



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Técnicas de diagnóstico para *Brucella abortus* aplicadas en un laboratorio de control de calidad de la leche, utilizando cuatro métodos (Rosa de bengala, rivanol, fluorescencia polarizada y anillo en leche) como parte del sistema de gestión de calidad en la industria de lácteos.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
MARIANA RAMÍREZ MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:
ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX. 2023



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.

Estoy convencido de que este día somos dueños de nuestro destino. que la tarea que se nos ha impuesto no es superior a nuestras fuerzas. que sus acometidas no están por encima de lo que puedo soportar. Mientras tengamos fe en nuestra causa y una indeclinable voluntad de vencer. la victoria estará a nuestro alcance".

Winston Churchill

Dedicatoria

Estoy convencida que cada persona tiene una razón de llegar a nuestras vidas y a lo largo de este camino me he encontrado acompañada de personas valiosas, sin ellas nada de esto sería posible.

Quiero dedicar este trabajo a las personas más importantes en mi vida.

A mis padres Patricia y Rodolfo quienes han dedicado su vida a ofrecerme lo mejor de cada uno de ellos, sobre todo me han enseñado el valor del esfuerzo y el trabajo, no me alcanzaría la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí, han sido parte fundamental en mi formación como persona y estoy feliz con la vida de tenerlos como padres.

A mi hermana Julieta quien ha sido mi compañera de aventuras desde la infancia, hemos compartido tantos momentos de felicidad y tristeza, pero siempre juntas.

A mi novio Crystian por ser mi compañero de vida y de aventuras, por su apoyo incondicional y su motivación para crecer y mejorar día a día en todo aspecto, por enseñarme que los sueños se hacen realidad siempre que luchas por ellos.

A la Maestra Andrea quien ha sido parte fundamental en mi formación como profesionista, gracias por su apoyo incondicional, por todos los conocimientos transmitidos siento una profunda admiración por usted, gracias por creer en mí.

A mis amigos Caro, Xóchitl, Giselle, Daniel, Eduardo y Alberto porque cada uno de ustedes me ha brindado tanta felicidad con cada momento compartido y grandes enseñanzas de vida, me encuentro muy agradecida de haber coincidido.

A Ana quien fue una mujer que nada le impidió luchar por sus sueños, espero que desde donde te encuentres estes muy orgullosa de mí y puedas ver que he logrado mi cometido. Te extraño siempre.

A mis profesores que han compartido su experiencia y sabiduría en cada clase impartida.

A la UNAM quien me acogió como estudiante desde hace muchos años, me permitió estudiar en sus aulas y ahora me permite finalizar una etapa académica más.

Índice

Introducción	1
Justificación	3
Objetivo general	4
Objetivos particulares	4
Descripción del desempeño profesional.....	5
Aspectos generales de mi desempeño como recién egresado de la Facultad	5
Estructura organizacional e inserción y funciones del laboratorio de control de calidad	7
Recepción de muestras.	11
Criterios de aceptación de muestras.	11
Criterios de rechazo de muestras.....	12
Sistema de gestión de calidad	13
Riesgos de la Brucelosis en la salud pública	15
Situación en México.	16
Prevención y Control de la Brucelosis.	17
Vacunas utilizadas en campaña en México.....	18
Técnicas de diagnóstico de Brucella en leche	20
Prueba de anillo en leche o Anillo de Bang	20
Técnicas de diagnóstico de Brucella en suero.....	24
Técnica de Tarjeta o Rosa de Bengala	24
Técnica de Rivanol.....	28
Ventajas y desventajas de las técnicas serológicas descritas.....	32
Fluorescencia polarizada.....	34
Seguimiento de muestras con resultado positivo a pruebas serológicas.....	40
Otras técnicas de diagnóstico.....	40
Prueba de fijación del complemento.....	41
Prueba de PCR multiplex	41
Prueba de ELISA.....	41

Medidas de prevención contra la Brucelosis en humanos como parte del control de calidad de la leche	43
Pasteurización	43
Limites permisibles de microorganismos y toxinas en leche cruda.....	44
Principales áreas de oportunidad detectadas en el área donde desempeñe mi función profesional.....	45
Conclusiones.	45
Glosario	47
Bibliografía.....	50

Índice de figuras.

Figura 1. Actividades desempeñadas en el laboratorio de control de calidad.....	7
Figura 2. Distribución de las áreas del laboratorio de serología.....	9
Figura 3. Diagrama de flujo disposición de RPBI.....	10
Figura 4. Descripción del proceso de recepción de muestras para análisis.....	11
Figura 5. Ejemplos de aceptación y rechazo de muestras hemolizadas.....	12
Figura 6. Ejemplos de criterios de rechazo y aceptación para muestras turbias y/o lipémicas.....	12
Figura 7. Campaña nacional contra la brucelosis en los animales.....	16
Figura 8. Vacuna RB51 y Cepa 19.	19
Figura 9. Presentación del frasco de ABA Test Leche para 650 pruebas.....	21
Figura 10. Diagrama de flujo anillo en leche	22
Figura 11. Apreciación de la interpretación de la prueba de anillo en leche para resultado negativo, 1+, 2+,3+, 4+	23
Figura 12. ABA Test Tarjeta al 8%.....	25
Figura 13. Prueba de Tarjeta/Rosa de bengala	25
Figura 14. Diagrama de flujo de Tarjeta o Rosa de bengala	27
Figura 15. Aba test Rivanol.....	28
Figura 16. Prueba de Rivanol	30
Figura 17. Diagrama de flujo de Rivanol.....	31
Figura 18. Fundamento de fluorescencia polarizada	34
Figura 19. Equipo SYNERGY 2.....	35
Figura 20. Placa de 96 pozos para la prueba de FP.....	36
Figura 21. Diagrama de flujo de fluorescencia polarizada.....	38
Figura 22. Algoritmo para el diagnóstico serológico de Brucelosis para muestras de suero.	39

Índice de tablas y gráficas.

Tabla 1. Residuos generados y contenedor correspondiente para su desecho	9
Tabla 2. Criterios de aceptación para la verificación de controles internos.	14
Tabla 3. Vigilancia epidemiológica de Brucelosis en humanos hasta la semana 30 del año 2022.....	17
Gráfica 1. Distribución Nacional del porcentaje de casos de Brucelosis en humanos reportados hasta la semana 30 del año 2022.....	17
Tabla 4. Número de vacas en el hato a probar.....	21
Tabla 5. Interpretación de la prueba de Anillo en Leche de acuerdo con el color del anillo y al color de la columna.....	23
Tabla 6. Preparación de diluciones para la interpretación de la prueba de Rivanol.	29
Tabla 7. Ventajas y desventajas que brinda la prueba de anillo en leche	32
Tabla 8. Ventajas y desventajas que brinda la prueba de Rosa de Bengala.....	33
Tabla 9. Ventajas y desventajas que brinda la prueba de Rivanol.	33
Tabla 10. Interpretación de los resultados de acuerdo con el valor obtenido por FP.	36
Tabla 11. Reactivos contenidos en el Kit de fluorescencia polarizada	37
Tabla 12. Temperatura y tiempo de procesos térmicos aplicados a la leche	43
Tabla 13. Límites máximos de microorganismos y toxinas para leche y sus derivados.....	44

Simbología y abreviaturas.

μL	Microlitros
mL	Mililitros
°C	Grados centígrados
ABA TEST	Antígeno para el diagnóstico de brucelosis animal
BQD	Bioquímica Diagnóstica
BRC	British Retail Consortium
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CENASA	Centro Nacional de Servicios de Diagnostico en Salud Animal
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FP	Fluorescencia Polarizada
g	Gramos
Id	Identificación
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”.
ISET	Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales
LAVE	Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica.
LESP	Laboratorios Estatales de Salud Pública
LNR	Laboratorio Nacional de Referencia
NIH	National Institutes of Health
NMX	Norma Mexicana

mP	miliP
NO ₃	Nitratos
NOM	Norma Oficial Mexicana
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal.
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Polisacárido de cadena O
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PRONABIVE	Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.
RPBI	Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos
RPM	Revoluciones Por Minuto
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SIS	Sistema de Información en Salud.
SUIVE	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Introducción

Hoy en día la Brucelosis sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial la cual genera grandes pérdidas para la Industria ganadera debido a que esta zoonosis tiene como consecuencia la generación de abortos en hembras preñadas, la disminución de productividad de leche y problemas de fertilidad en machos, además de que los animales enfermos diseminan rápidamente la enfermedad en animales sanos.¹

La Brucelosis es una patología causada por la bacteria del género *Brucella spp* las cuales son bacilos Gram (-) inmóviles y aerobios estrictos, son de crecimiento lento no forman esporas ni poseen cápsula; tienen metabolismo oxidativo porque utilizan los NO₃ como aceptores de electrones, son catalasa y oxidasa positivo y en general no fermentan los azúcares.² Hasta el momento se incluyen 10 especies de *Brucella* en función de sus características antigénicas y su hospedador, aunque algunas especies tienen más de uno, la principal causante de dañar al ganado es *Brucella abortus*.³

En el caso del humano esta zoonosis se adquiere por el contacto con animales enfermos, principalmente las poblaciones de riesgo son quienes laboran en ranchos, trabajadores de rastros, médicos veterinarios, personal de laboratorio de diagnóstico clínico que manipula muestras de fluidos biológicos, así como quienes consumen leche y sus derivados sin pasteurizar.⁴

En los países desarrollados, los sistemas para el control de la Brucelosis son adecuados, sin embargo, en los países con economías emergentes, como es el caso de México, representa aún un importante problema de salud; lo anterior se debe a diversas causas en las que destacan el movimiento no controlado de animales por corrales en los ranchos por lo que es más difícil la identificación de animales enfermos y que en muchos de los casos los animales que son diagnosticados con *Brucella abortus* no son sacrificados.⁵

De acuerdo con un informe realizado el 2 de julio de 2020 por la SENASICA organismo encargado de implementar la campaña nacional contra la Brucelosis en animales; se reportó que el 28.88% del territorio mexicano está reconocido en fase de erradicación. ⁶

La demanda creciente de alimentos de calidad por parte del consumidor obliga a las industrias no solo a producir alimentos nutritivos, sino además a ofrecer alimentos inocuos y seguros, por ello las industrias del giro alimenticio requieren de un sistema de gestión de calidad bien estructurado, ya que está de por medio la salud del consumidor. ^{7,8}

Actualmente, los alimentos producidos y procesados con los más altos estándares de calidad e inocuidad son los de mayor demanda y venta tanto a nivel nacional como internacional, por lo que se recurre a la aplicación de estrictas regulaciones y al cumplimiento de normas para garantizar que el producto brindado al consumidor cumple con los estándares requeridos ⁸

El sistema de calidad en la industria de alimentos enfatiza el control de materia prima, procesos y producto terminado, mediante ensayos físicos, químicos y biológicos realizados en laboratorios, como parte del control calidad de materia prima se utiliza el diagnóstico de *Brucella abortus* para evaluar la salud de los animales y por ende evaluar la calidad de la leche obtenida de estos. ⁹

El diagnóstico se establece aislando el microorganismo en cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos; sin embargo, estas prácticas requieren de medidas de prevención altas para el analista y el laboratorio, por lo que actualmente se utilizan técnicas serológicas de aglutinación mediante la utilización de antígenos para la detección de anticuerpos de *Brucella abortus* en muestras de ganado bovino como lo son suero y leche; estas técnicas son cualitativas y presuntivas y las más comúnmente usadas son la técnica de anillo en leche o anillo de Bang para muestras de leche, la técnica de tarjeta o rosa de bengala, rivanol, y fluorescencia polarizada para muestras de suero, esta última es un prueba cuantitativa ^{10,11}

Estas pruebas tienen como ventajas que son consideradas pruebas para diagnóstico rápido, además de ser pruebas de bajo costo, se requiere poca cantidad de muestra, brindan una alta sensibilidad, por el contrario, su principal desventaja es que presenta subjetividad en su interpretación, por lo que es sustancial que el personal se encuentre perfectamente capacitado para la obtención de resultados confiables. ¹²

Como egresada de la Licenciatura de Bioquímica Diagnóstica, formamos una pieza importante en la prevención y erradicación de enfermedades zoonóticas; en este trabajo se describirán las funciones realizadas como profesional contratada en una industria alimentaria, en particular en la aplicación de pruebas para identificación de Brucella, y en el impacto que esto tiene para un diagnóstico adecuado y oportuno de los animales enfermos y en el control y prevención de la diseminación de esta enfermedad. De manera simultánea se exponen los lineamientos normativos bajo los cuales se llevan a cabo estas funciones bajo el sistema de gestión de calidad corporativo que permite ofrecer productos con estándares de alta calidad que cumplen los requisitos y expectativas de los clientes.

Justificación

En la industria de alimentos el área de calidad tiene como objetivo garantizar la inocuidad de un producto esto con el propósito de asegurarle al cliente que está adquiriendo y consumiendo un producto seguro, además ofrecemos al cliente un producto que cumpla con los más altos estándares es por ello que como profesionistas estamos comprometidos a cumplir estos estándares por medio del diagnóstico microbiológico, además de análisis bromatológicos y fisicoquímicos. En este trabajo se revisarán las pruebas realizadas en un laboratorio de serología en la industria de alimentos y el papel que desempeña el BQD en el área de calidad.

Objetivo general

- Conocer las técnicas de diagnóstico para *Brucella abortus* aplicadas en un laboratorio de control de calidad de la leche, utilizando cuatro métodos (rosa de bengala, rivanol, fluorescencia polarizada y anillo en leche) para el cumplimiento del sistema de gestión de calidad en la industria de lácteos.

Objetivos particulares

- Exponer de manera general las metodologías empleadas (rosa de bengala, rivanol, fluorescencia polarizada y anillo en leche) en el diagnóstico de *Brucella abortus* en leche y suero de vaca.
- Describir las principales actividades del químico analista en un laboratorio de diagnóstico en la industria de alimentos.
- Describir la importancia que tiene el BQD en el diagnóstico para beneficio de la industria de alimentos.

Descripción del desempeño profesional.

Aspectos generales de mi desempeño como recién egresado de la Facultad.

En Mayo de 2018 comencé a desempeñarme como químico analista en la industria de alimentos, para obtener la planta y poder firmar el contrato definitivo estuve a prueba durante 3 meses durante este tiempo, se me capacito para poder realizar las actividades del laboratorio de serología el cual está conformado por un equipo multidisciplinario como Médicos Veterinarios Zootecnistas, Químicos Farmacéuticos Biólogos, Químicos Bacteriólogos Parasitólogos, Ingenieros en Alimentos y en los últimos años ha ido creciendo la plantilla de Bioquímicos Diagnósticos en el área de calidad de alimentos.

En primera instancia me encargue de la recepción de muestras, realizar el registro físico y digital además de centrifugación de las mismas, este procedimiento tenía la finalidad de poder identificar las muestras hemolizadas y turbias, al mismo tiempo poder descartar las que se rechazan para los análisis.

Posteriormente estude teóricamente todos los procedimientos de las técnicas que se realizaban en el laboratorio, después de forma analítica se me capacito para desempeñar las pruebas de anillo en leche, tarjeta, rivanol y fluorescencia polarizada.

Al paso de los tres meses de prueba aumentaron mis responsabilidades, ya emitia resultados por correo electrónico al cliente y se asignaron a mi cargo equipos e instrumentos para dar seguimiento al mantenimiento preventivo o correctivo y calibración con la finalidad de cumplir con el programa anual que estipula la NXM-17025, así como el desarrollo y seguimiento de nuevos procedimientos, instructivos, guías rápidas de equipos e instrumentos, diagramas de flujo, en el sistema documental interno. Al paso de 6 meses se me dejó desempeñar y emitir resultados para la prueba de ELISA en leche para detección de aflatoxinas A1, al ser una

técnica de larga duración y vigilancia además requiere de precisión y mucha concentración por parte del personal que la ejecuta se necesita de un tiempo largo de capacitación, al llevar a cabo cualquier técnica de diagnóstico a la par se llenaba una hoja de trabajo la cual incluía datos importantes para la trazabilidad como la fecha del análisis, antígeno utilizado, equipos e instrumentos utilizados, verificación de los controles internos, temperatura de análisis y la identificación de las muestras.

De manera grupal se supervisaba el suministro de los insumos requeridos para llevar a cabo todas las actividades para el laboratorio, el cual incluía principalmente material para disposición de RPBI, reactivos, equipo de protección personal, material para limpieza y la solicitud del mantenimiento y calibración al área de compras.

Por otro lado, se nos capacitaba para poder identificar desviaciones en el sistema de calidad y realizar acciones preventivas en este sentido, se atendían las auditorías internas y externas como parte del sistema de gestión de la calidad, se realizaban las acciones correctivas en caso de obtener una no conformidad, esto nos permitía obtener una retroalimentación que contribuye a una mejora continua en los procesos, como parte de esto en el año 2021 tome un curso por parte de la UNAM de Formación de auditores internos de calidad e inocuidad el cual afianzo mis conocimientos en el tema y pude desempeñarme de mejor manera en este aspecto.

La formación que adquiere el BQD durante la Licenciatura le permite desempeñarse de manera precisa e incorporarse fácilmente al ámbito laboral con la pertinente capacitación y preparación continua. Además de que el BQD tiene la ventaja de desempeñarse en diferentes áreas por sus amplios conocimientos en diversas disciplinas.

Estructura organizacional e inserción y funciones del Laboratorio de Control de Calidad.

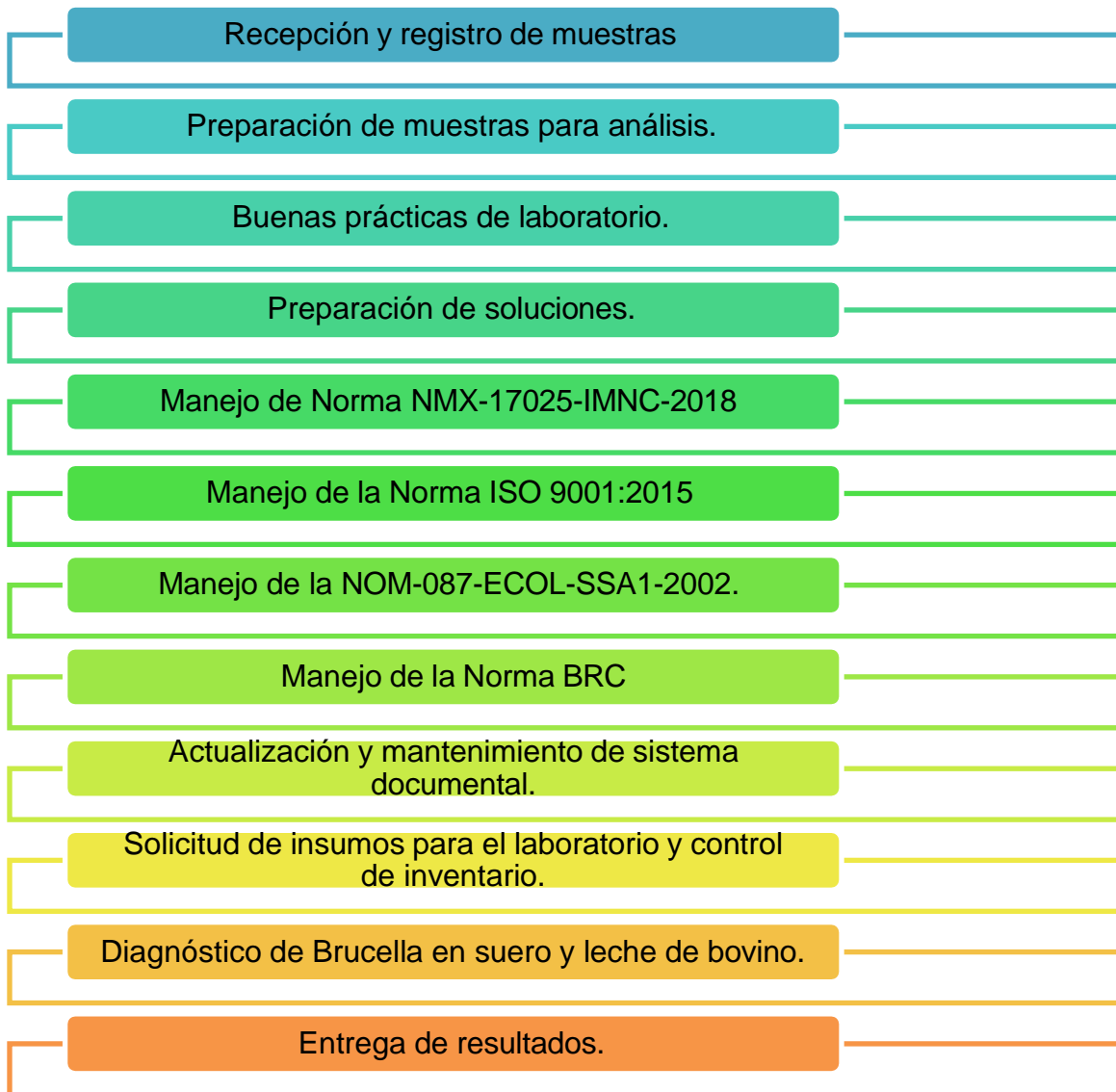


Figura 1. Actividades desempeñadas en el laboratorio de control de calidad.

Para desempeñar las actividades es primordial seguir las buenas prácticas de laboratorio debido a que el personal del laboratorio maneja muestras biológicas se encuentra en peligro de infectarse al estar expuesto a agentes patógenos.

En 1974 el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Estados Unidos publicó "Classification of etiologic agents on the basis of Hazard" en el cual se clasifican los agentes patógenos en 4 grupos de riesgo, más tarde el National Institutes of Health (NIH) y la OMS actualizaron el sistema clasificando los laboratorios en grupos de riesgo de acuerdo a los agentes patógenos que manejan.

Según los grupos de riesgo *Brucella spp.* se encuentra en el grupo de riesgo 3 en el cual se encuentran los agentes asociados a enfermedades serias o letales en humanos para las cuales pueden estar disponibles medidas preventivas y/o terapéuticas y el contagio entre individuos es poco común.⁴⁰

Desde el inicio del proceso las muestras se deberán considerar potencialmente infecciosas independientemente de cuál sea el resultado de las pruebas, por lo que se deberá trabajar con todas las medidas de seguridad. Al manipular muestras deberá portarse en todo momento el equipo de seguridad personal el cual consiste en bata, lentes de seguridad y guantes estos deberán de encontrarse en buenas condiciones (sin roturas o desgaste).

El personal deberá lavarse las manos de forma recurrente durante la jornada laboral siguiendo la técnica del correcto lavado de manos y queda estrictamente prohibido el consumo de alimentos dentro del laboratorio.

Las mesas deberán desinfectarse antes y después de trabajar sobre ellas, con la finalidad de que permanezca la efectividad de los desinfectantes se cuenta con un programa de rol de desinfectantes. En caso de un derrame accidental de muestras biológicas se coloca desinfectante y se limpia con un paño, posteriormente se desecha en la bolsa roja de polietileno de RPBI.

La limpieza de equipos como centrifugas, refrigeradores, congeladores se lleva a cabo semanalmente y se registra en el formato de limpieza y mantenimiento de equipos.

Los RPBI se colocarán en los contenedores adecuados los cuales deberán cumplir todos los requisitos que indica la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, de acuerdo con la

cantidad de residuos generados (Kg) será la periodicidad de la recolección de los residuos por parte del proveedor.

Los residuos se resguardarán en un área alejada del laboratorio y de las áreas donde haya afluencia de personas, para evitar el contacto directo y únicamente deberá tener acceso el personal autorizado.

Residuo	Contenedor
Leche	Contenedor rígido rojo para líquidos.
Viales y tubos de ensaye vacíos.	Bolsa roja de polipropileno
Agujas y material de vidrio.	Contenedor rígido rojo para punzocortantes

Tabla 1. Residuos generados y contenedor correspondiente para su desecho.

Mensualmente se realizará la limpieza profunda de las áreas con Hipoclorito de Sodio al 5% incluyendo techos, muros, ventanas, puertas, mesas y repisas para verificar la efectividad de la limpieza posteriormente se realizará el monitoreo ambiental.

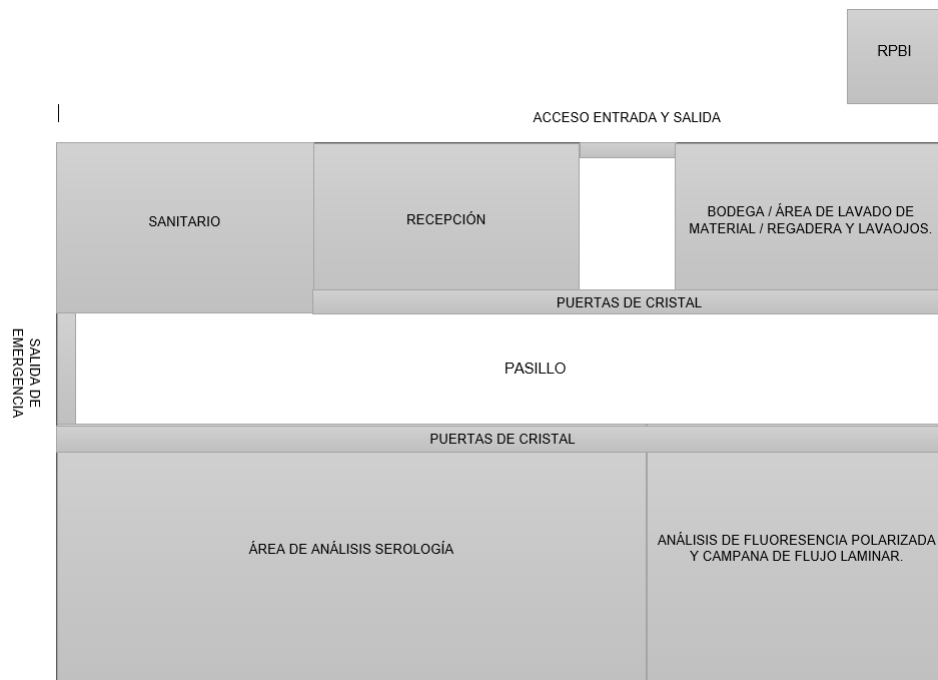


Figura 2. Distribución de las áreas del laboratorio de serología.

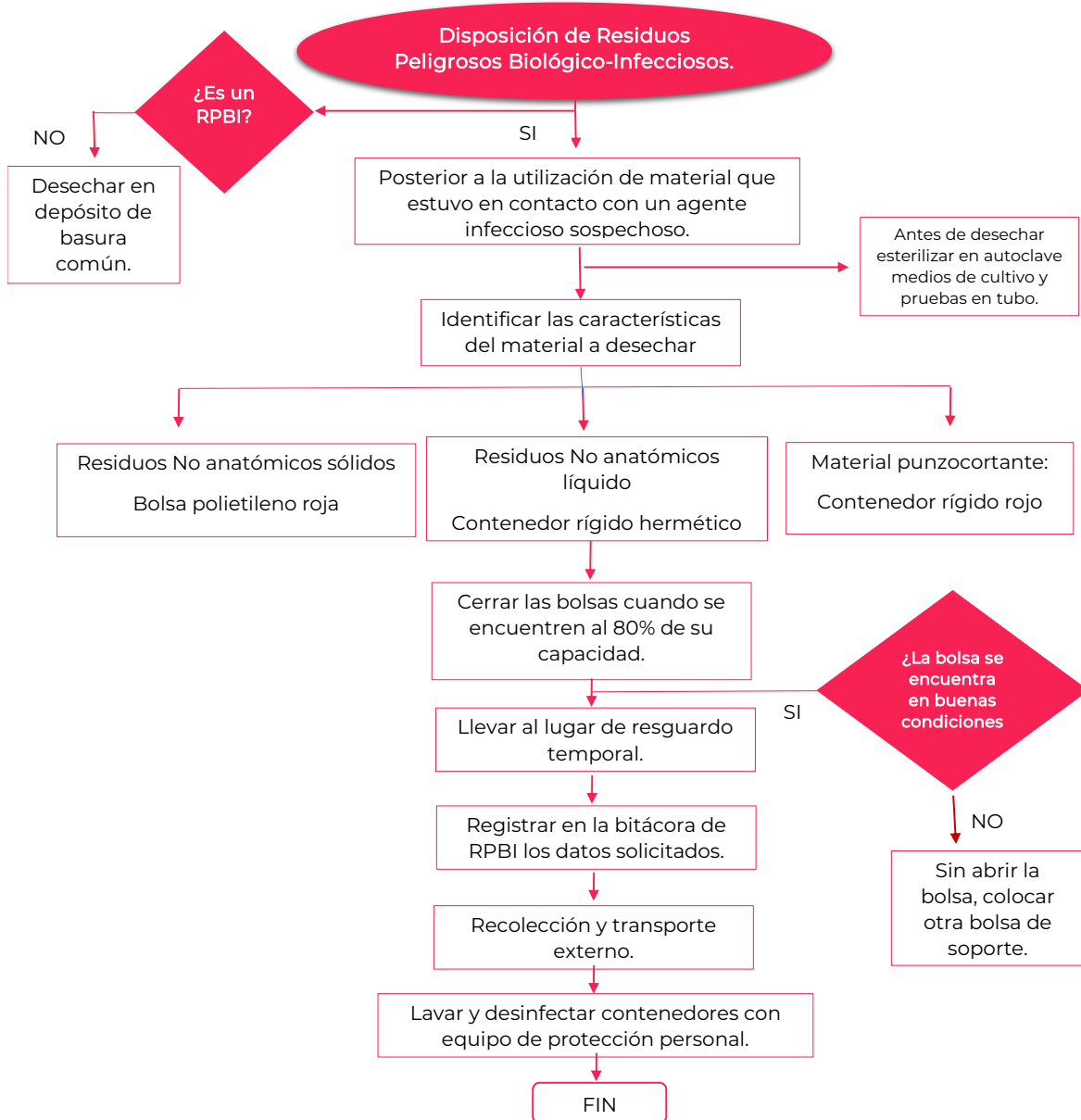


Figura 3. Diagrama de flujo disposición de RPBI.

Recepción de muestras.

Al inicio de la recepción tomar la temperatura de las muestras con un termómetro Infrarrojo calibrado y registrar en la hoja de trabajo.

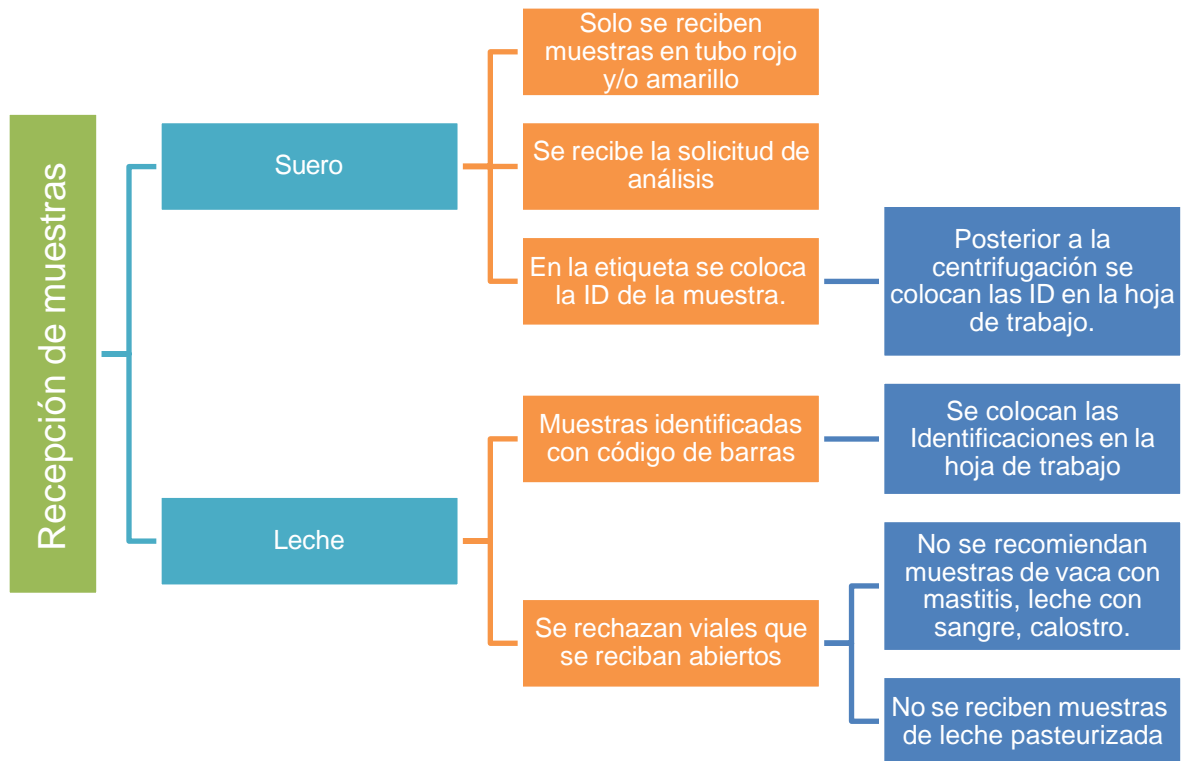


Figura 4. Descripción del proceso de recepción de muestras para análisis.

Criterios de aceptación de muestras.

Se requiere que la muestra biológica recibida cumpla con requisitos necesarios para poder proceder con su análisis con la finalidad de evitar interferencias en los resultados, si la muestra no llegara a cumplir estos requisitos se rechaza y se resguarda para aclaraciones por parte del cliente. A continuación, se describen los requisitos:

- ✓ Debe venir contenida en un envase adecuado, en tubo de sangre sin aditivos (únicamente tubo amarillo y/o rojo).
- ✓ Para el caso de leche deberá venir contenida en un vial identificado y sellado.

- ✓ Muestras Identificadas de manera clara y en un lugar visible, preferentemente con tinta indeleble.
- ✓ Debe incluir la solicitud de análisis llena (fecha del muestreo, identificación de las muestras, análisis solicitado firmado por el médico tratante).

Criterios de rechazo de muestras.

- × Muestras derramadas y/o abiertas.
- × En el caso de suero muestras severamente hemolizadas y/o turbias, debido a que pueden presentarse interferencias.
- × Muestras de leche en mal estado (leche cortada) y muestras con más de 48 hrs. de muestreo.
- × Contenedor sin identificación.
- × Muestras en tubo con aditivos.

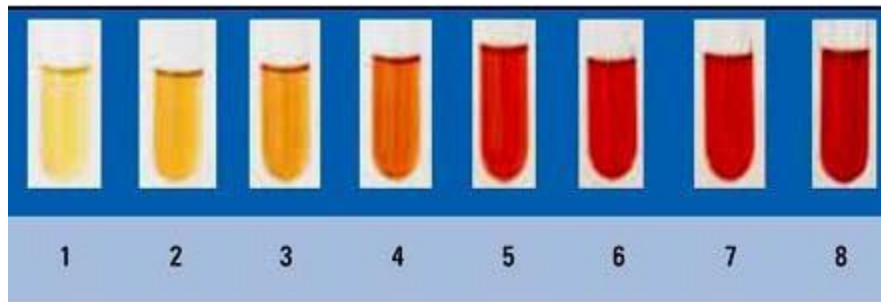


Figura 5. Ejemplos de aceptación y rechazo de muestras hemolizadas. De la muestra 1 a la 4 se aceptan para prueba de tarjeta, rivanol y FP, de la muestra 5 hasta la 8 se rechazan.¹³

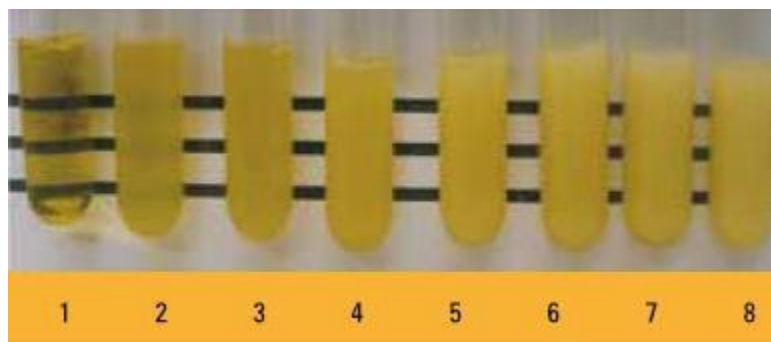


Figura 6. Ejemplos de criterios de rechazo y aceptación para muestras turbias y/o lipémicas. Se aceptan muestras como se observa en el número 1 para prueba de tarjeta, rivanol y FP a partir de muestra 2 a la 8 se rechazan.¹⁴

Sistema de gestión de calidad.

Para cumplir con el sistema de gestión de calidad es necesario contar con un registro en donde se pueda localizar fácilmente la trazabilidad de las muestras desde la recepción de estas hasta la liberación del informe de resultados al cliente.

Los datos esenciales que se requieren por parte del cliente son:

- Fecha de la toma de muestra.
- ID. del animal.
- Nombre y firma de la persona que requiere el análisis

Por parte del laboratorio debe haber un registro donde se indique:

- Fecha de análisis.
- ID. de controles internos utilizados, estos se preparan a partir de sueros que se encuentran resguardados, para control (+) se utilizan sueros positivos a Brucella y para control (-) sueros negativos a Brucella para ello deben colocarse en el registro de preparación de controles las ID. de los sueros utilizados, así como el número de folio del informe al que pertenece cada muestra utilizada, posteriormente se prepara un pool de muestras positivas y otro de muestras negativas y se verifican a las diferentes pruebas para verificar si se aceptan o se rechazan, los criterios de aceptación se describen a continuación en la tabla 1, si son idóneos se colocan en microviales, se numeran de forma ascendente, se resguardan en congelador y se les da una caducidad de 3 meses durante este tiempo se monitorea la temperatura del congelador 3 veces al día con ayuda de un termómetro calibrado esto como parte del control de calidad, posterior al tiempo de caducidad deberán prepararse nuevos controles, si se rechazan los criterios deberán desecharse y prepararse nuevamente.

Prueba	Resultados esperados.	
	CONTROL INTERNO NEGATIVO	CONTROL INTERNO POSITIVO
Tarjeta	Negativo	Positivo
Rivanol	Negativo	Título 1:400
FP	70-95 mP	>120 mP
Anillo en Leche	Negativo	4+

Tabla 2. Criterios de aceptación para la verificación de controles internos.

- ID. del frasco de antígeno utilizado, así como lote y caducidad. Se debe registrar en el formato de “Registro de antígenos” en donde se indica la hora de salida del antígeno, analista, lote, caducidad y hora de resguardo.
- Nombre del analista que analiza y reporta los resultados.

Como parte del sistema de gestión de calidad se realizan pruebas de repetibilidad y reproducibilidad a cada analista y se califica a cada uno, aunado a esto se realiza validación de los métodos, esto con la finalidad de comprobar que el analista se encuentre capacitado y sea apto para realizar el análisis garantizando que los resultados emitidos son confiables.

En el caso de los equipos e instrumentos de laboratorio, se debe contar con un programa anual de mantenimiento y calibración y en casos especiales aplica la calificación que nos permite conocer si estos se encuentran trabajando de manera correcta, en el caso de las estufas de incubación, congeladores y refrigeradores nos permite conocer si la temperatura se mantiene homogénea dentro del equipo.

En los laboratorios de ensayo es de suma importancia que el personal se encuentre capacitado para realizar las técnicas, para la utilización del equipo del laboratorio y la interpretación de resultados, asimismo debe comprobarse que todos los reactivos utilizados durante los procesos se encuentran en condiciones aptas, así como utilizar solo instrumentos y equipos en los cuales su calibración y mantenimiento se encuentren vigentes de cada equipo e instrumento además las instalaciones sean

adecuadas para mantener las condiciones específicas para cada prueba, todo esto con el propósito de demostrar que los resultados sean auténticos y confiables.

Riesgos de la Brucelosis en la salud pública.

La brucelosis humana sigue siendo una enfermedad endémica en varias zonas del país debido a que los programas de prevención no han tenido el impacto esperado por lo que actualmente sigue siendo un problema de salud pública. En esta zoonosis infecciosa se ven afectados principalmente trabajadores de granjas y rastros, médicos veterinarios que se encuentran en contacto con animales infectados, fetos y/o placentas de animales abortados y personal de laboratorio que manipule cultivos o muestras.

Es por ello que existe la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) la cual es el conjunto de laboratorios que se encargan de generar información de gran utilidad ya que unifican técnicas de diagnóstico, así como el tratamiento de los datos para la toma oportuna de decisiones. En esta red se realiza el diagnóstico serológico de Brucelosis y está conformada por el InDRE, LESP Y LAVE y se encuentra estructurada a nivel nacional, estatal y local, siendo el InDRE el representante a nivel nacional como LNR.

Aunado a esto como medida de atención a la zoonosis se crea la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública de Vigilancia de Brucelosis la cual es una de las redes primordiales para la vigilancia de la enfermedad, actualmente se encuentra integrada por 31 laboratorios estatales de salud pública en todo el país.

La población en general se ve expuesta a esta enfermedad al momento de consumir leche o productos derivados de estos que no se encuentren pasteurizados y que no cuenten con un control de calidad.

Esta infección causa fiebres ondulantes, cefalea, sudoración, pérdida de peso, escalofríos, dolor general puede causar daños en el hígado y en bazo.

La mayor incidencia de casos de Brucelosis está reportada en Oriente medio, África, China, India, Perú y México, mientras que, en países de Europa Occidental y Norte, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda han logrado erradicarla.

Situación en México.

En México la brucelosis es un padecimiento sometido a vigilancia epidemiológica y de notificación obligatoria a los sistemas de información oficial. El estudio de esta enfermedad se inició en el año de 1939 en el Laboratorio de Bacteriología e Inmunología, del entonces Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET), en 1985 se crea el Laboratorio de Brucelosis.

De acuerdo con datos obtenidos del 2022 el estado de Baja California Sur se encuentra libre de Brucelosis y Sonora libre de brucelosis causada por especies lisas. El 29.6% del territorio nacional se encuentra en fase de erradicación Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit, Quintana Roo, Yucatán, Aguascalientes, Baja California, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Puebla, Oaxaca y Querétaro.²⁶



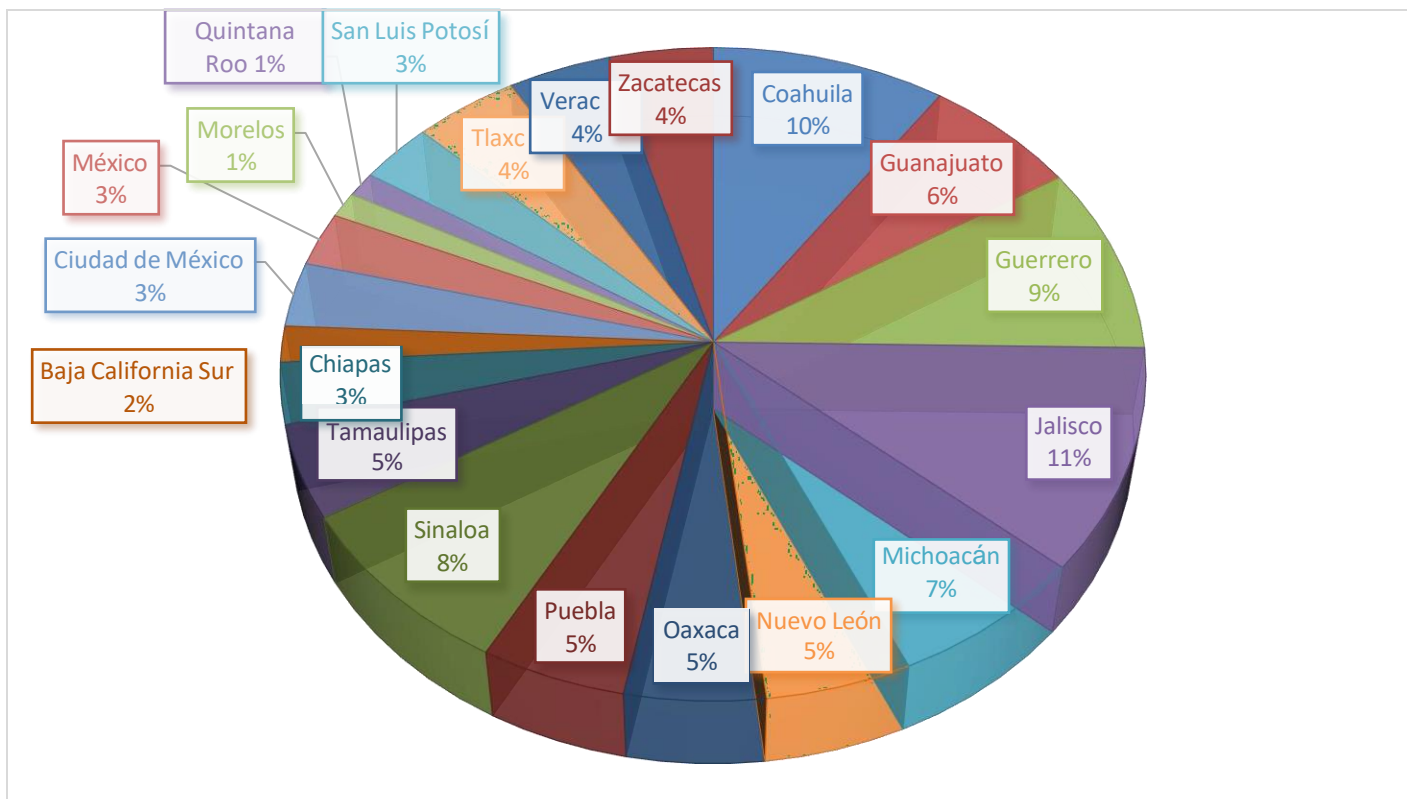
Figura 7. Campaña nacional contra la brucelosis en los animales.

Brucelosis		
Femenino	Masculino	Total acumulado
371	224	595

Tabla 3. Vigilancia epidemiológica de Brucelosis en humanos hasta la semana 30 del año 2022.

FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2022. Información preliminar, incluye casos probables.

FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2022. Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica, Información preliminar de casos confirmados.



Gráfica 1. Distribución Nacional del porcentaje de casos de Brucelosis en humanos reportados hasta la semana 30 del año 2022.

Prevención y Control de la Brucelosis.

El plan nacional de control y erradicación tiene por objetivo controlar y erradicar la brucelosis en todo el país y evitar el riesgo de la transmisión a los humanos.

La vigilancia se basa principalmente en la detección de animales enfermos por medio de pruebas serológicas y análisis de leche, estas resultan de gran apoyo en las campañas para la eliminación de la enfermedad, sin embargo, la vacunación por

sí sola no logra combatir el problema es por ello que se deben implementar medidas a la par de manejo sanitario y el diagnóstico temprano y oportuno. Además de que los productores y asesores deben ser conscientes del problema y aceptar la identificación de animales enfermos para su eliminación.

En las zonas en donde la brucelosis es endémica se debe considerar la vacunación como método de prevención. Cuando se está cerca de eliminar la enfermedad se debe optar por aplicar un programa de pruebas de diagnóstico y sacrificios sanitarios para erradicarla.

Vacunas utilizadas en campaña en México.

En México actualmente se colocan dos tipos de vacunas de manera indistinta, las cuales son:

Cepa S19. Su morfología es lisa y presenta cadena O del lipopolisacárido lo cual explica la persistencia de anticuerpos post-vacunales en el suero por lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad.

- Brucel-N-19. Conocida como dosis clásica contiene *Brucella abortus* cepa 19 cada dosis de 2 mL contiene $2-8 \times 10^{10}$ UFC/dosis utilizada para la prevención únicamente de becerras de 3 a 6 meses de edad.
- Brucel-R-19. Dosis reducida. Para hembras de 6 meses en adelante. Cada dosis de 2 mL contiene 3×10^8 UFC/dosis a 3×10^9 UFC/dosis.

Cepa RB51. Es de morfología rugosa y carece de la cadena O del lipopolisacárido, esto permite la identificación de animales vacunados de los infectados ya que no induce a la presencia de anticuerpos que puedan ser detectados durante el diagnóstico serológico, de tal forma que cualquier animal vacunado con esta cepa que presente un resultado positivo se debe considerar como un animal infectado.

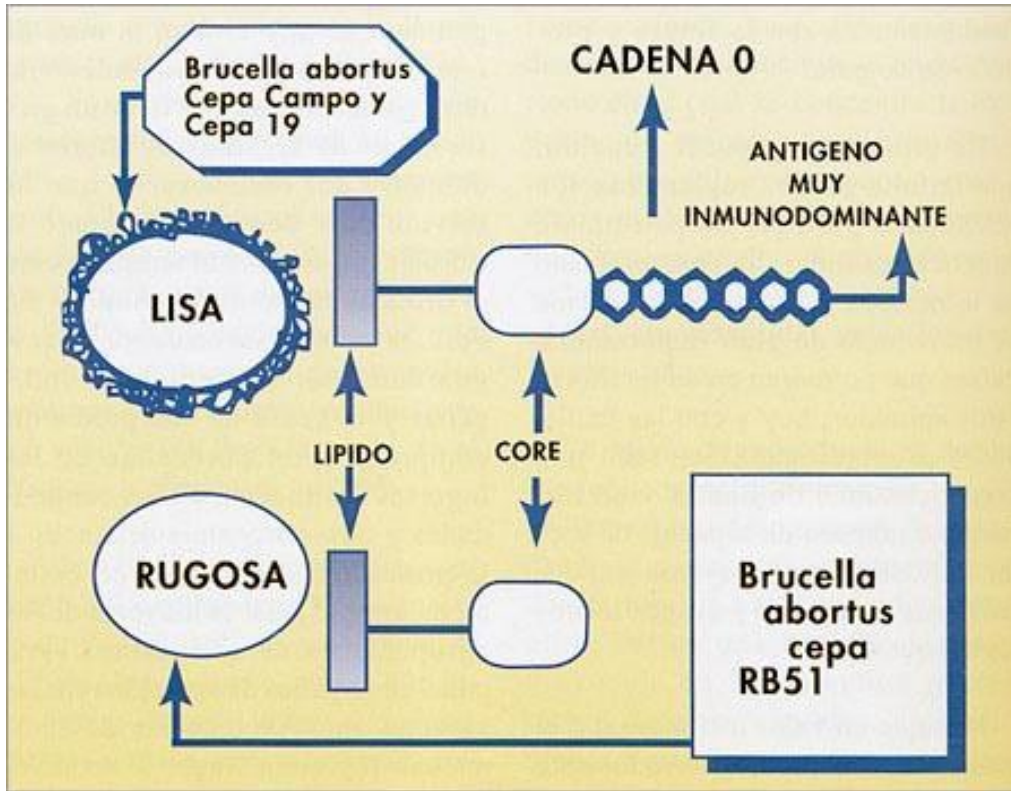


Figura 8. Vacuna RB51 y Cepa 19. ⁵⁶

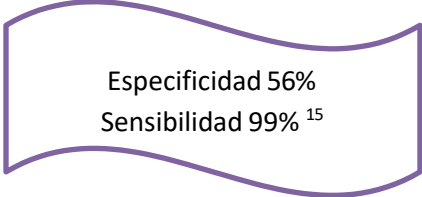
Durante los 8 a 12 meses posteriores a la vacunación los animales pueden salir positivos a la prueba de tarjeta y rivanol. Los animales revacunados de manera incorrecta pueden salir positivos a tarjeta y a rivanol negativo por varios meses.

Para la revacunación se recomienda utilizar la misma vacuna, ya que al combinar ambas vacunas causa un problema para el diagnóstico ya que se dificulta la diferenciación entre animales vacunados y animales infectados.

Técnicas de diagnóstico de Brucella en leche.

A continuación, se describen las técnicas utilizadas en un Laboratorio de Serología como parte del sistema de gestión de calidad.

Prueba de anillo en leche o Anillo de Bang.



Especificidad 56%
Sensibilidad 99% ¹⁵

Esta prueba pertenece a las pruebas indirectas para el diagnóstico de Brucella en leche, por lo que únicamente se obtienen resultados presuntivos y no confirmativos.

Esta prueba fue diseñada en 1937 por Fleishauer, a pesar de ser una prueba antigua en la actualidad sigue siendo una prueba de reconocimiento a nivel nacional por lo que es utilizada como una prueba de apoyo para la detección de ganado sospechoso enfermo. ¹⁶

Para el diagnóstico de *Brucella abortus* en leche se requiere una muestra de leche cruda y fresca de tanque o botes de recolección se podrá tomar del hato completo siempre y cuando no se rebasen los 900 animales, quedan rechazadas las muestras de vaca recientemente vacunadas con cepa 19 ya que se pueden presentar reacciones falsas positivas.

Es importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones para evitar resultados falsos positivos. ^{17,18}

- No debe efectuarse la prueba el mismo día de la toma de muestra.
- No se realizan en muestras pasteurizadas ya que este procedimiento altera los resultados.
- La homogeneización brusca puede romper los glóbulos de leche y no permitirá la formación del anillo.

- No es óptima para muestras de calostro, animales con mastitis, animales cerca del periodo de secado.

Para esta técnica se requiere antígeno con las siguientes características:

- Cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, inactivada con fenol al 0.5%,
- Teñido con hematoxilina y pH de 4.0 a 4.3
- Concentración celular al 4%

Este antígeno es distribuido a Nivel Nacional por PRONABIVE y aprobado por SADER.



Figura 9. Presentación del frasco de ABA Test Leche para 650 pruebas.⁵¹

Esta prueba cualitativa se fundamenta en la detección de anticuerpos Ig-M e Ig-A aglutinante presentes en la leche de animales infectados, mediante una reacción antígeno-anticuerpo, que se visualiza por la formación de un anillo color azul en la superficie del tubo cuando se trata de una reacción positiva, en la ausencia de estos anticuerpos el anillo mantiene una coloración blanca.

Es importante que previo al análisis hacer un ajuste de hato, para conocer el volumen de muestra que se dispensara en cada tubo para esto se sigue la siguiente tabla:

Número de Animales	Volumen de Leche
1-4 hacer un pool	1 mL
5-200	1 mL
201-500	2 mL
501-900	3 mL

Tabla 4. Número de vacas en el hato a probar.¹⁸

A continuación, se describe el procedimiento para llevar a cabo la técnica.

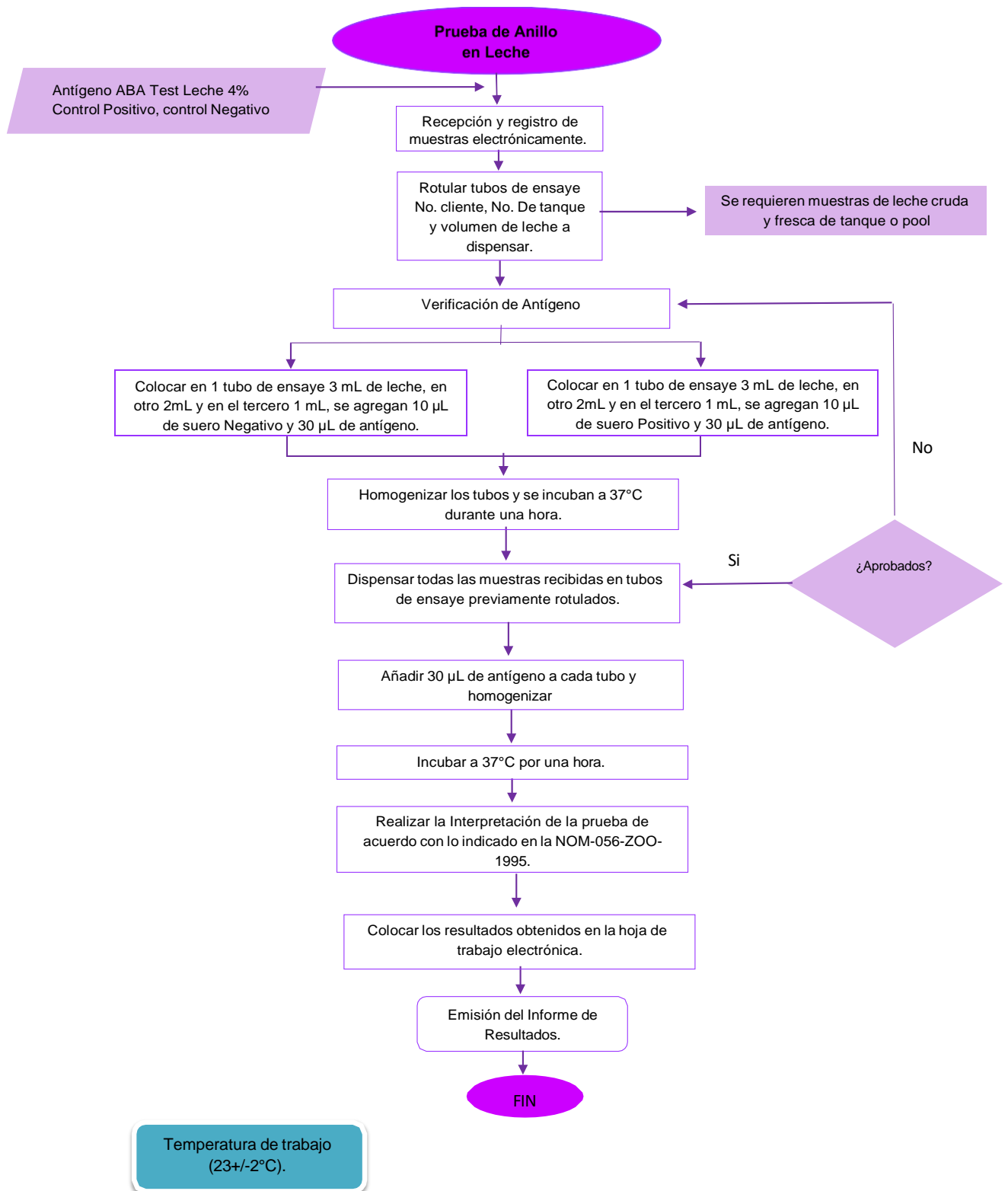


Figura 10. Diagrama de flujo anillo en leche.

Resultados.

1+,2+,3+,4+ y resultado negativo.

Interpretación de la prueba.

Cuando en una prueba se obtiene un resultado 1+, 2+,3+, 4+ se considera una prueba Positiva, lo que evidencia una presunción de ganado enfermo, por lo que se recomienda tomar un muestreo de sangre de vacas sospechosas, por ejemplo, vacas que hayan tenido abortos recientemente.

Si se envían los pool por corral y el resultado es positivo, entonces el muestreo de sangre debe ser principalmente de los animales de ese corral y de animales que hayan estado en contacto con estos para identificar los animales infectados.

Esta prueba al tener una alta sensibilidad, la probabilidad de obtener resultados falsos negativos es muy baja.

Lectura	Color del anillo y de la columna de la leche
-	Anillo de color blanco y columna de color lila
1+	Anillo y columna de leche color morado tenue
2+	Anillo color morado más intenso que + y columna medianamente coloreada
3+	Anillo color morado marcado y columna de tonalidad lila
4+	Anillo color morado intenso y columna de color blanco

Tabla 5. Interpretación de la prueba de anillo en leche de acuerdo con el color del anillo y al color de la columna. ¹⁸



Figura 11. Apreciación de la interpretación de la prueba de anillo en leche para resultado negativo, 1+, 2+,3+, 4+.

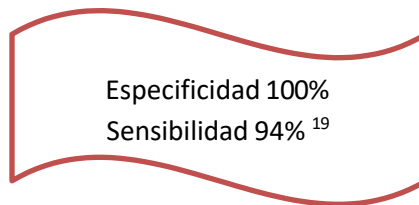
Técnicas de diagnóstico de *Brucella* en suero.

Aunque bien es cierto que el método más confiable para la identificación de *Brucella spp.* es el aislamiento en hemocultivo este procedimiento es lento y altamente riesgoso para el personal que ejecuta la prueba, por esta razón es que el esquema actual de diagnóstico de brucelosis en México se basa en la utilización de técnicas serológicas que identifican la presencia de anticuerpos en suero bovino.

De acuerdo con la NOM-041-ZOO-1995 “Campaña Nacional contra la brucelosis en los animales” las pruebas inmunológicas para suero establecidas y efectuadas por el personal capacitado son la prueba de tarjeta, rivanol y fijación del complemento.

El presente trabajo describe las técnicas de tarjeta o rosa de bengala, rivanol y Fluorescencia polarizada como técnicas de apoyo para el diagnóstico en muestras de suero.

Técnica de Tarjeta o Rosa de Bengala



Esta es una prueba indirecta presuntiva perteneciente a las pruebas serológicas dirigida para el diagnóstico de *Brucella abortus* en suero de bovinos, esta prueba al tener una alta sensibilidad será difícil obtener un resultado falso negativo. Actualmente esta es la prueba tamiz para detección de *Brucella* en suero a nivel nacional.

Se fundamenta en la detección de anticuerpos IgG₁ en el suero por medio de la inhibición de algunas aglutininas a pH bajo, estos anticuerpos se unen al antígeno el cual posee las siguientes características:

- Paquete Celular *Brucella abortus* cepa 1119-3

- Concentración celular al 8%
- pH de 3.6
- Teñido con rosa de bengala en ácido láctico.



Figura 12. ABA Test Tarjeta al 8%.⁵²

Para el diagnóstico adecuado se requiere que las muestras se encuentren en óptimas condiciones, por lo que se rechazarán muestras de suero turbias, hemolizadas, congeladas, o muestras con residuos de heces esto con la finalidad de evitar interferencias en la interpretación de la prueba.

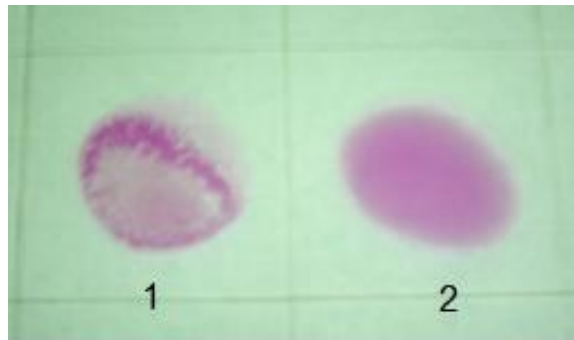


Figura 13. En el Número 1 se observa una reacción positiva (+) en el número 2 una reacción negativa (-).

Resultados.

Positivo y Negativo.

Interpretación de la prueba.

Una reacción positiva a rosa de bengala se identifica por la presencia de grumos finos, puede variar la potencia de esta aglutinación por lo que en ocasiones es más evidente, se requiere someter estas muestras a pruebas complementarias como rivanol y fluorescencia polarizada.

Una reacción negativa se caracteriza por la ausencia de estas partículas finas, por lo que se reporta la muestra como negativa y no se realizan pruebas complementarias.

Posterior al análisis, las muestras negativas se resguardan en el refrigerador a 4°C durante 7 días para cualquier aclaración mientras que las muestras positivas se colocan en el congelador y se resguardan durante 3 meses.

Esta prueba permite la obtención de resultados en pocos minutos y de manera sencilla, por lo que es considerada una prueba tamiz, puede presentar falsos negativos sobre todo en infecciones de reciente evolución.

A continuación, se presenta la metodología de la prueba:

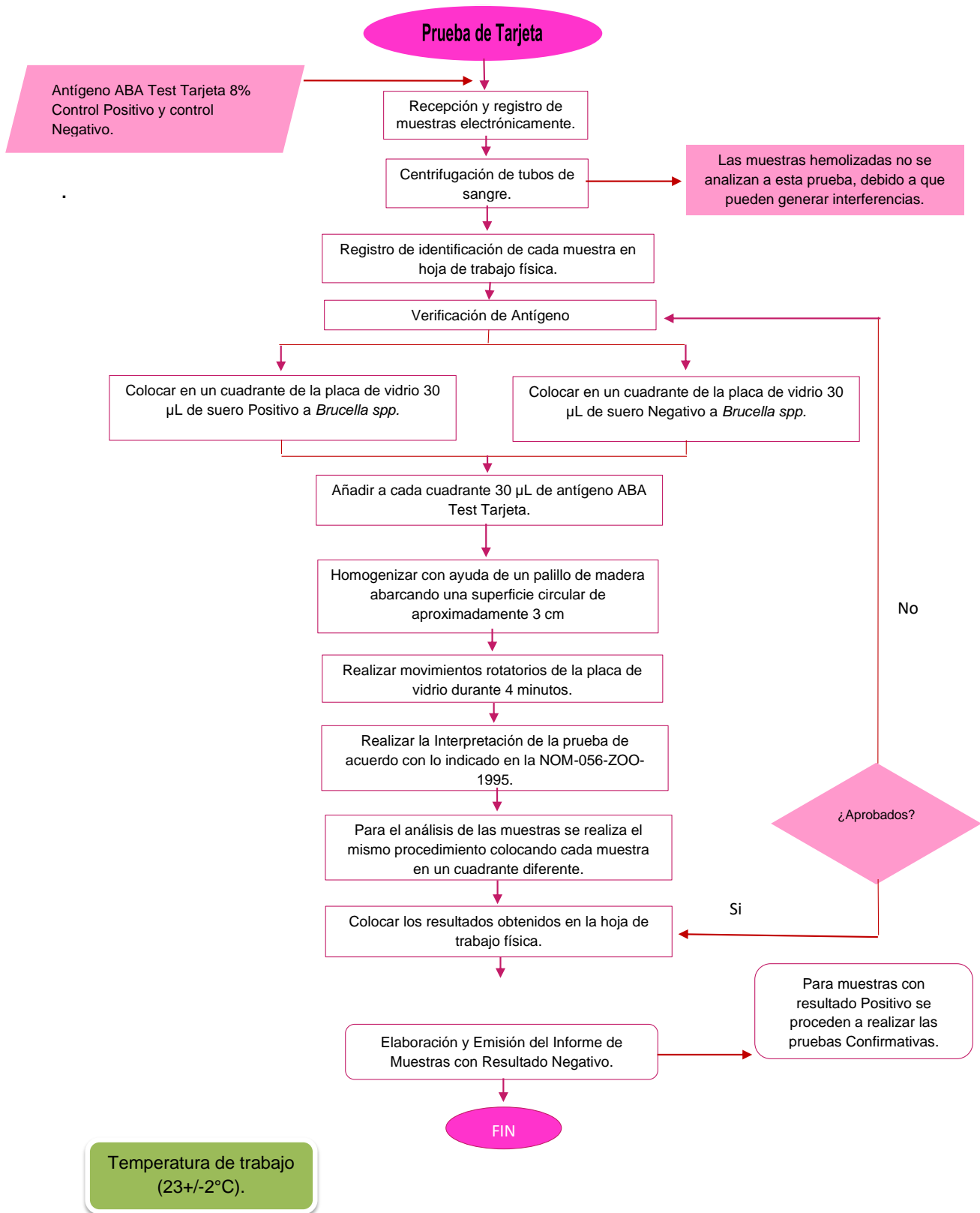


Figura 14. Diagrama de flujo de Tarjeta o Rosa de bengala.

Técnica de Rivanol

Especificidad 100%
Sensibilidad 97.8%⁴⁷

Al obtener un resultado positivo a la prueba de tarjeta se procede a realizar la prueba de Rivanol la cual es una prueba complementaria cualitativa y cuantitativa.

Para esta prueba es necesario utilizar Antígeno Aba Test Rivanol este reúne las siguientes características

- *Brucella abortus* cepa 1119-3 inactivada con calor
- Concentración celular del 4%.
- pH 5.8 a 6.2
- Teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta.



Figura 15. Aba test Rivanol.⁵³

Para llevar a cabo esta prueba se requiere una solución de lactato 2 etoxi-6-9-diamino acridina también llamada solución de rivanol esta viene incluida en el Kit que distribuye PRONABIVE, esta solución permite que precipiten la albúmina e IgM del suero, por lo que en el sobrenadante de un animal positivo únicamente quedaran

anticuerpos IgG (1y 2) los cuales aglutinaran con el antígeno de rivanol en un lapso no mayor a 12 minutos.

El resultado se expresará en función del título más alto en el cual se observe aglutinación. Los resultados se clasificarán en sueros positivos o negativos. Se consideran positivos todos los sueros de animales no vacunados que aglutinen en cualquiera de las diluciones de 1:25 hasta 1:400. En el caso de animales vacunados la aglutinación en 1:50 o un título mayor se considerará positivo.

Esta prueba permite diferenciar entre los animales que se encuentran vacunados y los infectados, para poder realizar esta prueba con animales vacunados con Brucel N-19 y Brucel R-19 (cepa 19) se requiere que hayan transcurrido de 10 a 12 meses después de la aplicación, mientras que los vacunados con RB51 la diferenciación puede realizarse en cualquier momento. El ganado vacunado con la cepa 19 puede dar resultados positivos a la prueba de rosa de bengala y título de 1:25 en la prueba de rivanol e inclusive un resultado negativo.

Por otro lado cuando los animales han sido vacunados con RB51 y alcanzan títulos bajos como 1:25 o 1:50 puede indicar dos situaciones, la primera podría ser que están comenzando con la enfermedad o que están en contacto con animales infectados y están teniendo una respuesta secundaria por estar en contacto con la bacteria, para confirmar o descartar la enfermedad se sugiere realizar un muestreo nuevamente a los 28 días, si el título aumenta es indicativo de que la enfermedad está presente en el animal y puede ser confirmado con una prueba de ELISA.

Para la ejecución del análisis es necesario realizar diluciones como se indica en la siguiente tabla:

Vol. Solución de Rivanol	Volumen de antígeno	Dilución
80 µL	30 µL	1:25
40 µL	30 µL	1:50
20 µL	30 µL	1:100
10 µL	30 µL	1:200
5 µL	30 µL	1:400

Tabla 6. Preparación de diluciones para la interpretación de la prueba de Rivanol.

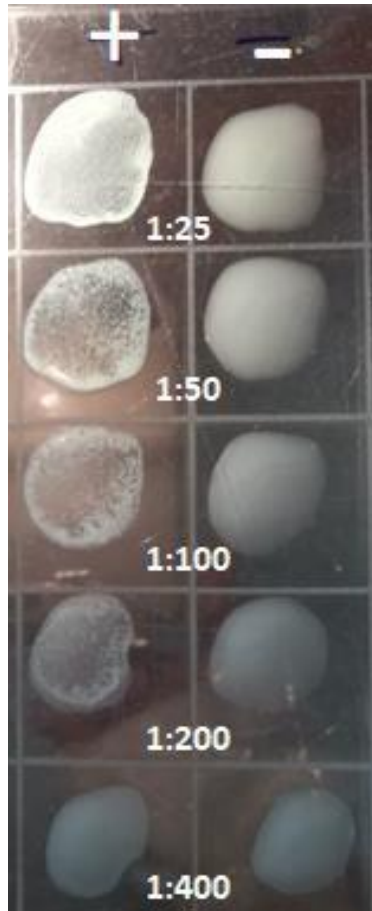


Figura 16. Prueba de rivanol primera columna muestra un resultado positivo hasta título 1:400, segunda columna resultado negativo.

Resultados:

El resultado se expresa como positivo, seguido del título del suero en que ocurre la reacción o negativo.

Interpretación:

En animales no vacunados se considera positiva una aglutinación en 1:25 y en animales vacunados se considerará sospechosa, mientras que una aglutinación a partir de 1:50 se considera un resultado positivo.

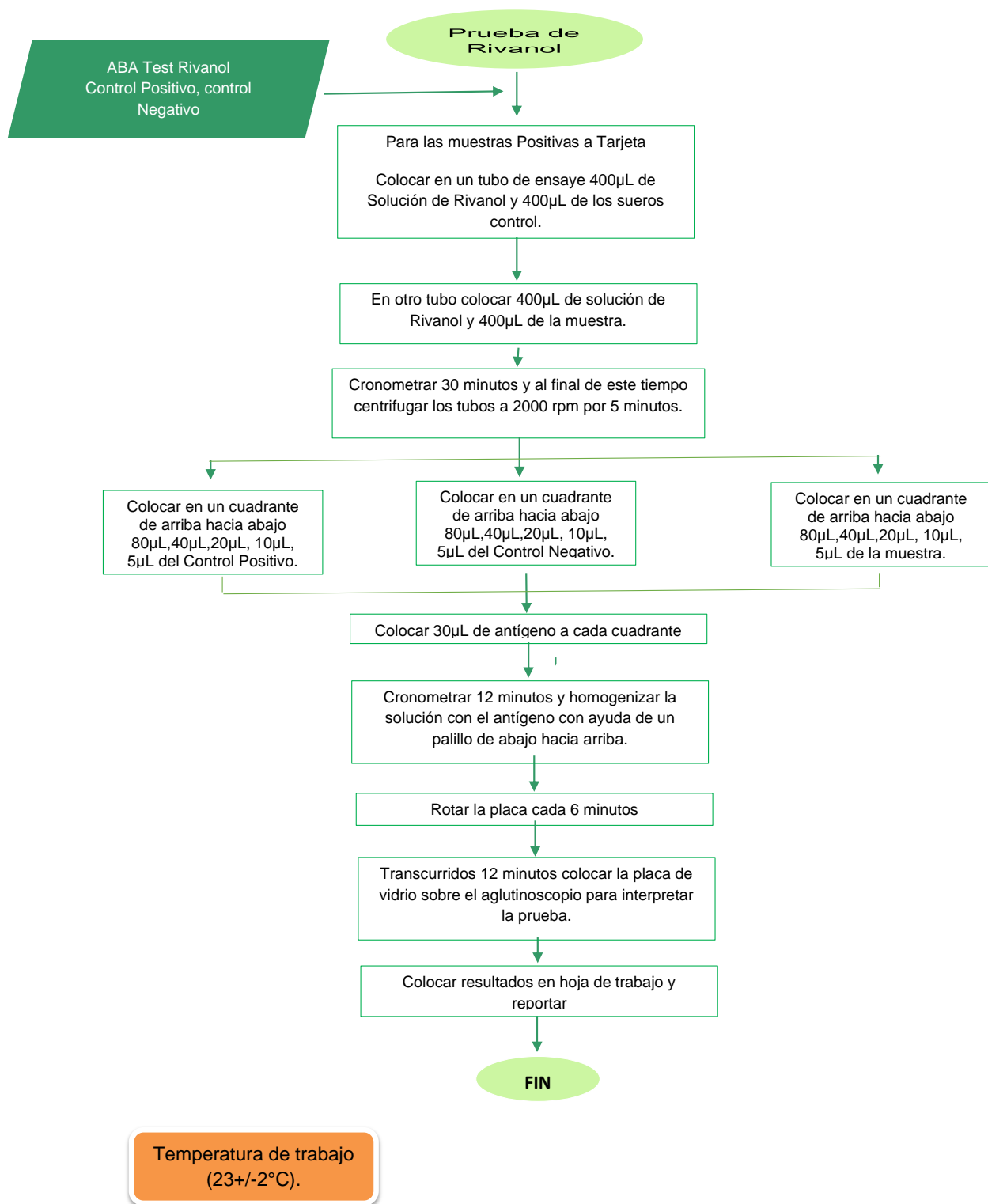


Figura 17. Diagrama de flujo de Rivanol.

Ventajas y desventajas de las técnicas serológicas descritas.

Es importante mencionar que todas las técnicas analíticas presentan ventajas y desventajas, sin embargo, todas pueden ser de utilidad; la OIE recomienda utilizar al menos dos pruebas diferentes una como prueba tamiz y otra como prueba confirmatoria.

A nivel La NOM-04-ZOO-1995 “Campaña contra la brucelosis en los animales” señala las pruebas aprobadas para *B. abortus*, sin embargo, se siguen desarrollando estudios para incluir nuevas técnicas en el futuro como la fluorescencia polarizada. De manera internacional existen Organizaciones que aprueban en el uso de algunas técnicas como es el caso de la OMS y la OIE.

A continuación, se presenta tablas con las ventajas y desventajas de las pruebas serológicas antes mencionadas.

Prueba	Ventajas	Desventajas
Anillo en leche	Prueba económica.	Para obtener un resultado se debe esperar 1 hora de incubación
	Se requiere poco reactivo para cada prueba.	El resultado puede variar si hay cambios bruscos de temperatura durante la incubación.
	En una incubación se pueden introducir en la estufa varias pruebas.	Esta prueba no es apta para leche pasteurizada
	Como se muestra en la tabla 3 está establecido un volumen de leche específico para el número de vacas que conforman el pool.	Al ser una prueba de observación puede haber complicaciones al momento de realizar la lectura
		No está indicada para animales individuales.

Tabla 7. Ventajas y desventajas que brinda la prueba de anillo en leche.

Prueba	Ventajas	Desventajas
Rosa de Bengala o tarjeta	Prueba rápida y económica	Presenta falsos negativos en animales que comienzan con la enfermedad
	Se requiere poco material	El antígeno es distribuido a nivel nacional únicamente por PRONABIVE por lo que puede haber desabasto.
	Posibilidad de trabajar muchas muestras en un día.	El antígeno se deteriora fácilmente a los cambios constantes de temperatura.
	Se requiere poca cantidad de muestra.	En animales vacunados con cepa 19 puede haber falsos positivos. Puede dar falsos positivos en reacciones cruzadas con bacterias como <i>Salmonella spp.</i> , <i>E.coli</i> , <i>Yersinia spp.</i> y <i>Pseudomonas spp.</i>

Tabla 8. Ventajas y desventajas que brinda la prueba de rosa de bengala.

Prueba	Ventajas	Desventajas
Rivanol	Prueba rápida y económica.	Presenta falsos negativos en animales que comienzan con la enfermedad
	Se requiere poco material.	El antígeno es distribuido a nivel nacional únicamente por PRONABIVE por lo que puede haber desabasto.
	Permite diferenciar animales infectados de animales vacunados con RB51.	El antígeno se deteriora fácilmente a los cambios constantes de temperatura.
		En animales vacunados con cepa 19 puede haber falsos positivos.

Tabla 9. Ventajas y desventajas que brinda la prueba de rivanol

Fluorescencia polarizada.

Especificidad 99.8%
Sensibilidad 98.7%³⁷

Esta técnica es utilizada para la detección de *Brucella* en suero, es cuantitativa y se requiere de un equipo para realizarla este determina anticuerpos de *Brucella abortus* en suero, plasma y leche de bovinos, la presencia de estos anticuerpos es indicativo de una infección actual o reciente.

El equipo utilizado es SYNERGY 2 el cual mide la fluorescencia emitida por el conjugado que está compuesta por un polisacárido-O (OPS) extraído de la bacteria *Brucella abortus* y marcado con fluoresceína. Cuando el anticuerpo no está presente la polarización es baja y se incrementa cuando los anticuerpos se unen al conjugado.

El conjugado OPS-fluoresceína es de tamaño relativamente pequeño y puede rotar libremente en solución, esto da como resultado un valor de polarización bajo cuando se mide. Si están presentes anticuerpos específicos de OPS, se unirán a OPS y harán que el complejo de moléculas sea mucho más grande. Esto, a su vez, aumenta el valor de polarización.

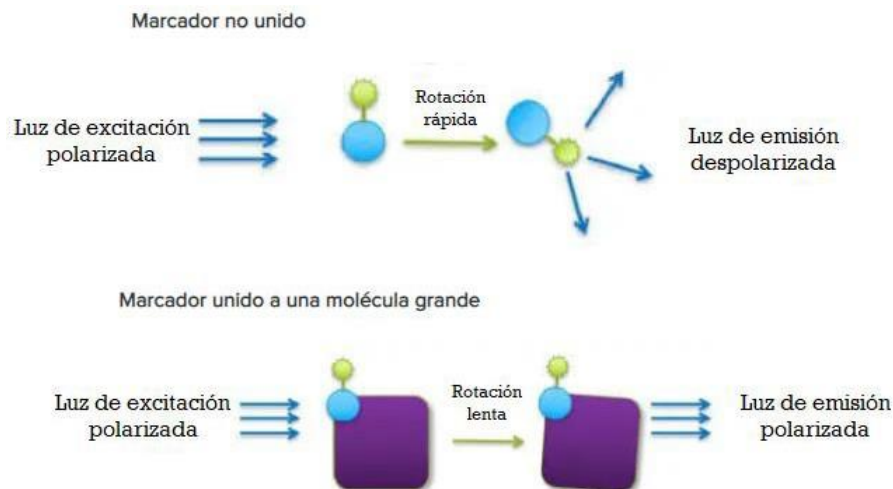


Figura 18. Fundamento de fluorescencia polarizada.⁴⁸

El Synergy 2 se controla mediante el software de análisis de datos Gen5 además de controlar al lector, el software es capaz de realizar cálculos de polarización, validación de ensayos, informar resultados de ensayos y generar un informe codificado por colores que identifica fácilmente resultados de muestras positivos y negativos.



Figura 19. Equipo SYNERGY 2.

Para llevar a cabo la técnica se requiere de placas de 96 pozos de los cuales, los 4 primeros pozos corresponden a los controles del Kit, se colocan 3 controles negativos en las coordenadas A1, B1 Y C1 y 1 control positivo en la coordenada D1 a partir de la coordenada E1 y hasta F12 se colocan las muestras identificando perfectamente la muestra que se coloca en cada pozo cada uno presenta una coordenada, mientras que en G12 se coloca el control interno positivo y en H12 el control interno negativo.

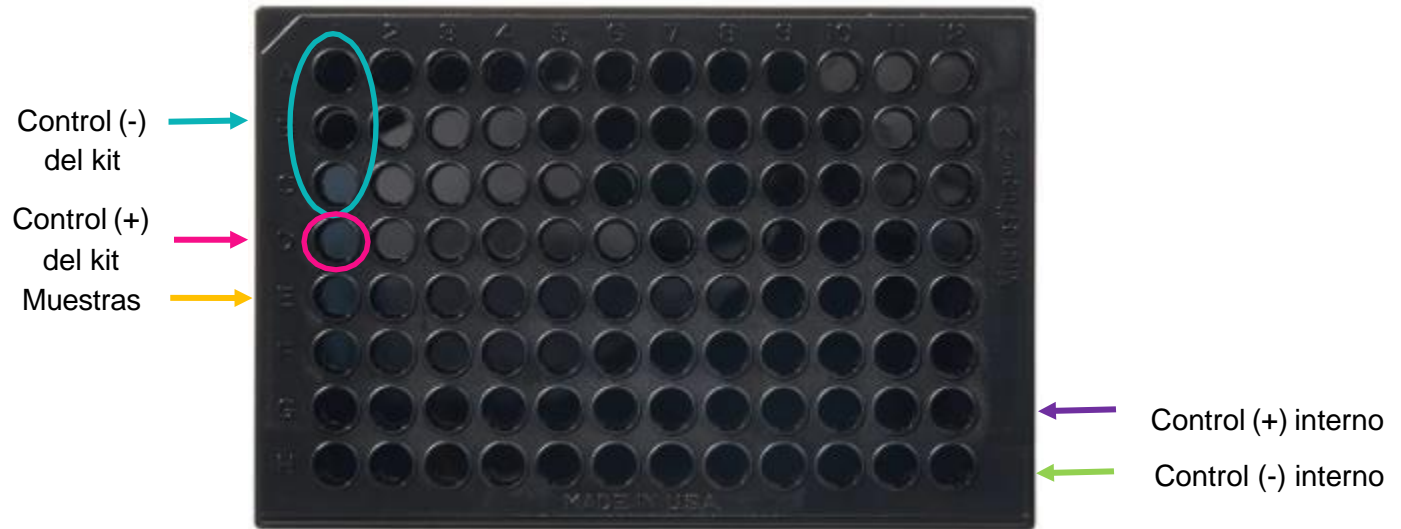


Figura 20. Placa de 96 pozos para la prueba de FP.

Para verificar si el ensayo tuvo las condiciones ideales y fue realizado de manera correcta los valores de los controles negativos deben ser oscilar entre 70 y 95mP mientras que para el control positivo se obtienen valores ≥ 120 mP y hasta 250 mP.

Cada muestra estará identificada con una coordenada y en el programa Gen 5 de Biotek aparecerá el valor obtenido (mP) para cada muestra por coordenada.

El tiempo aproximado para obtener resultados de una placa completa que incluye 90 muestras es de 20 a 25 minutos aproximadamente esto significa una gran ventaja para esta prueba.

Existen otro tipo de lectores de baterías que son utilizados para análisis de campo y leen un tubo a la vez

Interpretación de resultados.

RESULTADO	VALOR (mP)
POSITIVO	≥ 120
NEGATIVO	< 120

Tabla 10. Interpretación de los resultados de acuerdo con el valor obtenido por FP.

Beneficios que otorga la prueba:

- Método rápido, simple y preciso.
- Método automatizado
- Aprobado por la OIE y USDA.
- Método moderno.
- No requiere pasos repetitivos, ni lavados.
- No detecta anticuerpos resultantes de la vacunación con cepa 19, por lo que evita falsos positivos en animales vacunados con esta cepa.

Reactivo	Características
Control Positivo	Suero bovino positivo a <i>Brucella abortus</i>
Control Negativo	Suero bovino negativo a <i>Brucella spp.</i>
Diluyente de muestra 10x	Mezcla de sustancias en agua ultrapura
Trazador	Contiene polisacárido O(OPS) extraído de <i>Brucella abortus</i> marcadas con fluoresceína con azida de sodio como conservante.

Tabla 11. Reactivos contenidos en el Kit de fluorescencia polarizada.

Requisitos

El Kit deberá almacenarse a una temperatura de 2 a 8°C y se deberá evitar que el control negativo del kit se encuentre a temperaturas superiores a los 25°C.

Para que el equipo funcione de manera correcta la temperatura interna del Synergy 2 deberá ser menor a los 25°C.

Para realizar la prueba es importante dejar que la muestra coagule y se separe el suero, se pueden utilizar muestras congeladas siempre y cuando no sean de congelación repetida y al momento de dispensar la muestra este perfectamente homogénea y descongelada, la prueba evita el uso de muestras hemolizadas y/o muy turbias. Para análisis de leche se deben evitar las muestras de calostro. es importante mencionar que cada equipo y/o kit presenta sus propios requisitos y pueden variar de unos a otros.

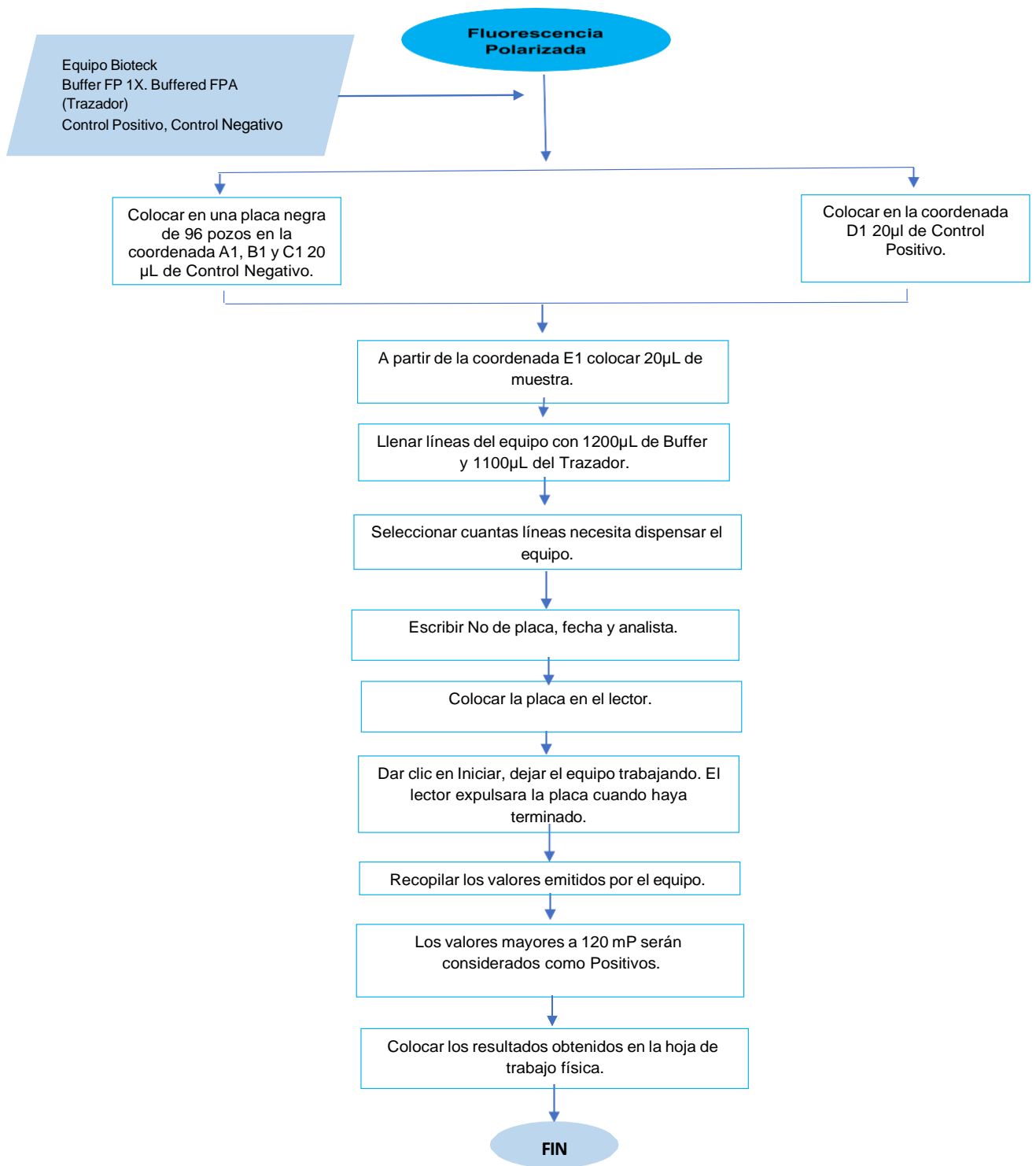


Figura 21. Diagrama de flujo de fluorescencia polarizada.

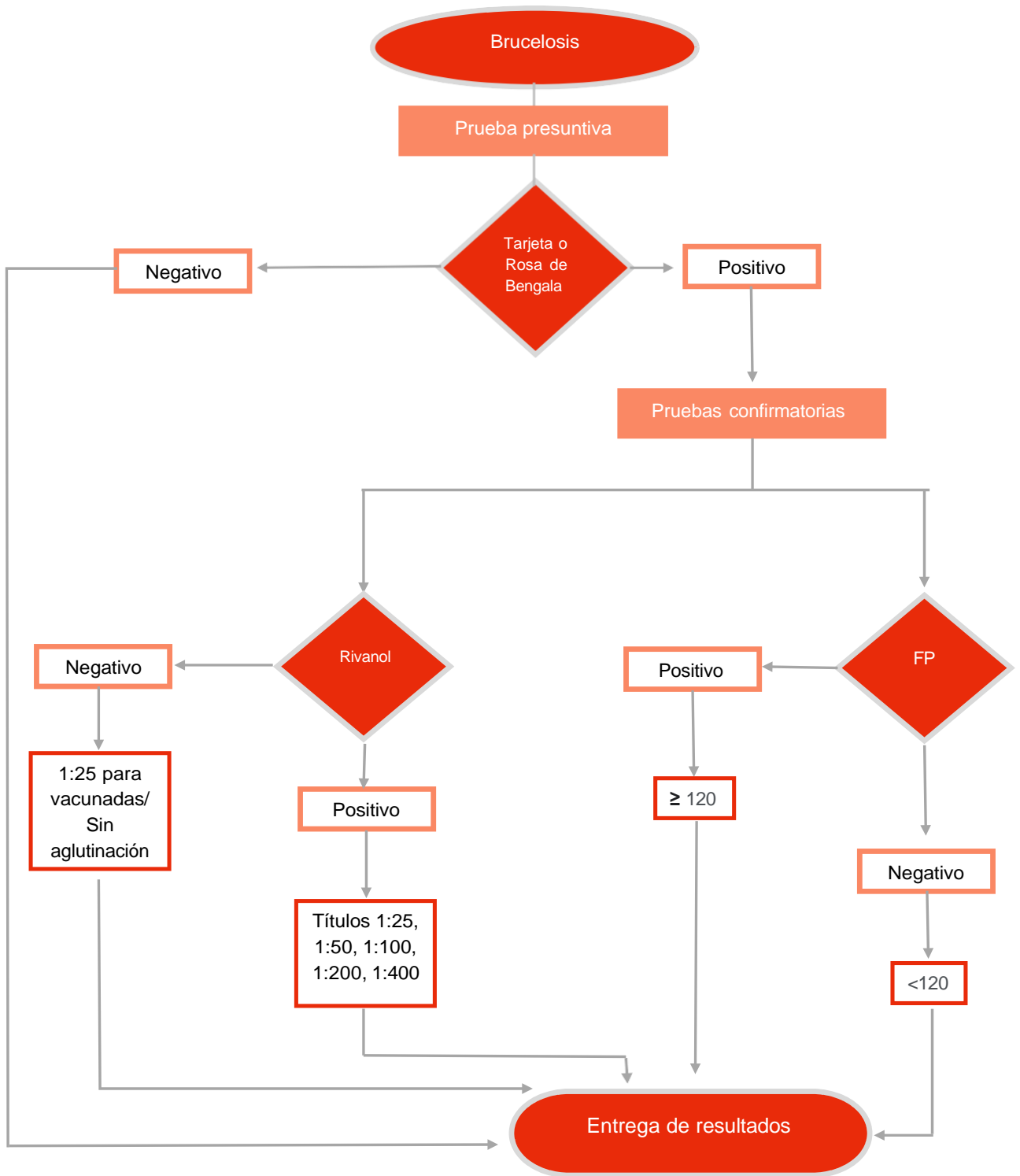


Figura 22. En manera de resumen se presenta un algoritmo para el diagnóstico serológico de Brucelosis para muestras de suero.

Seguimiento de muestras con resultado positivo a pruebas serológicas.

Los animales que se hayan diagnosticado con Brucelosis iniciaran una investigación epidemiológica, se deberán muestrear los hatos colindantes, así como aquellos animales y hatos que hayan estado en contacto con el o los animales positivos en un lapso de 60 a 90 días después de la prueba inicial para identificar otros animales enfermos o en su defecto constatar que el hato se encuentre libre de la enfermedad.

En caso de resultar animales confirmados estos deben ser aislados y ser sacrificados en un rastro autorizado por la secretaria en un periodo de 3 a 10 días después de la comunicación de los resultados. A su vez se debe realizar la limpieza y desinfección de las instalaciones.

Otras técnicas de diagnóstico.

La brucelosis es una enfermedad que se da en todo el mundo y es de notificación obligatoria en la mayoría de los países.

Para la prevención y la erradicación de la enfermedad se ha recomendado el monitoreo de los animales por medio de pruebas serológicas y la vacunación en zonas con alta prevalencia, así como la eliminación de los animales confirmados. En los países en los que no se puede erradicar o llevar a cabo la vacunación se debe centrar en la prevención de la infección en los humanos, higiene ocupacional, inocuidad alimentaria y seguridad en los laboratorios.

La pasteurización de los productos derivados de la leche es una estrategia para evitar la transmisión de los animales a los humanos, así como evitar el consumo de alimentos que no pasteurizados.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.

- Se recomienda realizar un aislamiento de *Brucella spp* en muestra de sangre.
- Prueba rosa de bengala, es útil para la detección sin embargo hay que comprobar con otras técnicas de aglutinación en suero que deberán tomarse después del inicio de los síntomas en el animal.

También pueden utilizarse las siguientes técnicas:

Prueba de fijación del complemento.

Determina los títulos fijadores de complemento contra cepas lisas de *Brucella spp*, es aprobada por la OIE por su alta sensibilidad y especificidad además se considera la prueba de referencia internacional.

La cual es la prueba más sensible y específica para el diagnóstico de brucelosis sin embargo requiere de mucho tiempo para realizarla y de mayor cantidad de material, se clasifica como una prueba poco accesible, por lo que es recomendada como prueba de confirmación ante resultados sospechosos en la prueba de tarjeta y rivanol.

Esta prueba es utilizada para el diagnóstico de ganado bovino, ovino, caprino equino, suino y de igual modo para humanos.

Prueba de PCR multiplex (Bruce ladder).

Presenta una alta sensibilidad, además permite identificar cuando una enfermedad se encuentra activa y la logra distinguir una etapa temprana de la misma.

Esta prueba permite diferenciar las especies de *Brucella* incluyendo la cepa S19 y RB51.

La PCR de ADN de cepas de *Brucella abortus* amplificó 5 fragmentos 1.682, 794, 587, 452 y 152 pb de tamaño, la PCR con ADN de *B. abortus* no produjo el fragmento 587 pb mientras que *B. abortus* RB51 se distinguió por la ausencia de los fragmentos 1.682 pb y 1.320 además presentó un fragmento adicional 2.524 pb.

Prueba de ELISA

Ha sido la prueba prescrita por la OIE como prueba confirmatoria a nivel internacional presenta una sensibilidad del 97.5% y 99.8% de especificidad sin embargo tiene como desventaja la utilización de equipos especializados, insumos costosos y alta capacitación para el personal.³⁷

Detecta anticuerpos frente a *Brucella abortus* en muestras individuales o mezcla de hasta 10 muestras individuales en leche, plasma y suero de bovino.

Las placas de poliestireno se encuentran tapizadas con un antígeno. Las diluciones de las muestras se incuban en los pocillos de dichas placas. Si existe un anticuerpo específico frente a *Brucella abortus* se une al antígeno y forma un complejo antígeno-anticuerpo. Las inmunoglobulinas no unidas en la reacción con el antígeno se eliminan en los procesos de lavado, posteriormente se añade un conjugado el cual es susceptible de unirse a los anticuerpos que formaron el complejo con el antígeno de *Brucella abortus*. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos frente a *B. abortus* presente en la muestra.

Esta prueba tiene la ventaja de distinguir animales vacunados con la cepa S19 de animales infectados.

Para llevar a cabo la prueba se deben seguir algunas recomendaciones como:

No mezclar reactivos de diferentes lotes.

Dejar los kits fuera del refrigerador de 2 a 3 horas hasta que alcancen la temperatura ambiente, así como mantener las placas en su bolsa sellada hasta el momento del análisis.

Monitorear de forma continua la temperatura del laboratorio cuidando de no superar los 25°C.

Utilizar la técnica de pipeteo estándar para la preparación de diluciones y pipeteo inverso para la adición de reactivos.

Cerciorarse de la calidad del agua, utilizar únicamente agua destilada para evitar contaminaciones.

La incubación de las placas debe ser realizadas en el tiempo más preciso posible.

Cabe resaltar que el procedimiento varía de acuerdo con el Kit utilizado, por lo que se deberá seguir el inserto.

Medidas de prevención contra la Brucelosis en humanos como parte del control de calidad de la leche.

Pasteurización.

Como una medida de prevención contra la brucelosis en humanos adquirida por ingerir productos contaminados con *Brucella spp.* se utiliza el método de pasteurización y ultrapasteurización este procedimiento se monitorea como parte del control de la calidad en alimentos y su objetivo es eliminar por completo *Brucella spp.* es por ello que se ha hablado sobre que consumir alimentos no pasteurizados es un riesgo para la salud por la probabilidad de que estos se encuentren contaminados.

La leche deberá someterse a un tratamiento térmico con temperatura y tiempo determinados con la finalidad de garantizar su inocuidad independientemente de cuál sea su uso posterior. La pasteurización además permite que la fecha de caducidad sea de 7 días aproximadamente, para limitar el crecimiento de microorganismos estos productos requieren estar refrigerados durante su distribución y almacenamiento, mientras que el proceso de ultrapasteurización permite extender la fecha de caducidad hasta por meses y únicamente requiere refrigeración después de abrir el envase.

La leche y los productos derivados de esta según la *NOM-243-SSSA1-2010. Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba* señala los parámetros ideales para llevar a cabo el proceso de pasteurización.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Pasteurización lenta	63°C	30 minutos
Pasteurización rápida	72°C	15 segundos
Ultrapasteurización/esterilización	135 a 149°C	2-8 segundos

Tabla 12. Temperatura y tiempo de procesos térmicos aplicados a la leche.

Limites permisibles de microorganismos y toxinas en leche cruda.

De acuerdo con la NOM-243-SSSA1-2010 los productos como leche, formula láctea, producto lácteo combinado, pasteurizados y deshidratados no podrán rebasar los siguientes limites permisibles de microorganismos ya que representan un riesgo para la salud, dentro de los laboratorios de la industria de alimentos como parte de la calidad deberán de realizarse los análisis pertinentes para la identificación y cuantificación de estos microorganismos. De ninguna manera se podrá poner en riesgo la integridad del consumidor, el control de calidad tiene como objetivo garantizar que el producto final ha sido cuidado en cada proceso para obtener un producto inocuo.

Microorganismo/toxina	Límite máximo
Organismos coliformes totales	≤20 UFC/g o mL En punto de venta.
<i>Staphylococcus aureus.</i>	≤10 UFC/g o mL En planta.
<i>Salmonella spp.</i>	≤10 UFC/g o mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausente en 25g o mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	≤ 3 NMP/g o mL
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausente en 25 g o mL
Enterotoxina estafilococcica	Ausente en 25 g o mL
Toxina botulinica	Negativa
	Negativa

Tabla 13. Límites máximos de microorganismos y toxinas para leche y sus derivados.

Principales áreas de oportunidad detectadas en el área donde desempeñe mi función profesional

El laboratorio en el cual me desempeñe contaba con espacios reducidos para todas actividades que debían realizarse, en ocasiones no era suficiente el espacio para resguardar tantas muestras durante el periodo de almacenaje que se derivaba posterior a la emisión de resultados.

El laboratorio cuenta con infraestructura para realizar técnicas con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Brucella spp.* en el laboratorio, sin embargo, se tendría que considerar que los tiempos de respuesta para la emisión de resultados serían mayores debido a que hay técnicas que llevan más tiempo para la preparación de la muestra, tiempo de análisis e interpretación de resultados por lo que se tendrían que ajustar los tiempos de respuesta en caso de realizar nuevas técnicas.

Conclusiones.

Existen diferentes pruebas que apoyan al diagnóstico de la *Brucella* sin embargo no se debe considerar utilizar una única prueba ya que existen reacciones falsas positivas debido a que existen bacterias Gram (-) que pueden generar reacciones cruzadas o bien obtener un resultado positivo por la vacunación cuando con la cepa S19 así como obtener reacciones falsas negativas por el uso de pruebas de baja sensibilidad, infecciones tempranas o tardías la OIE recomienda utilizar al menos dos pruebas una como tamiz y otra como prueba confirmatoria.

La prueba de fluorescencia polarizada es una buena opción para utilizarse como prueba confirmatoria ya que presenta una alta sensibilidad y permite discriminar animales vacunados con cepa S19 de animales infectados, además de ser una prueba rápida que no requiere pasos repetitivos ni lavados y requiere una pequeña cantidad de muestra.

La prueba de ELISA es la prueba confirmatoria recomendada por la OIE y la más utilizada a nivel mundial, presenta una alta sensibilidad y especificidad sin embargo requiere de equipo especializado, insumos costosos, personal altamente capacitado además de que requiere más tiempo para realizarse la prueba.

Para lograr la erradicación de la enfermedad se requiere que se sigan los protocolos y la normatividad que aplique en los ranchos como implementar un programa de vacunación, así como del monitoreo de los animales, separar animales que han resultado positivos y muestrear animales que pudieron estar en contacto

El laboratorio de calidad dentro de las industrias es un pilar fundamental que proporciona datos importantes durante todos los procesos para toma de decisiones, para ello es esencial apearse a la normatividad y trabajar conforme a los procedimientos y en cuanto haya una modificación realizar los cambios pertinentes.

Para garantizar la veracidad de un resultado emitido además de apearse a los procedimientos, en primer lugar, el profesional debe asegurarse que la muestra es idónea es por ellos que se debe contar con personal capacitado para cada una de las actividades que se ejecuten en el laboratorio, deberán ser evaluados con pruebas de aptitudes de forma periódica, se requiere tener todos los equipos e instrumentos calibrados y con mantenimiento en tiempo y forma, conservar las muestras y reactivos de forma adecuada, estos últimos deberán verificarse previo a trabajar con muestras , las auditorias internas son una herramienta que permite identificar desviaciones en los procedimientos para ser corregidas de manera oportuna, se debe tener presente que la mejora continua forma parte del sistema de gestión de calidad.

El BQD por su formación académica tiene todas las herramientas para poder desempeñarse en varias áreas, los profesionales que laboramos en empresas con Sistema de Calidad implementado tenemos una gran responsabilidad, trabajar en cada proceso de manera eficiente y eficaz con la finalidad de aportar y a su vez mejorar nuestras habilidades y conocimientos en cada uno de los procedimientos que desarrollamos.

Glosario

Aglutinación. Es la interacción entre un anticuerpo y una partícula antigénica que se visualiza por la formación de agregados o grumos.

Anticuerpo. Es una proteína que se encuentra en el plasma, la cual es sintetizada por los linfocitos B en respuesta a la introducción de un antígeno.

Antígeno. Sustancia que puede inducir una respuesta inmunitaria.

Aseguramiento de Calidad. Acciones coordinadas por parte de todas las áreas de una Empresa para ratificar que el servicio o producto brindado satisface las necesidades del Cliente.

Calidad. Conjunto de características de una entidad que le confieren la aptitud para satisfacer la necesidad del Cliente.

Control Negativo. Suero preparado con muestras de valor conocido Negativo a *Brucella spp*, utilizado para probar la validez de la prueba.

Control Positivo. Suero preparado con muestras de valor conocido Positivo a *Brucella spp*, utilizado para probar la validez de la prueba.

Diagnóstico. Análisis de datos para evaluar y lograr distinguir cierta condición.

Endémico: Que afecta una región en específico o país.

Erradicación: Eliminación definitiva de Brucelosis.

Especies lisas: Se refiere a las especies de *Brucella spp*. que forman colonias lisas las cuales son: *B. abortus*, *B.melitensis* y *B. suis*.

Especies rugosas: Se refiere a las especies de *Brucella spp*. que forman colonias rugosas como: *B. ovis* y *B. canis*.

Especificidad: Tasa de verdaderos negativos. Cuanto mayor sea este número más sanos serán diagnosticados adecuadamente, el valor de los falsos positivos será menor.

$$\text{Especificidad: } \frac{\text{verdaderos negativos (no infectados)}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

Hato. Conjunto de animales de ganado.

Hemólisis. Proceso de destrucción de los eritrocitos.

Incidencia. Casos nuevos que se presentan en una población en un tiempo determinado.

Inocuidad: Ausencia de contaminantes, toxinas, adulterantes y cualquier sustancia que pueda ser nociva para la salud.

Leche. Sustancia líquida y blanca que segregan las hembras de los mamíferos para alimentar a sus crías y está compuesta principalmente por caseína y lactosa.

Mezcla homogénea: Mezcla en la cual su apariencia y su composición son uniformes. Los componentes no pueden distinguirse entre sí a simple vista.

Pool. Mezcla formada a partir de varios sueros.

Prevalencia: Porcentaje de la población que se encuentra enferma al momento de evaluar un padecimiento en una población.

Riesgo: Probabilidad de contraer la enfermedad.

Sensibilidad: Tasa de verdaderos positivos. Cuanto mayor es el valor de la sensibilidad más enfermos serán diagnosticados adecuadamente, el valor de los falsos negativos será menor.

$$\text{Sensibilidad: } \frac{\text{verdaderos positivos (infectados)}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

Sistema de gestión de calidad. Conjunto de Normas y Procedimientos que se deben seguir para controlar a una Organización con la finalidad de cumplir con las necesidades del cliente.

Suero. Componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de ésta y eliminar el coágulo resultante.

Trazabilidad/rastreabilidad: Capacidad de mantener identificados todos los elementos inmiscuidos durante los procedimientos.

Verificación. Comprobación del adecuado funcionamiento del Antígeno y de los Controles.

Zoonosis. Enfermedades que se transmiten entre animales vertebrados y humanos.

Bibliografía

1. Mosquera, X. et al. (2008) *Detección de Brucella abortus por pcr en muestras de sangre y leche de vacunos*, Revista MVZ Córdoba, vol. 13. Colombia.
2. Wilfert C. (1986) *Brucella*. Zinsser, Microbiología. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18 Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; p. 764-71.
3. Secretaría de Salud. (2012) *Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis*. Dirección General de Epidemiología.
4. Oliveira C. et al. (2015) *Prevalencia de la Brucella spp en humanos* Rev. Latino-Am. Enfermagem vol.23 Brasil.
5. Guzmán R. et al. (2016) *Brucelosis: zoonosis de importancia en México*. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. México
6. Gobierno Nacional de México. *Situación actual de la brucelosis en los animales en México* <https://www.gob.mx/pronabive/articulos/situacion-actual-de-la-brucelosis-en-los-animales-en-mexico?idiom=es>.
7. Prieto, M. et al. (2008). *Concepto de calidad en la industria agroalimentaria. Interciencia Disponible en:*<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=339/33933405>.
8. Avendaño, D. (2006) *El impacto de la Iniciativa de inocuidad alimentaria de Estados Unidos en las exportaciones de hortalizas frescas del Noroeste de México* Revista SciELO Vol.18. México
9. Mercado, C. (2007) *Los ámbitos Normativos, la gestión de la Calidad y la Inocuidad alimentaria: una visión integral*. Universidad Central de Venezuela.
10. Castro, H. et al. (2005). *Brucelosis: una revisión práctica. Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(2), 203-216. Recuperado en 24 de octubre de 2022, de

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000200008&lng=es&tlng=es.

11. Koneman, E. (2006) *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* 6ª edición. USA. Pp.1082, 1340.
12. Ortíz, M. et al. (2014) *Prueba de Rosa de Bengala y/o Tarjeta en el Diagnóstico de Brucelosis Bovina*. SENASA.
13. Saldaña, Í. (2015) *Interferencia causada por hemólisis en la determinación de 25 constituyentes bioquímicos en el autoanalizador ADVIA 1800*. Revista Scielo vol. 76, Lima.
14. Saldaña, Í. (2016) *Interferencia en las determinaciones de 24 constituyentes bioquímicos en el autoanalizador ADVIA 1800, causada por adición in vitro de emulsión comercial de nutrición parenteral a un pool de sueros*. Revista Scielo vol 77, Lima.
15. Bercovich, (1998): *Maintenance of Brucella abortus free herds: A review with emphasis on epidemiology and the problems of diagnosing brucellosis in areas of low prevalence*. Veterinary Quarterly. 20(3) pp. 81 – 88
16. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2004). *Manual de pruebas de diagnóstico y de vacunas para animales terrestres (mamíferos, aves y abejas)*. Quinta edición.
17. Acosta, A. (2010) *Microbiología y Serología de la Facultad de Medicina Veterinaria*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
18. NOM-056-ZOO-1995 *Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria*. Recuperado el 20 de agosto de 2022 en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/zoo/zoo056.pdf>
19. Nielsen K. et al. (1995) *Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis*. Animal diseases research institute, Nepean.

- 20.** Organización Mundial de la salud. (OMS) (29 julio 2020) *Brucelosis*. Recuperado el 22 de agosto de 2022 de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/brucellosis>.
- 21.** Organización Mundial de Sanidad Animal. Fundada como OIE *Brucelosis*. Recuperado el 20 de agosto de 2022 de: <https://www.woah.org/es/enfermedad/brucelosis/>
- 22.** NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. *Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado, y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba*. Recuperado el 22 de agosto de 2022 de: https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5160755
- 23.** World Health Organization.WHO (2011) *Recommended Strategies for the Prevention and Control of Communicable Diseases*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67088/WHO_CDS_CPE_SMT_2011.13.pdf
- 24.** Organización Mundial de la Salud (OMS) (diciembre 2015). *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria*. Recuperado el 20 de agosto de 2022 de: <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- 25.** Subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Centro Nacional de programas preventivos y control de enfermedades. *Guía para el tratamiento del paciente con Brucelosis*. Recuperado el 20 de agosto de 2022 de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/36343/GuiaBrucelosis.pdf>
- 26.** Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (16 de febrero de 2022) *Situación actual del control de brucelosis en México*. Recuperado el 18 de agosto de 2022 de: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-brucelosis-en-mexico>.

- 27.** Boletín epidemiológico. Vigilancia Epidemiológica Semana 30 de 2022. *Enfermedades zoonóticas. Brucelosis*. Recuperado el 18 de agosto de 2022 de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/751739/sem30.pdf>
- 28.** Subsecretaria de prevención y promoción de la salud. Dirección General de Epidemiología. *Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la Brucelosis*. Recuperado el 20 de agosto de 2022 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/470925/LVL_Bru_4T.pdf
- 29.** Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, *Para la vigilancia epidemiológica*, publicada en el Diario Oficial de la Federación. Recuperada el 18 de agosto de 2022 en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5288225&fecha=19/02/2013#gsc.tab=0
- 30.** Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-2012. *Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano* publicada en el Diario Oficial de la Federación. Recuperada el 18 de agosto de 2022 de: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5258723&fecha=11/07/2012#gsc.tab=0
- 31.** Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. *Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo*. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. Recuperado el 20 de agosto 2022 en: <https://www.cndh.org.mx/DocTR/2016/JUR/A70/01/JUR-20170331-NOR14.pdf>
- 32.** Rojas, X. et al. (2004). *Utilización de los test de Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa) en el diagnóstico de brucelosis de camélidos*. Recuperado el 20 de agosto de 2022 de: <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2004000100006>
- 33.** Rivera A. et al. (2004) *Ensayo de validación de la prueba de fluorescencia polarizada para el diagnóstico serológico de brucelosis bovina*. Recuperado el 17

de agosto de 2022 de:
https://www2.sag.gob.cl/pecuaria/bvo/noviembre_2004/9.htm

34. Dajer A. et al. (1999) *Evaluation of a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico*. Preventive Veterinary Medicine.

35. Ibarra E. et al. (2018) *Evaluación comparativa de la prueba de fluorescencia polarizada como diagnostico confirmativo de la brucelosis bovina en la provincia del Carchi Ecuador*. Recuperado el 17 de agosto de 2022 de:
<https://popups.uliege.be/2295-8010/index.php?id=460&file=1>

36. Nielsen K. et al. (2001) *Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis*. A review. Immunoassay Immunochem, 22, 183-201.

37. Perrett et al. (2010) *Evaluation of Competitive ELISA for Derection of Antibodies to Brucella Infection in Domestic Animals*. 51, 314-319.

38. López I. et al. (2008) *Evaluation of a Multiplex PCR assay (Bruce-lader) for Molecular Typing of all Brucella species, including the vaccine strains*. Fecha de consulta 02 de septiembre de 2022. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566117/>

39. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. (2007) 5a ed. Washington: Oficina de Imprenta del Gobierno de los Estados Unidos. p. 1-113.

40. Lara H. et al. (2008) *Bioseguridad en el laboratorio: medidas importantes para el trabajo seguro* Bioquímica Vol. 33 Número 2, Sociedad Mexicana de Bioquímica, México.pp. 59-70.

41. Freer E. et al. (2001). *Brucella: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos*. Revista Costarricense de Ciencias Médicas, Recuperado el 15 de octubre de 2022 de:

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482001000100008&lng=en&tlng=es.

42. Lozano E. et al. (2022). *Brucelosis bovina y humana en el sur de México: una zoonosis desatendida*. Revista chilena de infectología. Recuperado el 15 de octubre de 2022 de: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182022000200157>.

43. Arciga, G. et al. (2021) *Estudio de casos confirmados de brucelosis humana en Puebla, México*. Revista chilena de infectología Recuperado el 15 de octubre de 2022 de: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182021000200281>

44. BRUCELLA FPA – EllieLab (2020) *Brucella -Fluorescencia Polarizada*. Recuperado el 01 de octubre de 2022 de: <https://ellielab.com/es/brucella-fpa-3/>

45. Gobierno de México (2019). *Diagnóstico de la Brucelosis en los animales*. Recuperado el 01 de octubre de 2022 en: www.gob.mx

46. Mejía, K. et al. (2012) *Comparación de las pruebas Rosa de Bengala y rivanol con ELISA para el diagnóstico de brucelosis bovina*. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. Vol. 13. España.

47. Dájer A. et al. (1998) *Uso de las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para el diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán, México*. Vet Mex. 29(2):167-171.

48. Molecular devices (2022) *Polarización de fluorescencia (PF)* Obtenido el 1 de octubre de 2022 de: <https://es.moleculardevices.com/tecnology/fluorescence-polarization>.

49. Gobierno de México (2013). *Participa INIFAP en capacitación sobre diagnóstico de Brucelosis, mediante la prueba de fluorescencia polarizada*. Recuperado el 01 de octubre de 2022 de: www.gob.mx

50. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. *Campaña Nacional contra la brucelosis en animales*. Recuperado el 1 de octubre de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/106184/NOM-041-ZOO-1995.pdf>.

- 51.** Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. *Ficha técnica ABA Test Anillo en leche.* Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/465448/Aba_Test_Leche_.pdf
- 52.** Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. *Ficha técnica ABA Test Tarjeta al 8%.* Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/465382/Aba_Test_Tarjeta_al_8.pdf
- 53.** Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. *Ficha técnica ABA Test Rivanol.* Recuperado de: <https://www.gob.mx/pronabive/documentos/aba-test-rivanol?state=published>.
- 54.** Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. *Ficha técnica BRUCEL-R19.* Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/465452/BruceL_R-19.pdf
- 55.** Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. *Ficha técnica BRUCEL-N19.* Recuperado de: <https://www.gob.mx/pronabive/documentos/bruceL-n-19?state=published>
- 56.** Lopetégui P. (1997) *Vacuna RB51 en la erradicación de brucelosis bovina en Chile.* TECNO VET. Año No.3
- 57.** Castro, H. et al. (2005). *Brucelosis: una revisión práctica.* *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(2), 203-216. Recuperado en 24 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000200008&lng=es&tlng=es.