de lactancia disminuyendo su eliminación a medida que ésta avanza, pudiendo expulsar bacterias de manera intermitente hasta la tercera semana (Vega *et al.*, 2008).

En el macho, la infección genital es inaparente en la mayoría de los casos, pero puede estar localizada en testículos, epidídimo o vesículas seminales, siendo una secuela común la formación de abscesos originando infertilidad (Díaz *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2009; Ritchie, 2011). El pronóstico no es favorable debido a que al ser una bacteria intracelular, el tratamiento es ineficiente por lo que se recomienda el sacrificio de los animales (Díaz *et al.*, 2001). Generalmente los machos nacidos de madres infectadas, nacen débiles (Ritchie, 2011).

1.4 Respuesta inmune

Los antígenos de la *Brucella* pueden dividirse en dos grupos principales: el LPS que induce anticuerpos aglutinantes y las proteínas responsables de la inmunidad celular protectora. El ingreso de *Brucella* spp. al organismo induce la activación de mecanismos de defensa de la inmunidad innata como el sistema del complemento. La activación de la vía clásica y alterna (por medio del LPS) del complemento, puede iniciarse con bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS logrando la lisis bacteriana (Castro *et al.* 2005). La opsonización de las bacterias por los anticuerpos y el sistema del complemento facilita la fagocitosis efectiva (Rivers *et al.* 2006). El ingreso de la bacteria a los macrófagos se produce por la interacción de la molécula CD-14 con el LPS, lo que origina la producción de Interleucina IL-12, la cual estimula a las células asesinas naturales (NK) y a los Linfocitos T Cooperadores o *helper* (LTH) CD4+ quienes secretarán Interferón gamma (IFN- γ), favoreciendo el desarrollo de la respuesta inmune

predominantemente mediada por LTH1 (Vitry *et al.*, 2014); éstos estimulan una respuesta de tipo celular por medio de la secreción de IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT- α) e IFN- γ , este último activa a macrófagos con mayor capacidad bactericida (Castro *et al.*, 2005;).

Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro de las células presentadoras de antígeno y sus péptidos asociados a Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I y II, son presentadas a los LTH, CD4+ y LT Citotóxicos (LTC) CD8+, los cuales son capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas (Martínez y Martínez, 2002; Castro *et al.*, 2005; Vitry *et al.*, 2014). Los LPS se consideran como antígenos T-independientes, capaces de activar linfocitos B sin la participación de LTH (Castro *et al.*, 2005). Los primeros anticuerpos que se producen son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA. La supervivencia de *Brucella* dentro de las células está mediada por sustancias oxidantes y la producción de AMP y GMP cíclicos que inhibirán la fusión de los fagosomas con los lisosomas, así como la activación del FNT- α , la degranulación y la activación del sistema mieloperoxidasa (Diacovich y Gorvel 2010; Vega, 2008).

1.5 Diagnóstico

Existen diferentes pruebas de laboratorio para llevar a cabo el diagnóstico de brucelosis en los animales. En el Cuadro 5 se muestran las pruebas frecuentemente utilizadas para el diagnóstico de brucelosis en medicina veterinaria.

Cabe hacer notar que tanto la NOM-041-ZOO-1995 *Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales* como la NOM-056-ZOO-1995 *Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobadas en materia zoonosanitaria*, consideran como pruebas oficiales para el diagnóstico de brucelosis en México, el aislamiento bacteriológico y las pruebas serológicas (Aglutinación, FC e Inmunodifusión en Gel Agar)

Cuadro 5. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de brucelosis en los animales (OIE, 2015).

Pruebas Directas	<ul style="list-style-type: none"> • Aislamiento, identificación y tipificación bacteriológica • Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
Pruebas Indirectas (Serológicas o Inmunológicas)	<ul style="list-style-type: none"> • Pruebas de Aglutinación • Fijación de Complemento (FC) • Ensayo inmunoenzimático (ELISA) • Fluorescencia Polarizada (FPA) • Pruebas de Inmunodifusión que utilizan como antígeno el hapteno nativo (IDGA, IDR)
Otras	<ul style="list-style-type: none"> • Pruebas de intradermorreacción (Brucelina)

1.5.1 Diagnóstico de brucelosis por pruebas directas

La infección por *Brucella spp* se comprueba de manera indiscutible a través de su aislamiento, identificación y tipificación bacteriológica mediante el cultivo ó utilizando pruebas que detectan una secuencia específica del ADN como la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (OIE, 2015); sin embargo esto no siempre es posible debido a que muchos laboratorios no cuentan con la infraestructura, instalaciones y personal capacitado para llevar a cabo estas pruebas, además de presentar el riesgo de contraer la enfermedad (Alton, 1988; Mejía y Lemus, 2012).

1.5.2 Diagnóstico de brucelosis por pruebas indirectas

Las pruebas indirectas son aquellas en las que se busca una reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). El diagnóstico serológico basado en detectar la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* en el suero de animales sospechosos, desempeña un papel fundamental para el diagnóstico y control de la enfermedad. La prueba serológica perfecta sería aquella que detectara la infección temprana, durante el periodo de incubación de la enfermedad y antes de que haya ocurrido el aborto; además de que discriminara entre anticuerpos vacunales de anticuerpos de origen infeccioso (Díaz *et al*, 2001). Hasta el momento no se cuenta con alguna prueba

que posea estas características, pero sí hay una serie de pruebas que en conjunto ayudan a tener un diagnóstico más certero.

Las pruebas serológicas oficiales se dividen de la siguiente manera:

- **Diagnóstico de brucelas rugosas**

Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar para el diagnóstico de epididimitis ovina causada por *Brucella ovis*. Detecta anticuerpos del isotipo IgG dirigidos contra el HN de la membrana externa (Díaz *et al.*, 2001; OIE, 2015).

- **Diagnóstico de brucelas lisas**

Se dividen en:

1.5.2.1. Prueba de vigilancia epidemiológica

a) Prueba de anillo en leche: esta prueba serológica es sencilla, detecta anticuerpos en leche de isotipo IgG e IgM y todos los hatos productores de leche están obligados a participar en el programa de monitoreo en leche (NOM-041-ZOO-1995).

1.5.2.2. Pruebas Tamiz

a) Prueba de Tarjeta: debido a su alta sensibilidad (93%) según Chothe (2014), es considerada como tamiz en el diagnóstico serológico de brucelosis, ya que reacciona con muestras que presenten anticuerpos contra brucelas lisas o con cualquier otra bacteria que presente reacción cruzada con ésta (Díaz *et al.*, 2001). Esta prueba serológica detecta anticuerpos de isotipo IgM e IgG contra cepas lisas de *Brucella* (Mejía y Lemus, 2012).

El antígeno tiene dos concentraciones celulares, al 3% se utiliza para el diagnóstico en sueros de ovinos y caprinos; al 8% se utiliza en sueros de bovinos (Alton, 1988; Díaz *et al.*, 1999).

1.5.2.3. Pruebas Complementarias

a) Prueba de Rivanol: esta prueba fue desarrollada en 1964 por Anderson. Es un método cuantitativo, rápido y complementario cuando resultan sueros de bovino positivos a la prueba de tarjeta al 8% (Díaz *et al.*, 2001). En esta prueba, se precipitan en una primera etapa la albúmina y los anticuerpos del isotipo IgM, los cuales predominan en el caso de vacunación o infección primaria, quedando libres en el sobrenadante anticuerpos de isotipo IgG cuya presencia está ligada a un fuerte estímulo antigénico; así como a un estado de infección activo o con enfermedad crónica (NOM-056-ZOO-1995).

b) Prueba de Fijación de Complemento (FC): es la mejor prueba serológica para identificar animales infectados, también es capaz de diferenciar entre los títulos de animales infectados y vacunados con ayuda de la historia clínica (Dájer *et al.*, 1995). Se fundamenta en la activación del complemento por la vía clásica. Esta prueba serológica ayuda a determinar el título de anticuerpos fijadores de complemento contra cepas lisas de *Brucella spp.* presentes en el suero de bovinos, ovinos y caprinos (Díaz *et al.*, 2001).

Es una prueba altamente sensible y específica, además de ser cuantitativa ya que permite medir la presencia de anticuerpos del isotipo IgG1 contra cepas lisas de *Brucella spp.* presentes en el suero de animales infectados o vacunados, es una de las principales pruebas utilizadas para el comercio internacional (Alton, 1988; OIE, 2015).

En México la prueba de Fijación de Complemento (FC) se considera oficialmente como una prueba confirmatoria; cuenta con dos modalidades: al 50% de hemólisis y al 100% de hemólisis. El Centro Nacional de de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) dependiente de la DGSA de la SAGARPA, trabaja una modificación de la técnica del 50% de hemólisis descrita por Alton (Hennanger, 2011) y que difiere en algunos aspectos con la descrita en la NOM-056-ZOO-1995, esta situación ha permitido que algunos laboratorios oficiales que realizan la prueba de FC, utilicen la técnica del 100% de hemólisis.

1.6 Tratamiento

De acuerdo a la NOM-041-ZOO1995 todos los animales reactivos bajo el programa de hatos libres y los que se encuentren en programas de control-erradicación que no vayan a unidades de producción controlada, deben ser sacrificados en un rastro autorizado por la SAGARPA.

1.7 Profilaxis y control

La forma más común para el control de la brucelosis en ganado bovino y caprino es mediante la prevención a través de la vacunación. En México las vacunas disponibles son la cepa S19 y la RB51 de *B. abortus* para su uso en bovinos y la Rev 1 de *B. melitensis* para su uso en cabras (Blasco, 2010). Tanto la vacuna S19 y la Rev 1 basan su buena capacidad inmunógena en su elevada persistencia en los animales, dando como resultado una respuesta serológica de gran intensidad y elevada duración frente a los antígenos de carácter liso usados en las pruebas serológicas con la subsiguiente interferencia en el diagnóstico, es por ello que es importante que la interpretación de resultados de las pruebas serológicas se realicen tomando en cuenta el calendario de vacunación para diferenciar anticuerpos vacunales de aquellos anticuerpos de campo (Díaz *et al.*, 2001).

Al no existir ningún procedimiento totalmente efectivo para prevenir el contagio humano, la única posibilidad de evitarlo pasa obligatoriamente a la erradicación de la enfermedad en los animales. Hasta ahora, el único procedimiento conocido para lograrlo consiste en la detección de los animales infectados a través de pruebas de diagnóstico adecuadas y su inmediata eliminación mediante la eutanasia (Díaz *et al.*, 2001).

En México existen 179 laboratorios autorizados por la SAGARPA para realizar el diagnóstico serológico de brucelosis (SAGARPA, 2015), de los cuales 13 realizan la prueba de FC y de éstos, siete trabajan la técnica al 50% de hemólisis, mientras que seis laboratorios realizan la técnica al 100% de hemólisis. La Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, menciona el uso de la técnica al 50% de

hemólisis, pero no descarta utilizar la técnica al 100% de hemólisis, mientras que la NOM-041-ZOO-1995 no especifica qué técnica es la que debe utilizarse. Con base en lo anterior se puede interpretar que los resultados que emiten los laboratorios que utilizan la técnica al 100% de hemólisis no serían oficiales. El presente trabajo pretende demostrar que ambas técnicas funcionan de la misma manera no interviniendo en los objetivos de la campaña y dando pauta a utilizar cualquiera de estas técnicas para el diagnóstico de brucelosis.

2. HIPÓTESIS

No existe diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos obtenidos con la prueba de fijación de complemento (FC) al 50% y al 100% de hemólisis en el diagnóstico serológico de brucelosis tanto en bovinos como en caprinos, con base en los criterios oficiales de interpretación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

Comparar los resultados de la prueba de FC al 100% de hemólisis con respecto a la técnica de FC al 50% de hemólisis, tanto en sueros de bovinos como de caprinos.

Establecer con base en los resultados obtenidos en la comparación, la validez de ambas pruebas con el fin de instaurar su pertinencia en los laboratorios autorizados.

3.2 Objetivos específicos

- a) Obtener muestras de sueros de bovinos y caprinos procedentes de hatos infectados, así como de hatos considerados como libres por la SAGARPA.
- b) Realizar las pruebas tamíz en los sueros de bovino y caprino.
- c) Realizar la prueba de Rivanol, como prueba complementaria en sueros de bovino.

- d) Llevar a cabo la prueba de FC con la técnica al 50% de hemólisis en sueros de bovinos y caprinos.
- e) Llevar a cabo la prueba de FC con la técnica al 100% de hemólisis en sueros de bovinos y caprinos.
- f) Comparar los resultados de la prueba de FC por medio del coeficiente Kappa, tanto en los sueros de bovino como en los de caprino.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Es un estudio: observacional, prospectivo, transversal y comparativo (Hernández *et al.*, 2000).

4.1 Obtención de muestras serológicas de ganado bovino

Para este trabajo se colectaron muestras que fueron divididas en tres grupos como se describe en el cuadro 6.

- i) Muestras serológicas con antecedentes de positividad, procedentes de diferentes laboratorios, como el “Laboratorio de Patología Animal” que se encuentra en el municipio de Calamanda, Querétaro; también del laboratorio de serología del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) perteneciente a SENASICA-SAGARPA y por último del laboratorio de serología de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA-FMVZ-UNAM). El número de muestras proporcionadas por cada laboratorio se describe en el cuadro 6.
- ii) Muestras serológicas sin antecedentes. Se realizó un muestreo intensionado en el CEIEPAA-FMVZ-UNAM que cuenta con certificado de hatos libres de brucelosis desde hace siete años.
- iii) También se realizaron muestreos intensionados en el municipio de Colón perteneciente al estado de Querétaro, donde se presume de

antecedentes de positividad. Los animales de este grupo no cuentan con calendario de vacunación.

Todas las muestras provinieron de hembras mayores de 22 meses de edad (NOM-041-ZOO-1995).

4.2 Obtención de muestras serológicas de ganado caprino

Los sueros de ganado caprino que fueron obtenidos se dividieron en tres grupos como se describe en el cuadro 7.

- i) Sueros con antecedente de positividad, los cuales fueron otorgados por el Laboratorio General de Diagnóstico Ángel Usabiaga Villanueva, que se encuentra en Celaya Gto.
- ii) Sueros sin antecedentes, los cuales fueron obtenidos mediante un muestreo intencionado en el municipio de Pénjamo Gto. Los animales no cuentan con un calendario de vacunación.
- iii) Sueros de hato libre, se obtuvieron mediante un muestreo intencionado del CEIEPAA-FMVZ-UNAM

Todas las muestras provinieron de hembras mayores a 14 meses de edad (NOM-041-ZOO-1995).

La toma y envío de muestras se llevó a cabo con base en lo descrito en el Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas) de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015).

CUADRO 6. Origen y número de muestras serológicas de ganado bovino

Antecedente de positividad		Antecedente de hato libre		Sin antecedentes	
Lab.Calamanda	80				
Lab.CENASA	100	CEIEPAA	146	Mpio.Colón	50
Lab.USEDICO	80				
Total	260		146		50

CUADRO 7. Origen y número de muestras serológicas de ganado caprino

Antecedente de positividad		Antecedente de hatillo libre		Sin antecedentes	
Lab. Celaya	100	CEIEPAA	97	Mpio. Penjamo	100
				Mpio. Tequisquiapan	49
Total	100		97		149

4.3 Procesamiento de las muestras

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de serología perteneciente al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) de la Dirección General de Sanidad Animal (DGSA) de la SAGARPA, donde se realizó la técnica al 50% de hemólisis; también se trabajó en el laboratorio de serología de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) que se encuentra en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) donde se realizó la técnica de FC al 100% de hemólisis.

4.4 Pruebas de Tarjeta y Rivanol

Para la realización de las pruebas de tarjeta y rivanol, se procedió de acuerdo a las técnicas establecidas en la NOM-056-Z00-1995. Cabe aclarar que dicha norma señala que el diagnóstico de brucelosis se realiza por medio de pruebas en serie es decir, las muestras con resultado positivo pasan a la siguiente prueba (confirmatoria), sin embargo en este trabajo no se procedió de esta manera, ya que se consideró observar el resultado en todas las muestras de todas las pruebas.

Los reactivos fueron provistos por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE®).

4.5 Prueba de Fijación de Complemento

Ambas técnicas se fundamentan en la activación del complemento (C) por la vía clásica, es decir cuando ocurre una reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac).

La prueba consta de dos fases:

- i. *Fase invisible o fase de reacción.* Se lleva a cabo un primer sistema Ag-Ac, al enfrentar el suero sospechoso (elemento desconocido), el antígeno específico (elemento conocido) y el complemento (Corona, 2007; Cobos, 2005).
- ii. *Fase visible o fase indicadora.* Se agrega un segundo sistema Ag-Ac conocido como sistema indicador o sistema hemolítico, formado por glóbulos rojos de ovino y anticuerpos específicos contra éstos llamados hemolisina (Corona, 2007; Cobos, 2005).

Sí el suero contiene anticuerpos contra el antígeno, se forma un complejo Ag-Ac y el complemento se une a este complejo, por lo tanto no habrá o habrá menos complemento disponible para lisar los eritrocitos sensibilizados, observándose sedimentación de éstos lo que equivale a una reacción positiva (Hennanger, 2011; Cobos, 2005).

4.5.1 Elementos utilizados en la prueba

- a) **Sueros problema:** sueros de los cuales se desconoce la presencia de anticuerpos contra *Brucella spp.*
- b) **Sueros control positivo:** suero con una concentración conocida de anticuerpos contra *Brucella spp.*, se utilizó un antisuero contra *B. abortus* elaborado en conejo existente en la USEDICO.
- c) **Suero control negativo:** suero sin ningún anticuerpo contra *Brucella spp.*, se utilizaron sueros procedentes de animales negativos del CEIEPAA.
- d) **Antígeno (Ag):** se utilizó el antígeno oficial producido por PRONABIVE®, elaborado con *Brucella abortus* cepa 1119-3 sin teñir, con pH de 6.8 a 7.0 y

concentración celular de 4.5%. Para el procedimiento, este antígeno se diluyó 1:200.

- e) **Hemolisina:** es un antisuero contra los receptores de membrana de los eritrocitos elaborado en conejo, se utilizó hemolisina comercial (Colorado Serum Company®).
- f) **Glóbulos Rojos de Ovino (GR):** los eritrocitos fueron obtenidos de ovinos clínicamente sanos con anticoagulante Alsever y se almacenaron en refrigeración a 4° C. La técnica de FC al 50% requiere una concentración de GR al 3%, mientras que la técnica al 100% requiere una concentración al 2%.
- g) **Sistema Hemolítico (SH):** es una suspensión de GR de ovino mezclados con anticuerpos anti-glóbulos rojos de ovino previamente estandarizada.
- h) **Complemento:** se utilizó complemento comercial Guinea Pig Complement® (Lyophilized). La técnica al 50% demanda 4 unidades de complemento, mientras que la técnica de FC al 100% de hemólisis utiliza 2 unidades de complemento.
- i) **Solución Buffer:** para la titulación, estandarización de los elementos y la realización de las diferentes técnicas de FC, se utilizó Solución Buffer Veronal® (SVB).

4.5.2 Técnica de Fijación de Complemento al 100% de hemólisis

Se utilizó una modificación de lo descrito por Cunningham (1971). Esta técnica utiliza 2 unidades de complemento al 100% de hemólisis, 2 unidades de hemolisina, una suspensión de GR de ovino al 2% y SVB como diluyente. Se llevó a cabo en el laboratorio de serología de la USEDICO-CEIEPAA-FMVZ-UNAM.

4.5.3 Técnica de Fijación de Complemento al 50% de hemólisis

La prueba de FC al 50% de hemólisis corresponde a una modificación de lo descrito por Alton (1988). Esta técnica utiliza 4 unidades de complemento al 50%,

5 unidades de hemolisina, una concentración de GR de ovino al 3% y el diluyente que se utilizó fue SVB.

4.5.4 Técnica en microplaca de FC

En ambas técnicas se utilizaron diluciones dobles seriadas a partir de 1:5 hasta 1:320 para los sueros de bovino y 1:4 hasta 1:256 para los sueros de caprino, en un volumen final de 0.025 mL (NOM-056-ZOO-1995). En el Cuadro 7 se indica el orden de los reactivos agregados en cada técnica.

Cuadro 8. Técnica de Fijación de Complemento en microplaca.

Reactivo	DILUCIONES DE LOS SUEROS							CONTROL ANTICOMPLEMENTARIO
	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6	Pozo 7	Pozo 8
Dilución caprinos	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/4
Dilución bovinos	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/5
Diluyente	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL
Suero	0.050 mL	----	-----	-----	-----	-----	-----	0.025 mL
Transferir	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	Desechar 0.025 mL	Desechar 0.025 mL
Ag	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	-----
C	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL I	0.025 mL
INCUBAR 60 MINUTOS A 37°C EN BAÑO SEROLÓGICO (Técnica al 100%) o 30 MINUTOS (técnica al 50%)								
INCUBAR EL SISTEMA HEMOLÍTICO A 37°C EN BAÑO SEROLÓGICO								
SH (FC 100%)	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL
SH (FC 100%)	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL	0.025 mL
INCUBAR MÁXIMO 30 MINUTOS A 37° C EN BAÑO SEROLÓGICO								
LECTURA								

4.5.5 Interpretación de los controles de la prueba

La lectura final se realizó cuando en los controles anticomplementarios, Ag, Ag-Ac y SH se observó la reacción esperada para cada caso. En el cuadro 8 se muestra la interpretación de los controles utilizados en la prueba de FC al 100% de hemólisis y en el cuadro 9 se muestran los controles utilizados en la técnica de FC al 50% de hemólisis.

Cuadro 9. Interpretación de controles de la prueba de FC al 100% de hemólisis

Control de antígeno (Ag)	Debe observarse sedimentación
Control de Antígeno-Complemento (Ag-C)	Debe observarse hemólisis
Control de Complemento (C)	Debe observarse hemólisis
Control de Sistema hemolítico (SH)	Debe observarse sedimentación

Cuadro 10. Interpretación de controles de la prueba de FC al 50% de hemólisis

Control de antígeno (Ag)	Debe observarse sedimentación
Control de Antígeno-Complemento (Ag-C)	Debe observarse hemólisis
Control de Sistema hemolítico (SH)	Debe observarse sedimentación
Control de Complemento (C)	Debe observarse hemólisis
Control de Complemento -I dilución	Debe observarse hemólisis
Control de Complemento -II dilución	Debe observarse hemólisis
Control de Complemento -III dilución	Debe observarse hemólisis
Control de glóbulos rojos	Debe observarse sedimentación

4.5.6 Interpretación de la lectura

Para cada una de las muestras se determinó su título, el cual es la última dilución en la que se observó reacción positiva con base en lo siguiente:

- ✓ **Reacción positiva:** habrá una reacción Ag-Ac-complemento, por lo tanto el complemento no será capaz de unirse al sistema hemolítico (segundo sistema Ag-Ac), observándose sedimentación de éste.
- ✓ **Reacción negativa:** el suero no tiene anticuerpos contra el antígeno, por lo tanto el complemento quedará libre y será capaz de unirse al segundo sistema antígeno-anticuerpo (sistema hemolítico), produciéndose una hemólisis de dicho sistema.

4.5.7 Interpretación de resultados

Con base en lo establecido en la NOM-056-ZOO-1995 y la NOM-041-ZOO-1995 así como de acuerdo a los autores Dájer *et al.* (1995), Yohannes *et al.*, (2012), Díaz *et al.* (2001) y Martínez *et al.* (2009), se consideraron como:

- ✓ **Positivo a brucelosis:** un suero positivo a brucelosis en bovino cuando exista un título $\geq 1:10$; así como un punto de corte un suero positivo a brucelosis en caprinos cuando exista un título $\geq 1:8$.
- ✓ **Negativo a brucelosis:** aquel suero de bovino que presente un título $< 1:5$ y para caprinos $< 1:4$

4.6 Análisis de la información

Para definir la validez y confiabilidad de la prueba de FC al 100% de hemólisis, se utilizaron metodologías de análisis para tablas de contingencia como lo describe Greenberg (2005), considerando como Gold Standard la técnica de FC al 50% de hemólisis, ya que estudios previos por Dájer (1995), Bustamante (2000), Martínez (2009) y Yohannes *et al.*, (2012) mencionan que esta técnica es altamente sensible y específica, ideal para confirmar el diagnóstico serológico de brucelosis; además de ser la prueba estandarizada y utilizada por la NOM-056-ZOO-1995.

La tabla de contingencia es como se muestra a continuación:

		Estandar de oro	
		Positivo	Negativo
Resultado de la Medición "X"	Positivo	a	b
	Negativo	c	d

a: Verdaderos positivos

b: Falsos positivos

c: Falsos negativos

d: Verdaderos negativos

Permitiendo así calcular los siguientes valores

- Sensibilidad Relativa (SR), capacidad de la prueba para detectar verdaderos enfermos.

$$SR = a/(a+c)$$

- Especificidad Relativa (ER); permite identificar hasta que punto es buena la prueba de FC al 100% de hemólisis para identificar a aquellos animales sin la enfermedad.

$$ER = d/(b+d)$$

- Valor Predictivo Positivo (VPP); se refiere a la probabilidad de que un animal con resultado positivo tenga en realidad la enfermedad determinada por el estandar de oro.

$$VPP = a/(a+b)$$

- Valor Predictivo Negativo (VPN); probabilidad de que un animal con resultado negativo no tenga en realidad la enfermedad de acuerdo al estandar de oro.

$$VPN = d/(c+d)$$

- Eficiencia Global (EG); se refiere al porcentaje de animales clasificados correctamente por la prueba.

$$EG = (a+d) / (a+b+c+d)$$

Para determinar la SR, ER y EG de los títulos obtenidos en la técnica de FC al 100% de hemolisis, tanto de bovinos como de caprinos, se les asigno un valor representativo:

- de "1" a todos los sueros que tuvieron un título $\geq 1:10$ en el caso de bovinos y $\geq 1:8$ para caprinos,
- mientras que los sueros considerados negativos se les dio un valor representativo de "0"

Se determinó la concordancia entre la técnica de FC al 100% y la técnica de FC al 50% através del estadístico de Kappa y su significancia estadística (Cerdeña y Villarroel, 2008). El índice Kappa resume la concordancia entre dos medidas de una variable, cuando está en escala cualitativa, eliminando la fracción de concordancia debida al azar.

Para el caso de una medida dicotómica:

$$Kappa = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

$$P_o = (a + d) / N$$

$$P_e = \frac{(a + b)}{N} \times \frac{(a + c)}{N} + \frac{(c + d)}{N} \times \frac{(b + d)}{N}$$

Donde:

P_o : Proporción total de concordancia observada.

P_e : Proporción de concordancia esperada por azar.

De acuerdo a la concordancia obtenida Kappa se consideran los resultados de la siguiente manera:

Cuadro 11. Valores de concordancia de Kappa.
(Cerdea y Villarroel, 2008)

Concordancia	
Muy débil	Inferiores a 0.20
Débil	Entre 0.21 y 0.40
Moderada	Entre 0.41 y 0.60
Buena	Entre 0.61 y 0.80
Muy buena	Si es superior a 0.80

Se utilizó una hoja de cálculo de Excel Windows® para poder llevar a cabo los cálculos anteriormente mencionados, así como el paquete estadístico JMP Versión 12.0 (SAS Institute, Inc., 2015).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados de las pruebas realizadas en los sueros de bovino

Todos los sueros fueron evaluados con metodologías descritas en este trabajo.

Prueba de Tarjeta: en la cual se tomó como resultado positivo aquellos sueros cuyas reacciones presentaron cualquier grado de aglutinación (NOM-056-ZOO-1995; NOM-041-ZOO-1995; Díaz *et al.*, 1999).

Del total de muestras obtenidas y analizadas (456) con la prueba de tarjeta al 8%, 198 resultaron positivas y 258 negativas. Las muestras que contaban con

resultados previos de positividad, mostraron títulos similares es decir, sólo hubo una dilución de diferencia con respecto al reportado, dichos resultados se muestran en los anexos 1, 2 y 3; mientras que las muestras con antecedente de hato libre fueron en todo momento negativas. Por otro lado los sueros procedentes de Pénjamo Gto, Colón y Tequisquiapan Qro, resultaron negativos y dado que no hay mayor dato que reportar, dichos resultados no se muestran en este trabajo.

Prueba de rivanol: se consideraron como positivos aquellos sueros que presentaron aglutinación a partir de la dilución 1:25. Tomando como criterio lo descrito por Peniche *et al.*, (2009) y Mejía y Lemus (2012), los cuales consideraron que este valor es útil cuando se trabaja con individuos que no han sido vacunados, a demás de ser un criterio de positividad de acuerdo a la normatividad vigente (NOM-041-ZOO-1995). En esta prueba, del total de sueros analizados (456), 212 presentaron títulos de anticuerpos. En el cuadro 12 se muestran los diferentes títulos obtenidos en esta prueba.

Cuadro 12. Número de muestras de sueros de bovino de acuerdo al título obtenido en la prueba de Rivanol.

Título	Ninguno	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
Núm de Muestras	244	18	30	29	38	97

5.2 Resultados de las pruebas realizadas en sueros de caprino

Las muestras obtenidas de ganado caprino (346), fueron analizadas con la prueba de tarjeta al 3%.

Prueba de tarjeta: del total de muestras trabajadas (346) con la prueba de tarjeta al 3% 100 resultaron positivas y 246 negativas.

5.3 Resultados de la prueba de FC

Independientemente de los resultados obtenidos en las pruebas de tarjeta al 3% y 8% así como la prueba de rivanol, se realizó la prueba de FC al 50% y 100% de hemólisis a todas las muestras, tanto de ganado bovino como caprino.

5.3.1 Resultados de la Técnica al 50% de hemólisis

Bovinos: Del total de sueros obtenidos (456) se trabajó con la técnica de FC al 50% de hemólisis y con base en los criterios de interpretación mencionados en el numeral 4.4.6, 192 muestras fueron positivas, mientras que 264 resultaron negativas.

Caprinos: Del total de sueros obtenidos (346) se trabajó la técnica de FC al 50% de hemólisis, 100 muestras presentaron títulos de anticuerpos de las cuales 96 presentaron títulos consideradas como positivas, mientras que 250 muestras resultaron negativas.

5.3.2 Resultados de la prueba de FC al 100% de hemólisis

Bovinos: Del total de sueros obtenidos (456) que fueron sometidos a la técnica de FC al 100% de hemólisis, 198 fueron positivos, mientras que 258 resultaron negativos.

Caprinos: Del total de sueros obtenidos (346), 93 sueros fueron positivos, mientras que 253 muestras resultaron negativas.

5.4 Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico se realizaron tablas de contingencia como se muestra en el Cuadro 13 en el caso de bovinos y Cuadro 14 en el caso de caprinos; en los cuales se compararon los resultados de ambas técnicas para determinar el VPP, el VPN, la SR, la ER y la EG.

Bovinos: la técnica de FC al 100% mostró tener una sensibilidad de 98.44% y una especificidad de la prueba de 96.59%.

El VPP de la prueba de FC al 100% de hemólisis en bovinos fue de 0.9545 que quiere decir que de un total de 198 animales que fueron diagnosticados como positivos, el 95.45% fueron correctamente diagnosticados por la prueba, mientras que el VPN fue de 0.9884 lo cual quiere decir, que de un total de 258 animales diagnosticados como negativos el 98.84% de los animales fueron correctamente diagnosticados como sanos por la prueba.

La EG de técnica de FC al 100% de hemólisis fue de 97.37%, lo cual quiere decir que dicha prueba tiene un 97.37% de efectividad para clasificar correctamente a los animales entre positivos y negativos.

Cuadro 13. Comparación de los resultados de las pruebas de Fijación de Complemento en muestras de ganado bovino.

		Resultados de la técnica de FC al 50% de hemólisis		
		Positivo	Negativo	Total
Resultados de la técnica de FC al 100% de hemólisis	Positivo	189	9	198
	Negativo	3	255	258
	Total	192	264	456

Caprinos: la técnica de FC al 100% mostró tener una sensibilidad de 93.75% y una especificidad del 98%.

El VPP de la prueba de FC al 100% de hemólisis en caprinos fue de 0.9677 que quiere decir que de un total de 93 animales que fueron diagnosticados como positivos, el 96.77% de los animales enfermos correctamente diagnosticados por la prueba. En cambio el VPN quiere decir que de un total de 253 animales diagnosticados como negativos, el 97.62% de los animales fueron correctamente diagnosticados como sanos por la prueba.

La EG de la técnica de FC al 100% de hemólisis tiene la capacidad de diferenciar en un 97.39% correctamente a animales enfermos de sanos.

Cuadro 14. Comparación de los resultados de las pruebas de Fijación de Complemento en muestras de ganado caprino.

Resultados de la técnica de FC al 100% de hemólisis		Resultados de la prueba de FC al 50% de hemólisis		Total
		Positivo	Negativo	
Positivo		90	3	93
Negativo		6	247	253
	Total	96	250	346

Coeficiente Kappa

Se determinó la concordancia que existe entre ambas técnicas de acuerdo a la especie por medio del coeficiente Kappa (Crewson, 2005). La magnitud de concordancia de ambas técnicas de Fijación de Complemento es de 0.989 ($p < 0.01$) para el caso de bovinos y 0.978 ($p < 0.01$) para caprinos, lo cual según Landis y Koch (1977) ambas corresponden a una fuerza de concordancia “Muy Buena”.

5 DISCUSIÓN

El diagnóstico oportuno y confiable de las zoonosis es una prioridad para el éxito de cualquier política o acción dirigida a su prevención y control. En el caso del control y erradicación de brucelosis existen diversas pruebas de laboratorio, que a excepción del aislamiento ninguna es totalmente efectiva (Díaz *et al.*, 2001), sin embargo aislar el agente es un verdadero reto en la práctica, ya que las bacterias del género *Brucella* son exigentes en su desarrollo sin mencionar, que el medio de cultivo debe ser específico y el desarrollo debe llevarse a cabo a una temperatura y condiciones de CO₂ determinadas, aunque pueden utilizarse medios bacteriológicos convencionales para su aislamiento, no es recomendable ya que existe el riesgo de contaminación con otro tipo de bacterias, debido a su lento crecimiento (Corbel y Morgan 1982; Díaz *et al.*, 2002) y por último se requiere encontrar al animal en estado de bacteremia y esto es difícil aún en casos de abortos. (Yohannes *et al.*, 2012). Por otro lado, existen pruebas serológicas, pero estas deben utilizarse siempre con pruebas complementarias. Como la prueba de

tarjeta, una prueba cualitativa usada tanto en bovinos como en caprinos. Esta no puede ser la única herramienta con la cual se determine el estado de salud o enfermedad del animal, ya que como lo mencionan Yohannes *et al.*, (2012) tiene una sensibilidad de 82.6% y una especificidad de 77.6% con respecto a la prueba de FC, recomendando en dicho estudio que el diagnóstico de brucelosis por medio de pruebas serológicas, debe realizarse con dos o más pruebas. Por su parte Dájer (1995), menciona que la prueba de tarjeta es altamente sensible pero poco específica (38%) sobre todo si hay antecedentes de vacunación. La prueba de rivanol resulta ser también una prueba confirmatoria ya que tiene una sensibilidad de 86% (Dájer *et al.*, 1995), sin embargo en aquellos resultados en los que el título es bajo se mantiene la incertidumbre de ser realmente un animal infectado o solo presenta anticuerpos por exposición. (Cantú *et al.*, 2007). La prueba de FC ha mostrado ser una herramienta útil en el diagnóstico de brucelosis animal y es lo más cercano a una prueba serológica perfecta, ya que es capaz de detectar cuantitativamente anticuerpos producidos por una infección. Es importante no perder de vista el calendario de vacunación de los animales (en caso de que fueran vacunados), para la interpretación de los resultados. Deberá tomarse en cuenta la edad de aplicación, el tipo de vacuna y fecha de aplicación de la misma, con respecto a la toma de la muestra sérica, ya que el título de anticuerpos puede estar influenciado por este factor, pudiendo interpretarse como sueros positivos y ser realmente negativos.

Con base en las diferencias encontradas entre las técnicas de FC que llevan a cabo los diferentes laboratorios autorizados en el país y, a que no se han realizado estudios del comportamiento de un suero sometido a ambas técnicas, el presente trabajo se realizó para determinar la concordancia entre las técnicas de FC, dando como resultado que dicha concordancia es buena, es decir la técnica de FC al 100% de hemólisis arroja resultados muy similares a los que arrojaría la técnica al 50% de hemólisis si se realizaran ambas técnicas a una misma muestra serológica, lo cual la hace una técnica confiable. Además se pudo determinar la SR y la ER de la técnica de FC al 100% de hemólisis en el diagnóstico serológico de brucelosis. Los resultados obtenidos indican que esta técnica tiene una SR de

98.44% y una ER del 96.59% para el diagnóstico de brucelosis en bovinos. El diagnóstico por medio de la técnica de FC al 50% ha sido estudiado por diversos investigadores de varios países como Dájer *et al.* (1995), quienes determinaron una SR de 86% y una ER de 100% en el diagnóstico de brucelosis en ganado bovino, Yohannes *et al.* (2012), mencionan que la prueba de FC tiene una SR de 82.6% y una ER de 77.6%; en el caso de ganado caprino, los resultados indican una SR de 96.88% y una ER de 100% en el diagnóstico de brucelosis, Nielsen (2002), refiere una sensibilidad de 97% y una especificidad del 100%, los cuales no representan una diferencia significativa con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, lo que demuestra que el título de un suero que es sometido a cualquiera de las dos técnicas, caerá dentro del mismo rango de interpretación que marca la normatividad vigente.

En México existen 110 laboratorios que realizan el diagnóstico de brucelosis, pero únicamente 13 laboratorios realizan la prueba de FC, de éstos siete realizan la técnica al 50% de hemólisis y seis laboratorios la técnica al 100% de hemólisis. El hecho de que sean pocos los laboratorios que realizan la prueba de FC en cualquiera de sus modalidades se debe a que se requiere de personal capacitado para favorecer la confiabilidad de los resultados emitidos por los laboratorios. Sin embargo en el presente estudio se pudo confirmar que la técnica al 100% de hemólisis es mucho más fácil de implementar, ya que la metodología para la estandarización de los reactivos como el complemento y la hemolisina, es más sencilla de realizar que la definida en la técnica al 50% de hemólisis, además para la obtención de resultados en la estandarización de ésta técnica se requiere el uso de papel logarítmico encontrándose el inconveniente que en las zonas donde se trabajó (Querétaro, Estado de México y Distrito Federal) ya no es factible encontrar este tipo de papel por lo que se usan copias fotostáticas de una hoja que tienen como reserva los laboratorios, en cambio en la técnica al 100% de hemólisis se utiliza el título obtenido tanto en el complemento como en la hemolisina y por medio de reglas de tres, se obtiene la dilución en la que se encuentran las 2 Unidades de Complemento y Hemolisina. Finalmente en la técnica al 50% de hemólisis para determinar la concentración de hemolisina y de

complemento, se utilizan concentraciones de hemoglobina estandarizadas, lo cual no es de fácil adquisición para la mayoría de los laboratorios, además de representar un gasto extra en comparación con la técnica del 100% de hemólisis.

6 CONCLUSIÓN

El presente estudio confirma que la prueba de FC al 100% es tan efectiva y confiable para el diagnóstico de brucelosis como la técnica de FC al 50% de hemólisis, tanto en bovinos como caprinos y aunque sigue siendo una prueba compleja, la técnica al 100% de hemólisis se puede considerar más sencilla y confiable dejando la oportunidad a que más laboratorios puedan implementar esta herramienta de diagnóstico.

7 REFERENCIAS

- Adams LG. 2002. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4):553–561.
- Alton G, Jones LM, Pietz DE. 1988. *Laboratory techniques in brucellosis* Second edi., FAO.
- Blasco JM. 2010. Control and eradication strategies for brucella melitensis infection in sheep and goats. *Sec. Biol. Med. Sci*, 165:145–165.
- Bustamante Sánchez, J. et al., 2000. Estudio Bacteriológico Y Serológico De Brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de Brucella abortus. *INIFAP*, (5).
- Cantú A, Aguilar R, Díaz AE, Favila H, Herrera LE, Morales A, Palomares R, Samtillán F. 2007. Estudio epidemiológico de un hato bovino con prevalencia media de brucelosis, vacunado con las mutantes rugosas de. *Group*, 38(2):197–206.
- Carvalho NAV, Mol PSJ, Xavier MN, Paixao TA, Lage AP, Santos RL. 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, 184(2):146–155. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023309001518>.
- Castro HA, González SR, y Prat M. 2005. Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 39(2):203–216.
- Cerda LJ y Villarroel PL. 2008. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1):54–58.
- Chertorivski WS, Kuri MPA. y Fejardo DGE. 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiologica de la Brucelosis. *Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiologica de la Brucelosis*, 41.

- Chothe SK. y Saxena HM. 2014. Innovative modifications to Rose Bengal plate test enhance its specificity, sensitivity and predictive value in the diagnosis of brucellosis. *Journal of Microbiological Methods*, 97:25–8. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.005>
- Cobos M. L.; Vicencio M.M. (2005) Prueba de Fijación de Complemento Directa. En: Cobos M. L.; Castañeda R. E.; Vicencio M. M.; Martínez G. D. Manual de prácticas de laboratorio de inmunología. México DF, UNAM, 103–109.
- Corona V J.(2007) Estandarización de las pruebas de fijación de complemento y aglutinación indirecta para el diagnóstico de micoplasmosis caprinas asociadas a problemas respiratorios en México Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Comerci DJ. 2002. *Factores de virulencia en Brucella abortus: caracterización del sistema VirB y su rol en la colonización de la célula huésped. Desarrollo de un sistema de expresión de proteínas recombinantes en Brucella abortus S-19.* Tesis Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología. Universidad Nacional de General San Martín.
- Corbel MJ, Morgan W. 1982. Clasificación del género Brucella: situación presente. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 1(1):301–310.
- Crewson PE. 2005. Fundamentals of Clinical Research for Radiologists. *American journal of roentgenology*, 184:1391–1397.
- Cunningham CH. 1971. Virología Práctica 6ª ed. España: Acribia
- Currier RW. 1925. Brucellosis History Summary.1–2. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/Brucellosis%20History%20Abstract_Currier.pdf
- Dájer AA, Gutiérrez REJ, Zapata DV, Honhold N, Villegas PL. 1995. Comparación de cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra Brucella abortus y reporte preliminar del porcentaje de reactores positivos en hatos bovinos en Yucatán. *Rev. Biomed*, 6(2):84–90.

- Diacovich L, y Gorvel JP. 2010. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature reviews. Microbiology*, 8(2):117–128. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2295>.
- Diario Oficial de la Federación. NOM-022-SSA2-1994. Norma Oficial Mexicana. Para la prevención y control de brucelosis en el hombre. México DF: SAGARPA. 30 de noviembre de 1995. [Citado 2015 agosto 8]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/022ssa24.html>
- Diario Oficial de la Federación. NOM-041-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana. Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales. México DF: SAGARPA. 20 de agosto de 1996. [Citado 2015 agosto 8]. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=506>
- Diario Oficial de la Federación. NOM-056-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobadas en materia zoosanitaria. México DF: SAGARPA. 13 de octubre de 1997. [Citado 2015 agosto 8]. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=506>
- Díaz EL, Hernández G, Valero. 2001. Diagnóstico de brucelosis animal. INIFAP-SAGARPA. México. ISBN970-92493-0-4.
- Díaz AE, Blasco MJM, Suárez GF. 1999. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Rev Vet Méx*, 30: 307–311.
- Doganay GD y Doganay M. 2013. Brucella as a potential agent of bioterrorism. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 8:27–33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934672>.
- Ficht, T. 2011. Brucella taxonomy and evolution. *Future microbiology*, 5(6):859–866. doi:10.2217/fmb.10.52
- García JG, Ramírez BE, Hernández VM, Hernández CLM, Díaz AE, Orozco BH. 2014. Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala. *Salud*

pública de México, 56(4):355–362.

Greenberg RS, Stephen R, Flanders W, William J. 2005. Epidemiología médica, Ed. Manual Moderno, 4° Edición, México.

Hennanger S. 2011 Prueba de Fijación de Complemento Para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*. Laboratorios de Servicios Veterinarios Nacional (NVLS) SEROPRO1022.07

Hernández ÁM, Garrido LM, López MS. 2000. Diseño de estudios epidemiológicos. *salud pública de México*, 42(2):144-149.

Landis J, Koch G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159-74.

Martínez HDI, Ramírez RPN, Hernández MY, Romero SD, Robledo SML, Flores CR, Morales AJF, Barradas PFT. 2009. Protección contra brucelosis en cabras vacunadas con cepa RB51 en diferentes operativos en Tenextepec, Municipio de Perote, Veracruz. *Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano*, 383–390.

Martínez RE. y Martínez RJC. 2002. Brucella. In Ahidé López Merino, ed. *microbios en línea*. México D.F, pp. 1–22. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap7/>.

Mejía MK, y Lemus FC. 2012. Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con elisa para el diagnóstico de brucelosis bovina. *Revista Electronica de Veterinaria*, 13(2):1–14.

[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2015. *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos , aves y abejas)* Volumen I. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVIN_E_BRUCELL.pdf

Peniche CAE, Martínez HDI, Barradas PFT, Franco ZJL, Molina SB, Gutiérrez RE,

- Williams JJ, Morales ÁF, Flores CR. 2009. Eficacia vacunal de las cepas rb51 y s19 de *Brucella abortus* en hatos naturalmente infectados con brucelosis en áreas tropicales del sur de Veracruz, México. *Avances en la investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano*. 371–382.
- Plommet M, y Plommet AM. 1988. Virulence of *Brucella*: bacterial growth and decline in mice. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 19(1):65–67. <hal-00901787>
- Rahman MS, Uddin MJ, Park J, Chae J, Rahman MB, Islam MA. 2006. A Short History of Brucellosis: Special Emphasis in Bangladesh. *Bangl. J. Vet. Med.* 4(1):1–6.
- Ritchie JA. 2011. *Brucella abortus intracellular survival and intercellular trafficking*. Tesis Iowa State University. 10162.
- Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. 2006. *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids. *Arch Med Vet* 38(1):7–18. ISI>://WOS:000237274500002.
- Romero SH, Iregui CA. 2010. El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19:37–45.
- [SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Laboratorios de diagnóstico y constatación. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2563>. [13 de mayo 2015].
- [SENASICA] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación Actual de la Campaña nacional contra la Brucelosis en los animales. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4414>.
- Sbriglio JL, Sbriglio H, Sainz BS. 2007. Una patología generalmente subdiagnosticada la producción pecuaria y desarrollo de nuestros. *Rev Bioanálisis*, 18–22.

- Spickler AR. 2009. Brucelosis. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucellosis-es.pdf>. [consulta 12 mayo 2015].
- Vega LCA, Ariza A R, Rodríguez WF. 2008. Brucelosis. Una infección vigente. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 6(4):158–165.
- Vitry MA, Hanot MD, Trez C, Akira S, Ryffel B, Letsson JJ, Muraille E. 2014. Humoral Immunity and CD4+ Th1 Cells Are Both Necessary for a Fully Protective Immune Response upon Secondary Infection with *Brucella melitensis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192:3740–52. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/192/8/3740.full>.
- Wyatt HV. 2005. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *J R Soc Med*, 98:451–454.
- Wyatt HV, 2013. Lessons from the history of brucellosis Goats and the Royal Navy : the silent service Goats and Themistocles Zammit. , 32(1):17–25.
- Xavier MN, Costa ÉA, Paixão TA, & Santos RL. 2009. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciencia Rural*, 39(7):2252–2260. doi:10.1590/S0103-84782009005000167
- Yohannes M, Gill JPS, Ghatak S, Singh DK, Tolosa T. 2012. Comparative evaluation of the Rose Bengal plate test, standard tube agglutination test and complement fixation test for the diagnosis of human brucellosis. *Rev. sci. tech. Off int. Epiz.*, 2012, 31 (3):979–84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23520751>.

Anexo 1. Sueros de bovino con antecedentes de positividad, procedentes del resguardo del Laboratorio de Patología Animal de Calamanda, Querétaro.

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
1	Positivo	1:25	1:10	1:10
2	Positivo	1:400	1:320	1:320
3	Positivo	1:400	1:160	1:160
4	Positivo	1:400	1:80	1:40
5	Positivo	1:200	1:80	1:40
6	Positivo	Negativo	1:40	1:10
7	Positivo	1:25	1:10	1:10
8	Positivo	1:400	1:320	320
9	Positivo	1:400	1:160	1:160
10	Positivo	1:400	1:80	1:40
11	Positivo	1:200	1:80	1:40
12	Positivo	1:200	1:40	1:20
13	Positivo	1:200	1:20	1:20
14	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Positivo	1:400	1:80	1:80
16	Positivo	1:400	1:80	1:80
17	Positivo	1:400	1:80	1:40
18	Positivo	1:400	1:320	1:320
19	Positivo	1:400	1:20	1:20
20	Positivo	1:25	1:40	1:20
21	Positivo	1:400	1:160	1:320
22	Positivo	1:400	1:40	1:40
23	Positivo	1:400	1:160	1:160
24	Positivo	1:400	1:320	1:320
25	Positivo	1:400	1:160	1:160
26	Positivo	1:400	1:320	1:160
27	Positivo	1:400	1:160	1:320
28	Positivo	1:100	1:20	1:20
29	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
30	Positivo	1:100	1:40	1:20
31	Positivo	1:200	1:40	1:80
32	Positivo	1:400	1:320	1:320
33	Positivo	1:400	1:160	1:320
34	Positivo	1:400	1:160	1:320
35	Positivo	1:200	1:320	1:320
36	Positivo	1:400	1:320	1:320
37	Positivo	1:400	1:320	1:160
38	Positivo	1:400	1:80	1:80
39	Positivo	1:400	1:160	1:160
40	Positivo	1:100	1:40	1:20
41	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
42	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
43	Positivo	1:400	1:320	1:160
44	Positivo	1:50	1:80	1:10

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
45	Positivo	1:400	1:160	1:160
46	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
47	Positivo	1:200	1:160	1:320
48	Positivo	1:400	1:80	1:80
49	Positivo	1:400	1:320	1:320
50	Positivo	1:400	1:320	1:320
51	Positivo	1:200	1:20	1:20
52	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
53	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
54	Positivo	1:400	1:320	1:320
55	Positivo	1:200	Negativo	Negativo
56	Positivo	1:200	Negativo	1:10
57	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
58	Positivo	1:400	1:320	1:320
59	Positivo	1:400	1:320	1:320
60	Positivo	1:400	10	1:10
61	Positivo	1:400	160	1:320
62	Positivo	1:400	320	320
63	Positivo	1:400	1:160	1:160
64	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
65	Positivo	1:400	1:80	1:80
66	Positivo	1:400	1:320	1:80
1:8067	Positivo	1:400	1:80	1:80
68	Positivo	1:400	1:80	1:80
69	Positivo	1:400	1:80	1:80
70	Positivo	1:400	1:160	1:80
71	Positivo	1:400	1:320	1:320
72	Positivo	1:400	1:80	1:80
73	Positivo	1:400	1:80	1:80
74	Positivo	1:200	1:40	1:20
75	Positivo	1:400	1:160	1:160
76	Positivo	1:200	1:80	1:40
77	Positivo	1:200	1:40	1:20
78	Positivo	1:400	1:160	1:160
79	Posotivo	1:200	1:40	1:20
80	Positivo	1:400	1:320	1:320

Anexo 2. Resultados de sueros de bovino con antecedentes de positividad, procedentes del resguardo del Laboratorio de Serología del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA).

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
221	Positivo	1:400	1:80	1:80
222	Positivo	1:400	1:160	1:160
223	Positivo	1:400	1:320	1:320
224	Positivo	1:400	1:160	1:160
225	Positivo	1:100	1:20	1:20
226	Positivo	1:50	1:10	1:10
227	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
228	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
229	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
230	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
231	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
232	Positivo	1:200	10	160
233	Positivo	1:400	Negativo	1:80
234	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
235	Positivo	1:50	1:40	1:160
236	Positivo	1:400	1:160	1:320
237	Positivo	1:200	1:80	1:320
238	Positivo	1:400	1:80	1:40
239	Positivo	Negativo	1:40	1:320
240	Positivo	1:400	1:160	1:160
241	Positivo	1:50	1:20	1:160
242	Positivo	1:100	1:10	1:320
243	Positivo	1:100	1:160	1:40
244	Positivo	1:100	1:160	1:160
245	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
246	Positivo	1:400	1:160	1:320
247	Positivo	1:50	1:320	1:320
248	Positivo	1:400	1:320	1:320
249	Positivo	1:400	1:160	1:320
250	Positivo	100	1:20	1:40
251	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
252	Positivo	Negativo	1:20	1:40
253	Positivo	1:400	1:320	1:320
254	Positivo	1:400	1:320	1:320
255	Positivo	1:400	1:320	1:320
256	Positivo	1:400	1:320	1:320
257	Positivo	1:400	1:1600	1:320
258	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
259	Positivo	100	1:40	1:80
260	Positivo	1:200	1:40	1:160
261	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
262	Positivo	1:400	1:160	1:320
263	Positivo	100	1:40	1:160
264	Positivo	100	1:80	1:160
265	Positivo	1:400	1:160	1:320

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
266	Positivo	1:400	1:320	1:320
267	Positivo	1:200	1:160	1:160
268	Positivo	1:400	1:160	1:320
269	Positivo	1:100	1:160	1:320
270	Positivo	1:100	1:80	1:160
271	Positivo	1:200	1:160	1:320
272	Positivo	1:200	1:80	1:320
273	Positivo	1:100	1:160	1:320
274	Positivo	1:50	1:40	1:80
275	Positivo	1:200	1:160	1:320
276	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
277	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
278	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
279	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
280	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
281	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
282	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
283	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
284	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
285	Positivo	1:400	1:160	1:80
286	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
287	Positivo	1:200	1:80	1:80
288	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
289	Positivo	Negativo	Negativo	1:20
290	Positivo	Negativo	Negativo	1:20
291	Positivo	Negativo	Negativo	1:10
292	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
293	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
294	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
295	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
296	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
297	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
298	Positivo	1:100	Negativo	Negativo
299	Positivo	1:400	1:320	1:320
300	Positivo	1:400	1:320	1:320
301	Positivo	1:200	1:40	1:40
302	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
303	Positivo	1:100	1:40	1:40
304	Positivo	1:400	1:320	1:320
305	Positivo	1:100	1:320	1:320
306	Positivo	1:400	1:80	1:80
307	Positivo	1:100	1:160	1:160
308	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
309	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
310	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
311	Positivo	Negativo	1:10	1:10
312	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
313	Positivo	1:400	1:160	1:160
314	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
315	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
316	Positivo	1:400	1:40	1:40
317	Positivo	1:200	1:80	1:160
318	Positivo	1:50	1:20	1:20
319	Positivo	1:25	1:10	1:10
320	Positivo	1:400	Negativo	1:10

ANEXO 3. Resultados de sueros de bovino con antecedentes de positividad, procedentes del resguardo del Laboratorio de Serología de la Unidad de Servicios de Diagnóstico (USEDICO), FMVZ. UNAM. Tequisquiapan, Querétaro.

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
321	Positivo	1:400	1:320	1:320
322	Positivo	1:400	1:320	1:320
323	Positivo	1:400	1:80	1:320
324	Positivo	1:400	1:160	1:320
325	Positivo	1:200	1:80	1:320
326	Positivo	1:400	1:160	1:320
327	Positivo	1:400	1:160	1:320
328	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
329	Positivo	1:400	Negativo	Negativo
330	Positivo	1:50	Negativo	Negativo
331	Positivo	1:200	1:320	320
332	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
333	Positivo	100	Negativo	Negativo
334	Positivo	Negativo	1:20	1:40
335	Positivo	1:50	1:80	1:80
336	Positivo	Negativo	1:20	Negativo
337	Positivo	1:400	1:40	1:40
338	Positivo	1:50	1:40	1:40
339	Positivo	1:200	1:80	1:80
340	Positivo	1:400	1:80	1:40
341	Positivo	Negativo	1:40	1:40
342	Positivo	1:400	1:320	1:320
343	Positivo	1:400	1:320	1:320
344	Positivo	100	1:40	1:160
345	Positivo	1:400	1:320	1:160
346	Positivo	1:50	1:320	1:320
347	Positivo	Negativo	1:320	1:320
348	Positivo	1:200	1:20	1:20
349	Positivo	1:400	1:320	1:320
350	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
351	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
352	Positivo	1:200	1:10	1:20
353	Positivo	1:50	1:10	1:10
354	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
355	Positivo	1:25	Negativo	Negativo
356	Positivo	1:200	1:320	1:320
357	Positivo	1:25	1:80	1:80
358	Positivo	1:200	1:20	1:10

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
359	Positivo	1:200	1:40	1:80
360	Positivo	1:400	1:320	1:320
361	Positivo	1:400	1:320	1:320
362	Positivo	1:50	1:80	1:160
363	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
364	Positivo	1:100	1:20	1:20
365	Positivo	1:200	1:40	1:20
366	Positivo	1:400	1:160	1:160
367	Positivo	1:200	1:40	1:80
368	Positivo	1:200	1:320	1:320
369	Positivo	1:50	1:20	1:20
370	Positivo	1:200	1:160	1:160
371	Positivo	1:50	1:40	1:40
372	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
373	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
374	Positivo	1:400	1:320	1:320
375	Positivo	1:50	1:80	1:80
376	Positivo	Negativo	1:80	1:320
377	Positivo	Negativo	1:10	1:20
378	Positivo	1:100	1:160	1:160
379	Positivo	1:200	1:20	1:40
380	Positivo	Negativo	1:80	1:160
381	Positivo	Negativo	1:320	1:160
382	Positivo	1:100	1:80	1:40
383	Positivo	1:50	1:160	320
384	Positivo	Negativo	1:20	1:40
385	Positivo	1:100	1:320	320
386	Positivo	1:50	1:20	Negativo
387	Positivo	1:50	1:80	1:160
388	Positivo	1:400	1:320	1:320
389	Positivo	100	1:160	1:80
390	Positivo	1:100	1:80	1:80
391	Positivo	1:200	Negativo	1:80
392	Positivo	100	1:320	Negativo
393	Positivo	1:50	Negativo	1:10
394	Positivo	1:100	1:10	1:10
395	Positivo	1:400	1:320	1:320
396	Positivo	1:100	Negativo	1:160

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
397	Positivo	1:50	160	1:320
398	Positivo	1:25	1:20	1:20

Tubo	Tarjeta 8%	Rivanol	FC 50%	FC 100%
399	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
400	Positivo	1:50	Negativo	Negativo

Anexo 4. Resultados de sueros de caprino con antecedentes de positividad, procedentes del resguardo del Laboratorio General de Diagnóstico Angel Usabiaga Villanueva , Celaya, Guanajuato

Tubo	Tarjeta 3%	FC 50%	FC 100%
1	Positivo	1:32	1:32
2	Positivo	1:16	1:16
3	Positivo	1:64	1:32
4	Positivo	1:8	1:8
5	Positivo	1:8	1:8
6	Positivo	1:32	1:16
7	Positivo	1:16	1:8
8	Positivo	1:16	1:16
9	Positivo	1:16	1:16
10	Positivo	1:256	1:256
11	Positivo	1:8	1:8
12	Positivo	1:16	1:16
13	Positivo	128	1:64
14	Positivo	1:64	1:32
15	Positivo	1:8	1:8
16	Positivo	1:32	1:16
17	Positivo	1:8	1:8
18	Positivo	1:32	1:32
19	Positivo	1:32	1:32
20	Positivo	1:32	1:32
21	Positivo	1:8	1:8
22	Positivo	1:8	1:16
23	Positivo	1:16	1:16
24	Positivo	1:16	1:16
25	Positivo	1:32	1:32
26	Positivo	1:16	1:16
27	Positivo	1:16	1:16
28	Positivo	1:16	1:16
29	Positivo	1:8	1:8
30	Positivo	1:8	1:8
31	Positivo	1:8	1:8
32	Positivo	1:32	1:16
33	Positivo	16	1:16
34	Positivo	16	1:16

Tubo	Tarjeta 3%	FC 50%	FC 100%
35	Positivo	16	1:8
36	Positivo	1:32	1:16
37	Positivo	1:16	1:16
38	Positivo	1:64	1:32
39	Positivo	1:16	1:8
40	Positivo	1:8	1:8
41	Positivo	1:8	1:8
42	Positivo	1:8	1:8
43	Positivo	1:16	1:16
44	Positivo	1:16	1:16
45	Positivo	128	128
46	Positivo	1:8	1:8
47	Positivo	1:64	1:32
48	Positivo	128	128
49	Positivo	1:64	1:64
50	Positivo	1:16	1:16
51	Positivo	1:64	1:64
52	Positivo	1:64	1:128
53	Positivo	Negativo	Negativo
54	Positivo	128	128
55	Positivo	1:4	1:4
56	Positivo	1:8	1:8
57	Positivo	1:8	1:8
58	Positivo	1:32	1:32
59	Positivo	1:16	1:16
60	Positivo	1:8	1:8
61	Positivo	128	64
62	Positivo	1:8	1:8
63	Positivo	1:32	1:32
64	Positivo	1:8	1:8
65	Positivo	1:8	1:8
66	Positivo	1:8	1:8
67	Positivo	128	64
68	Positivo	1:16	1:16

69	Positivo	128	128
70	Positivo	1:32	1:32
Tubo	Tarjeta 3%	FC 50%	FC 100%
71	Positivo	1:32	1:32
72	Positivo	1:8	1:8
73	Positivo	1:32	1:32
74	Positivo	1:16	1:32
75	Positivo	1:8	1:8
76	Positivo	1:16	1:16
77	Positivo	1:8	1:8
78	Positivo	1:16	1:16
79	Positivo	1:32	1:32
80	Positivo	1:4	1:4
81	Positivo	1:32	16
82	Positivo	1:32	1:32
83	Positivo	1:8	1:8
84	Positivo	64	64

85	Positivo	16	16
Tubo	Tarjeta 3%	FC 50%	FC 100%
86	Positivo	1:8	1:8
87	Positivo	1:64	1:64
88	Positivo	1:4	1:4
89	Positivo	1:16	1:16
90	Positivo	8	8
91	Positivo	1:32	1:4
92	Positivo	1:8	1:8
93	Positivo	1:8	1:8
94	Positivo	1:8	1:8
95	Positivo	1:8	1:8
96	Positivo	1:8	1:8
97	Positivo	1:8	1:4
98	Positivo	1:8	1:4
99	Positivo	128	1:64
100	Positivo	1:8	1:8