

DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE BRUCELOSIS MEDIANTE MÉTODOS SEROLÓGICOS Y MOLECULARES

Comparative diagnosis of brucellosis by serological and molecular methods

Cinthya Y. Burboa Meza

TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Laboratorio de Biología Molecular. Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

Alexandra Zazueta Avitia

TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Laboratorio de Biología Molecular. Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

David Ramírez Alvarado

TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Laboratorio de Biología Molecular. Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

Miguel A. Segura Castruita

TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Laboratorio de Biología Molecular. Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

Paola A. Palmeros Suarez

Departamento de Producción Agrícola. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco, México.

Juan F. Gómez-Leyva

TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Laboratorio de Biología Molecular. Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: jflyva@hotmail.com

Resumen

La brucelosis es una enfermedad infecciosa limitante del desarrollo ganadero, que afecta en gran parte la economía pecuaria, siendo considerada como una de las zoonosis de mayor importancia y distribución a nivel mundial. El diagnóstico temprano de esta enfermedad es una herramienta esencial en su control y erradicación. Los métodos reconocidos por la NOM-041-ZOO-1995 como la prueba de tarjeta y fijación de complemento presentan limitaciones en el diagnóstico, comparado con la técnica molecular de PCR. En el presente trabajo se realizó un diagnóstico comparativo de *Brucella* spp. mediante la amplificación por PCR del gen que codifica para una proteína localizada en la membrana externa (Omp2a) de *Brucella* spp. y pruebas serológicas en muestras de sangre, leche y queso de caprinos y bovinos. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad en la detección por la técnica de PCR, mientras que la prueba de tarjeta y fijación de complemento mostraron inconsistencias por la aparición de falsos positivos y negativos. Basado en los resultados se sugiere incluir la técnica de PCR dentro de la Norma Oficial Mexicana como una alternativa objetiva en el diagnóstico rutinario de la brucelosis.

Palabras clave: *Brucella* spp., rosa de bengala, fijación de complemento, PCR.

Abstract

Brucellosis is an infectious disease that limits livestock development and greatly affects the livestock economy, being considered one of the most important and widely distributed zoonoses worldwide. Early diagnosis of this disease is an essential tool in its control and eradication. The methods recognized by NOM-041-ZOO-1995, such as the card test and complement fixation, present limitations in the diagnosis, compared to the PCR molecular technique. In the present work, a comparative diagnosis of *Brucella* spp. was performed by PCR amplification of the gene coding for a protein located in the outer membrane (Omp2a) of *Brucella* spp. and serological tests in blood, milk and cheese samples from goats and cattle. The results showed a higher sensitivity in the detection by PCR technique, while the card test and complement fixation showed inconsistencies due to the occurrence of false positives and negatives. Based on the results, it is suggested to include the PCR technique in the Mexican Official Standard as an objective alternative in the routine diagnosis of brucellosis.

Keywords: *Brucella* spp, rose bengal, complement fixation, PCR.

Introducción

La brucelosis es una enfermedad zoonótica infectocontagiosa de distribución mundial, que afecta a diferentes especies de animales, principalmente bovinos, caprinos, ovinos y porcinos; siendo la zoonosis más importante en nuestro país (Guzmán et al., 2016) El agente etiológico de la enfermedad es una bacteria gramnegativa que pertenece al género *Brucella* spp., existiendo varias especies que están estrechamente relacionadas, de las cuales las especies patógenas para los animales son: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis* (Bagheri et al., 2020). Las dos primeras de primordial importancia, debido a su amplia distribución y capacidad de producir la enfermedad (Murugaiyan et al., 2020).

La fuente primaria de infección se presenta por las hembras grávidas que, al abortar o parir, expulsan grandes cantidades de la bacteria con el feto, el líquido amniótico y las membranas fetales (Ferrero et al., 2014). También pueden difundir la enfermedad las hembras que, poco después de abortar, eliminan *Brucella* spp. en la secreción vaginal, y vacas que, al parecer sanas, segregan leche que contienen *Brucella* spp. (Mol et al., 2020).

Las principales vías de infección humana se pueden realizar a través de la ingestión de leche o sus derivados procedentes de animales enfermos, cuando los productos lácteos no han sido pasteurizados en forma adecuada, pudiendo también transmitirse a través del contacto con animales infectados en las prácticas rutinarias del campo (Bagheri et al., 2020). La brucelosis es una enfermedad de curso crónico que ocasiona grandes pérdidas económicas en la ganadería al afectar los órganos reproductores, producir abortos en el último tercio de la gestación, disminución de la producción láctea, alargamiento del periodo interparto del ganado, rompimiento de las líneas genéticas, infertilidad y esterilidad (Samartino, 2013); además de la presentación de signos inespecíficos, lo cual dificulta su diagnóstico y es causa de confusión con otras patologías.

Dependiendo de la sensibilidad, definida como la habilidad de un método para identificar correctamente un animal enfermo y especificidad, que indica la habilidad del método para identificar correctamente animales sanos o animales que no están infectados, los métodos de diagnóstico para la brucelosis pueden ser usados como pruebas tamiz o confirmatorias de la enfermedad. Tradicionalmente, las pruebas tamiz son baratas, rápidas y altamente sensibles, pero no son necesariamente específicas; por otra parte, las pruebas confirmatorias deben ser sensibles y específicas (Kaltungo et al., 2013). El aislamiento del patógeno que está ocasionando la enfermedad, permitiría obtener el diagnóstico correcto siendo esta técnica 100% específica. El aislamiento de *Brucella* es una prueba absoluta de que el animal está infectado; sin embargo, no todos los animales infectados dan un cultivo positivo (Hosein et al., 2017), debido a que algunos animales que presentan resultados negativos en el cultivo pueden estar

infectados, principalmente debido a una mala toma de muestra, el tamaño del inóculo y las condiciones de cultivo requeridas. El diagnóstico adecuado es uno de los obstáculos clave para la erradicación completa de la brucelosis (Gwida et al., 2012). El diagnóstico de brucelosis bovina se realiza fundamentalmente por métodos serológicos como la prueba en placa de rosa de Bengala (RBPT) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que no siempre son sensibles o específicos debido a la reactividad cruzada con otros antígenos bacterianos (Neha et al., 2017). En México, se realiza la prueba del antígeno teñido con rosa de bengala como tamiz y los sueros reaccionantes deben ser procesados con la prueba lenta en tubo (Wright), rivanol y 2-mercaptoetanol (2-ME) en forma simultánea (Guzmán et al., 2016). Además, se utiliza la prueba de fijación de complemento como definitiva (NOM-041-ZOO-1995). Esta metodología ha demostrado ser muy eficaz en el diagnóstico de la enfermedad, sin embargo, son técnicas lentas al considerarse que para el aislamiento e identificación de *B. abortus*, es necesario un periodo de incubación mayor a una semana y los anticuerpos se presentan en sangre después de seis meses de la infección, además que en algunas pruebas se utilizan compuestos tóxicos como el 2-ME. Debido a la falta de subjetividad y en algunos casos de especificidad y sensibilidad de las técnicas en uso, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para la detección de ADN de *Brucella* en fluidos corporales que tienen un número bajo de organismos de *Brucella* no viables, permite agilizar el diagnóstico de la enfermedad, obteniéndose resultados confiables, con el fin de implantar un programa de control y erradicación (Çiftci et al., 2017). El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis comparativo entre las pruebas serológicas clásicas (Tarjeta y Fijación de Complemento) y moleculares (PCR) para la identificación de brucelosis en sangre y lácteos en caprinos y bovinos.

Materiales y métodos

Material biológico

Se analizaron un total de 105 muestras de las cuales, 23 provenían de leche y 5 de quesos, obtenidas de expendios localizados en diversos municipios de Jalisco. Las muestras de sangre se obtuvieron de un muestreo aleatorio de 15 bovinos y 62 caprinos. Se punzaron por vía coccígea y yugular respectivamente con equipo Vacutainer con anticoagulante.

Prueba de Tarjeta (PT)

Se colocó en una placa de vidrio una gota de 0.3 mL de muestra (suero no hemolizado para las muestras de sangre) obtenido a partir de la sangre y una gota de leche junto con 0.03 mL del antígeno elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, teñido con rosa de bengala en ácido láctico a una concentración celular del 8% para realizar el diagnóstico en bovinos y del 3% para caprinos. Ambas gotas se mezclaron perfectamente con ayuda de un palillo y se realizaron movimientos circulares durante cuatro minutos. Se efectuó la lectura observando aglutinación en la placa para un resultado positivo y ausencia de ésta para dictaminar un resultado negativo.

Prueba de Fijación de Complemento (FC)

Se realizó de acuerdo a la técnica de García, (1988) basada en la fijación en frío y 100% de hemólisis. Se utilizó el antígeno para prueba en tubos, diluido 1/200 preparado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*; dos unidades de complemento y hemolisina comercial diluida 1/4000. Se consideraron como positivos cuando se presentó aglutinación en los títulos 1:8 en bovinos mientras que en caprinos 1:5 o superiores.

Extracción de DNA de sangre y lácteos

La extracción de DNA se realizó de acuerdo a una modificación del protocolo descrito por Leal et al., 1995. Se tomaron 400 µL de muestra de sangre y se centrifugaron a 2000 rpm por 3 min, el pellet fue resuspendido en 400 µL de la solución de lisis de eritrocitos (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 100 mM EDTA-Na₂ pH 7.4) esta operación se repitió tres veces hasta obtener una pastilla blanca. Las muestras de leche fueron mantenidas en reposo por 3 h a 8 °C y se tomaron 400 µL de la parte superior, mientras que para el queso se tomaron directamente 400 mg. Todas las muestras fueron resuspendidas en 400 µL de buffer de lisis (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) más 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL) para las muestras sanguíneas, mientras que a las muestras de leche y queso se les adicionó 10 µL. La mezcla se incubó a 55 °C durante 30 min y posteriormente, se agregaron 400 µL de fenol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. A la fase acuosa se adicionaron 200 µL de acetato de amonio 7.5 M y un volumen igual de isopropanol, manteniéndose a -20 °C por 1h. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 300 µL de etanol frío al 70%, se secó la pastilla de DNA y se resuspendió en 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA-Na₂). El DNA se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 nm.

Amplificación del gen omp2 por PCR

La amplificación del producto de 689-827 pb del gen *omp-2* en *Brucella* spp. se realizó en un volumen total de 25 µL conteniendo 20 pmol de cada iniciador (Bru 1: 5'-GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA y Bru 4: 5'-ACCCAGACAGCCCAA), amortiguador 1X (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 9.0, 1% de Triton X-100), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los desoxiribonucleótidos (dNTP's), 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 100 ng de DNA; empleándose el siguiente programa: 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 90 seg, 60 °C por 60 seg y 72° C por 90 seg, seguidos de una extensión final de 72 °C durante 5 min. Para obtener mayor sensibilidad en la prueba, se realizó un PCR semianidado utilizando los iniciadores Bru1: 5'-GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA y Bru3: 5'-ACCAGCCATTGCGGTCGGTA, los cuales amplifican un fragmento de 193 pb con las condiciones antes descritas. Los productos de PCR fueron colocados un gel de

agarosa al 1.2% en regulador SB 1X (Borato de sodio) y se tiñeron con bromuro de etidio para ser observados en un transiluminador UV. Se utilizaron las cepas vacunales de *B. abortus* RB51y *B. melitensis* REV-1 como controles positivos de la prueba.

Resultados

La extracción del DNA en las diferentes muestras de sangre, leche y queso fue posible con el método descrito en el presente trabajo (Figura 1A) generando un DNA de alta pureza con una relación promedio de 260/280 de 1.76, mientras que los oligos Bru1, 3 y 4 amplificaron correctamente los fragmentos de 800 y 700 pb para *B. abortus* y uno de 900 pb para *B. ovis*, así como el PCR semi-nested con los oligos Bru 1-3 de 193 pb (Figura 1).

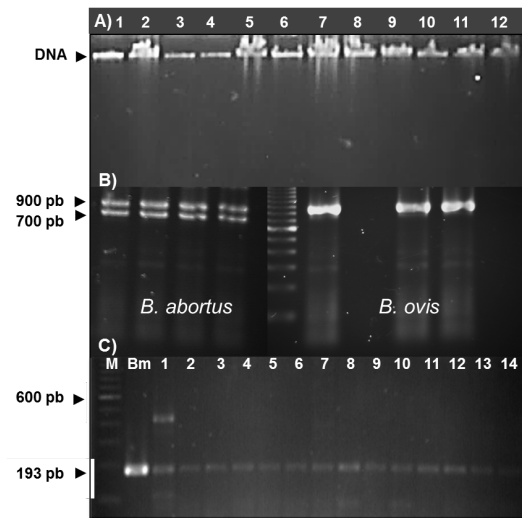


Figura 1. A) Gel de agarosa al 1.2% que muestra el DNA extraído de Sangre de bovino1-6, Caprino 7-10 y Queso 12 y 12. B) Fragmentos amplificados por PCR anidado utilizando los iniciadores Bru1- Bru4 se observa doble producto para los aislados de *B. abortus* y un producto único para el resto de las *Brucellas* spp. C) Productos de amplificación semi-anidado con los iniciadores Bru1 y Bru3 que amplifica un fragmento único de 193 pb del gen *Omp-2*. Bm, *B. melitensis* (control positivo) en muestras de queso. Carril 1: MTM. 2-3: Controles positivos. 4-9: muestras. 10: blanco.

El estudio comparativo de tres técnicas en la detección de Brucelosis en muestras de sangre de bovinos, permitió la detección de diferencias importantes en las pruebas realizadas (Cuadro 1). Las pruebas realizadas coincidieron en un 30% de resultados positivos en las tres pruebas, mientras que en la prueba de tarjeta todas las muestras fueron positivas, la prueba de fijación de complemento presentó un 60% de resultados negativos. Los resultados obtenidos demostraron que estas pruebas pueden presentar falsos positivos o falsos negativos, sin que alguna de ellas pueda utilizarse de manera confiable.

Se presentó un comportamiento semejante en las muestras de leche (Cuadro 1), observándose que un 60% de estas muestras presentaron los mismos resultados utilizando las tres diferentes pruebas de diagnóstico. En las muestras de queso se identificaron dos muestras positivas por PCR (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación en las técnicas de diagnóstico en muestras de sangre de vacunos, leche y queso.

Prueba de tarjeta	Fijación de complemento	PCR	Resultado
SANGRE			
15/15 (100%)	5/15 (33.3%)	12/15 (80%)	Positivo
0/15 (0%)	10/15 (66.6%)	3/15 (20%)	Negativo
LECHE			
10/10 (100%)	7/10 (70%)	7/10 (70%)	Positivo
0/10 (0%)	3/10 (30%)	3/10 (30%)	Negativo
QUESO			
ND	ND	2/5 (40%)	Positivo
ND	ND	3/5 (60%)	Negativo

ND= No determinado

De un rebaño de 56 cabras de las que se tomaron muestras de sangre para diagnóstico de brucelosis, con la prueba de tarjeta resultaron 18 positivas, equivalente al 32.14%, mientras que con la prueba de PCR sólo hubo 12 muestras positivas lo que equivale al 21.43%, siendo la diferencia de eficiencia de la prueba de PCR con respecto a la de tarjeta del 12.74%, esto se debe a que con la prueba de tarjeta se obtuvieron siete resultados falso positivo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Detección de *Brucella* spp. en muestras de sangre de hembras de caprinos raza Sanen empleando diferentes pruebas de diagnóstico

Resultado	Rosa Bengala	PCR
Positivo	18/56 (32.14%)	12/56 (21.43%)
Negativo	38/56 (67.85%)	44/56 (78.57%)

En otro rebaño de 63 cabras, también se tomaron muestras de sangre para el diagnóstico de brucelosis, identificándose que 30 animales estaban vacunados, por lo que aparentemente ya se encontraban libres de *Brucella* spp., sin embargo, al realizar la prueba de PCR, el 93.33% de los animales vacunados mostraron un resultado positivo y 55 animales de la población muestreada (Cuadro 3).

Cuadro 3. Detección de *Brucella* spp. en muestras de sangre de hembras de caprinos raza Sanen empleando diferentes pruebas de diagnóstico

Resultado PCR	Vacunadas	No vacunadas
Positivo	28/30 (93.33%)	55/63 (87.3%)
Negativo	2/30 (6.66%)	8/63 (12.7%)

En el cuadro 1, se demuestra que las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis no son eficientes, debido a que se identificaron varias muestras como falsos positivos y falsos negativos; en el tercer cuadro nos refleja el efecto que se da por la deficiencia de la prueba de tarjeta ya que aparentemente en el 2005 se habían identificado, eliminado los animales reactivos y vacunado los sanos. Sin embargo, en el reciente muestreo vuelven a resultar animales positivos, de los cuales 30 estaban vacunados. Este resultado ya no se debe al efecto de la vacuna, si no, más bien, esto quiere decir que quedaron animales reactivos en el rebaño. La seropositividad observada puede deberse a que los animales ya habían estado en contacto con el organismo y no al efecto de la vacunación, ya que la vacunación controla la presencia de la enfermedad, pero no evita que la bacteria entre en con-

tacto con el huésped.

Discusión

Las técnicas conocidas como pruebas tamiz para detectar ganado con brucelosis, entre ellas la del antígeno rosa de bengala, se basan en ensayos inmunológicos, en los cuales se mide directamente la interacción del antígeno y anticuerpo; mientras que la prueba definitiva como la de fijación de complemento, se basa en la aglutinación o activación del complemento y se usa como prueba de confirmación (Pfukenyi et al., 2020). Se han realizado diversos estudios para evaluar la sensibilidad y especificidad de las pruebas convencionales utilizadas para el diagnóstico de brucelosis, observándose que algunas de ellas son menos específicas que otras y que pueden reportar un resultado erróneo. Gall y Nielsen (2004), revisaron 50 publicaciones para evaluar la sensibilidad y especificidad de diversas técnicas utilizadas para la detección de *Brucella abortus* en animales, atribuyendo la inestabilidad de la preparación de algunos antígenos utilizados en diversas pruebas, como un factor limitante. MacMillan, (1990), reportó que el antígeno rosa de bengala podría deteriorarse cuando se encuentra en tiempos cambiantes de refrigeración a temperatura ambiente varias veces durante su uso, lo cual puede ocasionar que disminuya la confiabilidad de los resultados.

Por otro lado, la técnica de fijación de complemento, también puede presentar un resultado erróneo, debido a la combinación de diversos factores, como la complejidad de la prueba, falta de estandarización, la incapacidad para analizar muestras hemolizadas, resultados anticomplementarios, el efecto prozona, resultados falsos positivos en muestras que presentan la cepa vacunal de *B. abortus* 19 y la detección de reacción cruzada con anticuerpos debido a la exposición con otras bacterias gram negativas como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O:157 y *Yersinia enterocolitica* O:9 (Trotta et al., 2020). Estudios previos sugieren que la prueba de fijación de complemento es un método altamente sensible y específico cuando se desarrolla correctamente, sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio realizado por Gall y Nielsen (2004), muestran que no lo es, existiendo una contradicción con lo que se ha pensado de ella. Los resultados presentados, mostraron que las técnicas que se utilizan como prueba tamiz y prueba complementaria, son poco confiables, debido a que los porcentajes de pruebas positivas fueron en algunos casos muy diferentes entre sí, principalmente al analizar las muestras sanguíneas, creando de esta manera un diagnóstico erróneo de la enfermedad.

Debemos tomar en cuenta que los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM durante 3 a 4 semanas y aumentan gradualmente durante el curso de la infección aguda, los cuales son anticuerpos aglutinantes que descienden progresivamente antes de los 6 meses; seguidos de un aumento gradual de IgG e IgA y que pueden aparecer dentro de la clase IgG, comenzando de 7 a 14 días después de la infección, los cuales son anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados y tienen la in-

capacidad de activar complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación, los cuales pueden permanecer detectables durante 2 o 3 años (Coelho et al., 2019). Por ello, cuando se utilizan los métodos serológicos de diagnóstico, deben tenerse en consideración la reactividad cruzada y el tipo de anticuerpo que predomina en cada etapa, debido a que, cuando la concentración de anticuerpos no aglutinantes en el suero alcanza valores relativos importantes, estas reacciones pueden arrojar resultados de bajo título y aún negativos, lo cual coincide con nuestros resultados.

Saytekin y Ak (2018), reportaron que la eficiencia del diagnóstico por PCR puede ser afectada por el proceso de extracción de DNA, considerando que la calidad y cantidad de DNA obtenido en una muestra permite obtener resultados confiables en la PCR. Con base a ello, la figura 1 muestra que el DNA obtenido de cada una de las muestras, fue de buena calidad para permitir la adecuada amplificación del gen buscado. Diversos estudios, han utilizado la técnica molecular de PCR como una herramienta adicional a las pruebas serológicas en el diagnóstico de brucelosis (Mohseni et al., 2017). Otros autores indican que la PCR es una técnica que permite obtener un diagnóstico rápido, específico y sensible de esta enfermedad sin las limitaciones de las metodologías convencionales (Kaltungo et al., 2014). Además, Lavaroni, et al., (2004) demostraron en un estudio realizado con animales infectados con *Brucella* spp. de tipo silvestre y cepa vacunal, que el cultivo bacteriológico presenta una baja eficiencia comparado con la técnica de PCR. Resultados similares fueron obtenidos por Leal et al., (1995) en un grupo de 22 cabras expuestas a infección natural donde aislaron *Brucella* spp. de una cabra, mientras que por la PCR se identificaron 19, de las cuales 14 fueron positivas serológicamente.

Los resultados indicaron que la técnica de PCR es eficaz para el identificar *Brucella* spp. en muestras de sangre, leche y queso de diversos orígenes. Su presencia se demostró al observar un fragmento amplificado de 800 pb utilizando los iniciadores Bru1 y Bru 4, aumentando la sensibilidad de la prueba al emplear dicho fragmento como molde para obtener un segundo amplificado de 193 pb con los iniciadores Bru1 y Bru3, los cuales han sido reportados en otros estudios para llevar a cabo la detección de *Brucella* spp. en sangre y leche de animales infectados (Leal et al., 1995). Al utilizar los iniciadores mencionados, pudimos observar que los fragmentos amplificados no se presentan en una sola especie de *Brucella* spp. si no que ambas cepas utilizadas como controles positivos (*B. abortus* y *B. melitensis*) presentaron el fragmento, permitiendo que esta técnica detecte la infección por *Brucella* spp. sin que sea específica de especie.

Además, la técnica de PCR utilizada permitió detectar la presencia de la bacteria en muestras de queso, lo cual no es posible a través de las técnicas de rutina, siendo de esta manera, una herramienta importante para detectar alimentos contaminados e impedir la infección en humanos; de acuerdo con otros autores el resultado no se altera si el microorganismo no es viable, si la muestra esté contaminada con otro microorganismo o si existe un retraso en el análisis

(Miyashiro, et al., 2007; Tantillo, et al., 2001).

Considerando las ventajas que presenta la PCR comparadas con el diagnóstico serológico, esta técnica puede ser manejada como la prueba a realizar para conseguir un diagnóstico correcto en la identificación de Brucelosis, ya que un resultado incorrecto ocasiona enormes pérdidas en la economía pecuaria, las cuales pueden ser evitadas. Finalmente, Neha et al., (2017), en un estudio realizado en 21 muestras de suero bovino positivo por PCR, obtuvieron 47,73% animales seropositivos, mientras que una muestra de suero fue negativa por las pruebas serológicas pero su suero fue positivo por PCR.

Agradecimientos

Caracterización Molecular y Epidemiológica de *Brucella* sp en Ovinos y Caprinos del Estado de Jalisco.

Literatura citada

- Bagheri, N.R., Krecek, R.C., Khalaf, O.H., Hailat N. y Arenas-Gamboa A.M. (2020). Brucellosis in the Middle East: Current situation and a pathway forward. PLoS Neglected Tropical Diseases. 15(5): e0008071. doi: 10.1371/journal.pntd.0008071
- Castro, H.A., González, S.R y Prat, M.I. (2005). Brucellosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 39(2): 203-16.
- Çiftçi, A., Ica, T., Savaşan, S., Sareyyupoglu, B., Akan, M., Diker, K.S. (2017). Evaluation of PCR methods for detection of Brucella strains from culture and tissues. Tropical Animal Health and Production. 49:755–763. doi: 10.1007/s11250-017-1256-1.
- Coelho, Ana Claudia; Coelho, Adosinda; Quintas, Helder; Simões, João (2019) Immunological response to Brucella. In J.C. Simões; M.J. Saavedra and P.A. Hunter (Eds.) Brucellosis in Goats and Sheep: an endemic and re-emerging old zoonosis in the 21st century. New York: Nova Science Publisher. p. 127-137. ISBN 978-1-53614-962-3.
- Díaz, E., Hernández, L., Valero, G y Arellano, B. (2001). Diagnóstico de Brucelosis animal. INIFAP. México. pp 220.
- Ferrero, M.C.; Hielpos, S.M.; Carvalho, B.N.; Barrionuevo, P.; Corsetti, P.P.; Giambartolomei, H.G.; Oliveira, C.S.; Baldi, C.P. (2014). Key role of toll-like receptor 2 in the inflammatory response and major histocompatibility complex class ii downregulation in Brucella abortus-infected alveolar macrophages. Infection and Immunity. 82, 626–639. doi: 10.1128/IAI.01237-13.
- Gall, D., Nielsen, K. (2004). Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Revue scientifique ty technique. 23(3): 989-1002.
- Guzmán Hernández, R., Contreras Rodríguez, A., Ávila Calderón, E., y Morales García, M. (2016). Brucellosis: zoonosis de importancia en México Brucellosis: a zoonosis of importance in Mexico. Rev Chilena Infectol, 33(6), 656–662. doi: 10.4067/S0716-10182016000600007.

- Gwida, M.M., El-Gohary, H.A., Melzer, F., Khan, I., Rosler, U y Neubauer, H. (2012). Brucellosis in camels. *Research in Veterinary Science*. 92, 351-355. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.05.002.
- Hosein, H. I., Rouby, S. R., Menshawy, A., & AbdAl-Ghany, A. E. (2017). Sensitivity and specificity of the commonly used diagnostic procedures of bovine brucellosis. *Vet. Sci. Res. Rev*, 3(3), 45-52. doi: 10.17582/journal.vsr/2017.3.3.45.52.
- Kaltungo, B.Y., Saidu S.N.A., Sackey, A.K.B. y Kazeem, H.M. (2014). A review on diagnostic techniques for brucellosis. *African Journal of Biotechnology*, 13 (1), 1-10. doi:10.5897/ajb2013.13442.
- Lavaronio, O., Aguirre, N., Vanzini, V., Lugaresi, C. y Torioni, S.E. (2004). Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella* spp. *Revista Argentina de Microbiología*. (36):101-106.
- Leal, K. D. S., Martínez, V. I. O, López, M. A. y Martínez, S.J.P. (1995). Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(12): 3087-3090.
- Macmillan, A. (1990). Conventional serological test. In *animal brucellosis* (K. Nielsen J.R. Duncan). CRC Press Boca Raton. 153-197.
- Miyashiro, S., Scarcelli, E., Piatti, R.M., Campos, F.R., Vialta, A., Borges, K.L., Dias, R.A., y Genovez, M.E. (2007). Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*. (38):17-22.
- Mohseni, K., Mirnejad, R., Piranfar, V., y Mirkalantari, S. (2017). A comparative evaluation of ELISA, PCR, and serum agglutination tests for diagnosis of *Brucella* using human serum. *Iranian journal of pathology*, 12(4), 371.
- Mol, J.P., Guedes, A.C, Eckstein, C., Quintal, A.P., Souza, T.D., Mathias, L.A y Santos, R.L. (2020). Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 32(1), 77-86. doi: 10.1177/1040638719891083.
- Murugaiyan, J., Eravci, M., Weise, C., Roesler, U., Sprague, L. D., Neubauer, H., & Wareth, G. (2020). Pan-proteomic analysis and elucidation of protein abundance among the closely related *Brucella* species, *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Biomolecules*, 10(6), 836. doi: 10.3390/biom10060836.
- Neha, AK., Kumar, A y Ahmed, I. (2017). Comparative efficacy of serological diagnostic methods and evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of bovine brucellosis. *Iranian journal of veterinary research*. 18(4), 279.
- NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales. SAGARPA. Diario Oficial de la Federación.
- Pfukenyi, D. M., Meletis, E., Modise, B., Ndengu, M., Kadzviti, F. W., Dipuo, K., Matope, G. (2020). Evaluation of the sensitivity and specificity of the lateral flow assay, Rose Bengal test and the complement fixation test for the diagnosis of brucellosis in cattle using Bayesian latent class analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 181, 105075. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105075.
- Samartino L. (2003). Conceptos generales sobre Brucelosis bovina. Jornada de actualización sobre Brucelosis bovina, Rocha. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Castelar, Argentina.
- Samartino, L. (2013). Jornada de actualización sobre Brucelosis Bovina. Roche. INTA., 23-32.
- Saytekin, A. M., y Ak, S. (2018). Direct diagnosis of *Brucella* species through multiplex PCR formed by a new method. *Journal of Microbiological Methods*. doi:10.1016/j.mimet.2018.10.011
- Stemshorn, B.W., Forbes, L.B., Eaglesome, M.D., Nielsen, K.H., Robertson, F.J., Samagh, B.S. (1985). A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 49(4): 391-394.
- Tantillo G, DI Pinto A, Vergara A, Buonavoglia C. (2001). Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *Journal of Food Protection*. 64(2):164-167.
- Trotta, A., Marinaro, M., Cirilli, M., Sposato, A., Adone, R., Beverlli, M., Buonavoglia, D., Corrente, M. (2020). *Brucella melitensis* B115-based ELISA to unravel false positive serologic reactions in bovine brucellosis: a field study. *BMC Veterinary Research* 16, 50. doi: 10.1186/s12917-020-02278-7.