

ARTÍCULO ORIGINAL

Desarrollo y evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis

Dervel Felipe Díaz Herrera*, Yanelis Cruz Santana, Otto Cruz Sui, Dayamí Martín Alfonso, Martha J Alfonso González, Eva Ortiz Losada, Anitza Fragas Quintero, Lucy Montano Tamayo, Eladio Silva Cabrera

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC), Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Se desarrolló un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral para el diagnóstico serológico de la brucelosis en bovinos, porcinos, ovinos y humanos. En la evaluación se emplearon 259 muestras de sueros de las cuatro especies mencionadas, 67 positivos y 192 negativos por la prueba de Rosa de Bengala (RB). La interpretación del ensayo se realizó por inspección visual entre 15-20 minutos de aplicadas las muestras. La prueba se consideró negativa si solo aparecía la línea de control, y positiva cuando aparecían la línea control y la de prueba. Para cada uno de los grupos de sueros se determinó la sensibilidad y especificidad diagnósticas y la sensibilidad y especificidad relativas a la prueba de RB. Además, se calculó el índice Kappa (k) para estimar la concordancia entre ambas pruebas. Se obtuvieron 98,5% y 99,47% de sensibilidad y especificidad diagnósticas, respectivamente. La sensibilidad y especificidad relativas a RB fue del 95,65% y 99,95% respectivamente, con un valor de k de 0,95, lo que significó una concordancia muy buena con respecto a la RB. La sensibilidad del sistema frente a sueros bovinos, porcinos, ovinos y humanos fue de 98,3%, 100%, 100% y 100%, respectivamente. De igual forma, el ensayo mostró altos niveles de especificidad en este grupo de sueros. Los resultados satisfactorios de desempeño y la simplicidad del ensayo permiten recomendar su empleo para el pesquaje de anticuerpos contra *Brucella* sp. en las especies estudiadas como otra herramienta para el diagnóstico serológico de la brucelosis.

Palabras clave: Brucelosis, Rosa de Bengala, sistema inmunocromatográfico de flujo lateral.

Development and performance evaluation of a fast immunochromatographic test for brucellosis diagnosis

ABSTRACT: An immunochromatographic lateral flow assay for the serological diagnosis of brucellosis in cattle, swine, sheep and humans was developed. The test evaluation was carried out with 259 serum samples from the four mentioned species; 67 positive and 192 negative by rose bengal test (RB). Interpretation of the test was performed by visual inspection after 15-20 minutes of the samples being applied. The test was considered negative if only the control line appeared and positive when the test line also appeared. In general and for each group of sera, sensitivity and diagnostic specificity and sensitivity and relative specificity to RB test were determined. Kappa index (k) was also calculated to estimate the agreement between the two tests. The diagnostic sensitivity and specificity obtained were 98.5% and 99.47%, respectively. The sensitivity and specificity relative to RB were 95.65% and 99.95% respectively, with a k value of 0.95, which meant a very good agreement with respect to the RB. The sensitivity of the system to sera cattle, pigs, sheep and humans was 98.3%, 100%, 100% and 100% respectively. Likewise the test showed high levels of specificity in this group of sera. The satisfactory performance and simplicity of this assay allow recommending its use as another tool for the screening of antibodies against *Brucella* sp. in the serological diagnosis of brucellosis in the animal species studied.

Key words: Brucellosis, Rose Bengal test, lateral flow immunochromatographic system.

*Autor para correspondencia: Dervel Felipe Díaz Herrera. Correo electrónico: feloany@infomed.sld.cu; cicdc@infomed.sld.cu.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa producida por bacterias del género *Brucella* que afectan a varias especies de animales con alta relevancia económica como el ganado bovino, porcino, ovino, equino, caprino y a otras especies silvestres (1). Esta infección es causa frecuente de abortos en la mayoría de las especies domésticas y genera un impacto económico negativo en la industria ganadera debido a las pérdidas originadas por la disminución de la producción de carne, leche y en la disminución en el valor de reventa de los animales infectados (2). La brucelosis se considera, además, una de las principales zoonosis de mayor distribución mundial que se transmite por contacto directo con placentas, fetos y secreciones uterinas, o por consumir alimentos contaminados, fundamentalmente leche y sus derivados (1, 2, 3).

El conocimiento de la propagación y la prevalencia de la brucelosis es esencial para tomar medidas de control. En Cuba existe, desde 1964, el «Plan para el Control y Erradicación de la brucelosis bovina», a través del cual se han sacrificado todos los animales positivos por las pruebas serológicas y el saneamiento ambiental de las áreas afectadas (4). En el año 2012, según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en su informe sobre la situación sanitaria animal y las medidas de control por país/territorio, en Cuba se informaron 33 nuevos focos de brucelosis bovina, con 2287 casos de animales domésticos infectados y no se reportaron casos de la infección en animales salvajes. Ese mismo año se reportaron, además, 3 nuevos focos de brucelosis porcina con 17 animales infectados (5).

De igual manera, en el Informe de Balance del IV trimestre de 2013 del Instituto de Medicina Veterinaria (IMV), entre los años 2012 y 2013 se reportaron 160 focos de brucelosis bovina, localizados principalmente en las provincias Camagüey, Ciego de Ávila, Las Tunas, Granma y Pinar del Río (6). Los casos de infección en humanos son poco comunes y por lo general están asociados a los focos en animales. Según el reporte de enfermedades de declaración obligatoria del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), durante los años 2012, 2013 y 2014 se reportaron 43, 55 y 28 casos, respectivamente. La infección fue más común en hombres y en individuos entre los 25 y 59 años. Coincidentemente, las provincias con mayor cantidad de reportes anuales resultaron ser Pinar del Río, Camagüey, Granma y Las Tunas (7).

El diagnóstico de esta infección en animales se realiza con una batería de pruebas serológicas, las cuales están prescritas por la OIE; entre las que se

encuentran la Rosa de Bengala (RB), la Aglutinación Lenta en Tubo (SAL), el 2-mercaptoetanol (2-ME), la Reacción de Fijación del Complemento (RFC), los ELISA y el Ensayo de Polarización Fluorescente (EPF) (2,8,9). En la actualidad, el algoritmo para el diagnóstico serológico de la brucelosis en Cuba se basa en la Norma Ramal 586 del Ministerio de la Agricultura (9), el cual se realiza con el empleo de las pruebas SAL y RB para el pesquisaje de anticuerpos y el 2-ME y RFC como pruebas confirmatorias (9,10).

Para el diagnóstico de la infección en humanos se recomienda el aislamiento de la bacteria a partir de muestras clínicas, seguido de un clásico análisis microbiológico en tubo, la detección de anticuerpos anti-*Brucella* mediante diversas pruebas serológicas y, de ser posible, el uso de métodos moleculares para detectar el ADN de la bacteria (14). En sentido general, estos ensayos son complejos de realizar, requieren de personal capacitado, equipamiento específico y laboratorios con capacidades instaladas para el desarrollo de los mismos, por lo que su empleo no se recomienda para la vigilancia ni para el diagnóstico de la brucelosis en condiciones de campo. Por tal razón, en la última década se han diseñado y evaluado pruebas rápidas inmunocromatográficas de flujo lateral, para el pesquisaje y vigilancia de la brucelosis, tanto en animales como en humanos (3, 11, 12, 13, 14).

Estos ensayos son similares en sensibilidad y especificidad a los sistemas ELISA, no requieren de conocimientos técnicos específicos, equipamiento especializado, electricidad, refrigeración, son fáciles de realizar e interpretar, lo que hace a estos sistemas ideales para su uso en poblaciones animales y humanas ubicadas en condiciones de difícil acceso. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar una prueba rápida inmunocromatográfica de flujo lateral para el diagnóstico de la brucelosis en bovinos, porcinos, ovinos y en humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Componentes y diseño de la prueba

El ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (EIFL) para el diagnóstico de brucelosis consistió en una membrana de nitrocelulosa (NC) de 15 µm de poro, flanqueada en un extremo por la almohadilla de conjugado y en el otro extremo por la almohadilla absorbente. La almohadilla para la aplicación de la muestra flanqueó a su vez a la de conjugado (Figura 1A).

Sobre las membranas de NC de 15 µm se aplicaron dos líneas, una de prueba y una línea de control. La línea de prueba se obtuvo al aplicar sobre la NC un

antígeno natural de *Brucella abortus* cepa 99, rico en lipopolisacáridos (LPS) obtenido partir de un cultivo celular inactivado por sonicación y centrifugado. La línea control consistió en una mezcla de inmunoglobulina G humana (IgG h), purificada por cromatografía de afinidad Proteína A-Sefarosa y poly L-lisina (SIGMA - ALDRICH, SL, USA). Ambas líneas se aplicaron a 3 mm de ancho, separadas a 8 mm, con el equipo de bioimpresión BioDot Quanti 2000 BioJet, Inglaterra.

El reactivo de detección del ensayo se obtuvo al conjugar Proteína A (Sigma-Aldrich, SL, USA) a partículas de oro coloidal de 40 nm de diámetro (British Biocell International, England) según el protocolo descrito por Beesley (15) y Hermanson (16). El conjugado obtenido se ajustó a una densidad óptica de 0.220, a una longitud de onda 520 nm, determinada en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, se diluyó en un tampón de migración y se aplicó sobre las almohadillas con el dispositivo difusor de aerosoles «AirJet» del equipo BioDot Quanti 2000 BioJet. El secado de las almohadillas se realizó a 37°C durante 30 minutos.

Las cantidades de antígeno y de conjugado aplicado a las tiras reactivas se optimizaron con el empleo de muestras de referencia positivas y negativas.

Para conformar las tiras reactivas se ensamblaron los diferentes componentes, se cortaron en tiras de 4,5 mm con la guillotina Biodot Modelo CM 4000 (Variable width cutter for Lateral Flow, Immunoblot, Inglaterra) y se colocaron en un dispositivo plástico (Figura 1A). A continuación se sellaron en sobres de aluminio plasticado, resistentes a la humedad con una bolsa de sílica gel y se guardaron a temperaturas entre 2 y 30°C hasta su uso.

Procedimiento de ensayo

El ensayo se desarrolló al adicionar 20 µl de suero o 40 µl de sangre total sobre la almohadilla de la muestra, seguida de 130 µl del tampón de corrida compuesto por solución salina fosfato, pH 7,6 que contiene 1,67% de albúmina sérica bovina y 3% de Tween 20 (10).

La interpretación de los resultados se realizó por inspección visual entre 15-20 minutos después de apli-

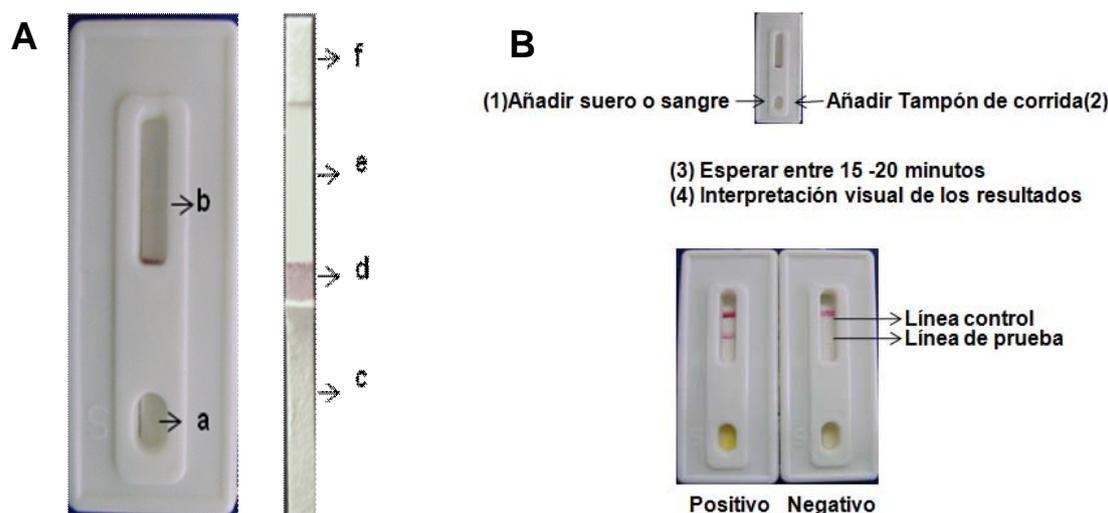


FIGURA 1. Ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (EIFL) para el diagnóstico de brucelosis: presentación, componentes y procedimiento./ *Immunochromatographic lateral flow assay (ILFA) for brucellosis diagnosis: presentation, components and procedure.*

(A) Dispositivo plástico (izquierda) el cual contiene a una tira reactiva (derecha)./ (A) *Plastic assay device (left) containing a composite assay strip (right)*

(a): orificio para la aplicación de la muestra./ *Sample application well*

(b): ventana de prueba./ *Test and control window*

(c): almohadilla de aplicación de la muestra./ *Sample application pad*

(d): almohadilla de conjugado./ *Conjugate pad*

(e): membrana de nitrocelulosa./ *Nitrocellulose membrane*

(f): almohadilla de absorción./ *Absorption pad*

(B) Procedimiento y resultado del ensayo./ *Procedure and result of the assay*

cadavé las muestras. La prueba se consideró negativa si solo aparecía la línea de control y positiva cuando aparecían las dos líneas. En todos los casos el ensayo se consideró válido si aparecía la línea control (Figura 1B). En el caso de las muestras positivas, la línea de prueba puede observarse con diferentes intensidades, en dependencia del título de anticuerpos específicos contra *Brucella* presentes en la muestra.

Evaluación del desempeño

Para la evaluación de la prueba se utilizaron 206 muestras de sueros de bovinos (50 positivos y 156 negativos), 10 sueros porcinos (8 positivos y 2 negativos), 17 ovinos (3 positivos y 14 negativos) y 26 sueros humanos (6 positivos y 20 negativos). Estas muestras pertenecen a paneles de referencia del laboratorio de control de calidad del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil.

Para cada uno de los grupos de sueros se determinaron la sensibilidad y especificidad diagnósticas y la sensibilidad y especificidad relativas a RB; además, se calculó el índice Kappa (k) para estimar la concordancia entre ambas pruebas. Se realizó la prueba Chi cuadrado (χ^2) para analizar los resultados del EIFL frente a los paneles de referencia y frente a RB. Adicionalmente, se analizaron 60 muestras negativas de sangre y suero de bovinos y se calculó el porcentaje de coincidencia entre los resultados para ambos tipos de muestras. Se usó la prueba de comparación de proporciones para el análisis de los resultados del EIFL y la prueba de RB en las diferentes especies estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el protocolo empleado para la producción del conjugado proteína A-oro coloidal, se obtuvo la concentración adecuada para su impresión en las almohadillas. El tampón de migración utilizado resultó efectivo, así como el tiempo de secado a 37°C. Con la aplicación de este conjugado, se garantizó que se detectaran principalmente anticuerpos de tipo IgG, ya que la proteína A tiene la capacidad de unirse de forma específica y con elevada afinidad al fragmento Fc de las IgG y ninguna o muy baja afinidad por las IgM (17).

En la historia natural de la infección por *Brucella*, los primeros anticuerpos que se forman son de tipo IgM, seguido de IgG 1 y posteriormente de IgG 2 e IgA (2, 11). Las IgG son el isotipo de anticuerpos más importantes en el diagnóstico serológico de esta infección (1, 11). Las IgM resultan importantes durante los estadios iniciales de la infección, pero también son la principal causa de las reacciones cruzadas con otros LPS de estructura similar a los de *Brucella* presentes

en algunas bacterias Gram negativas como: *Escherichia hermanni* y *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O:1 y *Yersinia enterocolitica* O:9 (1, 11, 18, 19, 20).

En la actualidad, la mayoría de los sistemas inmunocromatográficos de flujo lateral que se utilizan para el diagnóstico de brucelosis en especies animales y humanos emplean como conjugados, anticuerpos especie-específicos unidos a oro coloidal, por lo que se necesita un ensayo para cada especie a estudiar (3, 11). Sin embargo, el sistema diseñado permitió la detección de anticuerpos contra *Brucella* en cuatro especies diferentes con un mismo conjugado, lo que demuestra la versatilidad del mismo.

Otros autores, como Genç *et al.* (13), utilizaron un principio similar al nuestro al emplear un conjugado Proteína G -oro coloidal para el diagnóstico de la brucelosis en bovinos y ovinos. De igual forma, Jong *et al.* (21) desarrollaron un sistema para la detección de anticuerpos contra *Brucella canis* para lo cual utilizaron un conjugado Proteína A-oro coloidal. Tanto la proteína A, derivada de *Staphylococcus aureus*, como la proteína G, derivada de especies de *Streptococcus*, tienen la capacidad de unirse de forma específica al fragmento Fc de las IgG de múltiples especies (17).

El antígeno empleado en el sistema consistió en un extracto rico en LPS preparado a partir de un cultivo de *Brucella abortus*, el cual también ha sido utilizado en la normalización y evaluación de los sistemas DAVIH Bru 1, DAVIH Bru 2, DAVIH Bru 3, y ABICAP Bru para el diagnóstico de brucelosis en humanos, bovinos y otras especies (10, 22, 23, 24). Los LPS son los antígenos inmunodominantes en todas las cepas lisas de *Brucella*, tales como *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, y *B. microti*. Estos antígenos comparten epítopes comunes en su estructura, lo que ha permitido el empleo de preparados antigénicos desarrollados en una de estas especies para el diagnóstico serológico de las otras (1, 2, 11). Los LPS son los antígenos más importantes desde el punto de vista del diagnóstico de la brucelosis, y a diferencia de los LPS de otras enterobacterias, son capaces de producir una respuesta de anticuerpos IgM e IgG muy fuerte (11, 20).

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la evaluación de las 259 muestras de sueros de animales e individuos infectados y no infectados, mediante el EIFL. El sistema mostró una sensibilidad y especificidad diagnósticas del 98,5% y 99,47%, respectivamente. La especificidad obtenida fue superior a la descrita por otros autores para las pruebas serológicas convenciona-

les y su sensibilidad fue similar (1, 2), lo que hace del EIFL desarrollado un sistema factible y confiable para el diagnóstico de la brucelosis en cualquiera de las especies estudiadas en este trabajo. En la Tabla 2 se observan los resultados de la comparación del EIFL con el ensayo de referencia RB. La sensibilidad relativa fue del 95,65%, mientras que la especificidad relativa fue de 99,95%. El valor de k fue de 0,95, lo que significa una concordancia muy buena con respecto a la prueba de RB, que es uno de los ensayos, más empleado en nuestro país, para el pesquisaje de la brucelosis (4, 10) y a nivel internacional (2, 14, 18). La prueba de χ^2 mostró una alta relación entre los resultados del EIFL frente a los paneles de referencia y frente al ensayo de RB.

TABLA 1. Resultados de la evaluación del EIFL frente a muestras de sueros de paneles de referencia./ *Results of ILFA against serum samples from reference panels*

		Paneles de Referencia		
		+	-	Total
EIFL	+	66	1	67
	-	1	191	192
	Total	67	192	259

$$\chi^2 = 248,68 \quad p < 0,0001$$

TABLA 2. Resultados de la evaluación del EIFL con respecto a la prueba de Rosa de Bengala./ *Results of ILFA evaluation respecting the rose bengal test*

		Rosa Bengala		
		+	-	Total
EIFL	+	66	1	67
	-	3	189	192
	Total	69	190	259

$$\chi^2 = 238,85 \quad p < 0,0001$$

Como se puede apreciar en la Tabla 3, al evaluar el EIFL y RB frente a las cuatro especies estudiadas, la mayoría de las muestras fueron correctamente identificadas y no se apreciaron discrepancias estadísticamente significativas por comparación de proporciones entre los resultados de las muestras analizadas por ambas pruebas. El sistema obtuvo 98,3% de sensibilidad, 100 % de especificidad y k de 0,98, en sueros bovinos. El EIFL, a pesar de haber sido menos sensible que la RB, fue más específico y mostró una concordancia muy buena con este ensayo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Montasser *et al.* (25), al evaluar un ensayo

inmuncromatográfico, basado en partículas de látex para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, ovinos y caprinos en Egipto. De igual manera, Abdoel *et al.* (11) obtuvieron resultados similares en la evaluación de un sistema de flujo lateral para la detección de brucelosis en bovinos, el cual se comparó con la RB y la RFC. Elshemey *et al.* (3), en la evaluación de un sistema inmuncromatográfico rápido para la detección de anticuerpos contra *B. abortus* obtuvieron 94,44% y 100% de sensibilidad y especificidad, respectivamente, en sueros bovinos.

TABLA 3. Resultados de la evaluación del EIFL y RB frente a muestras de sueros de cuatro especies diferentes./ *Results of ILFA evaluation and RB against serum samples from different species.*

Especie animal y estatus sanitario	Cantidad de muestras positivas y negativas (porcentaje sensibilidad) (porcentaje especificidad)	
	RB	EIFL
	Bovinos positivos (N=50) negativos (N=156)	51 (100) 155 (99.3)
Porcinos positivos (N=8) negativos (N=2)	8 (100) 2 (100)	8 (100) 2 (100)
Ovinos positivos (N=3) negativos (N=14)	3 (100) 14 (100)	3 (100) 14 (100)
Humanos positivos (N=6) negativos (N=20)	8 (100) 18 (90)	7 (100) 19 (95)

En el caso de los sueros ovinos y porcinos, la sensibilidad y especificidad del sistema fue 100%. Estos resultados coincidieron con Silva *et al.* (23) y Ortiz *et al.* (24) cuando evaluaron el sistema DAVIH BRU 3 para el diagnóstico de brucelosis con muestras de suero de estas especies. Para los sueros humanos la sensibilidad fue 100%, la especificidad 95% y k de 0,9 (concordancia muy buena). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Smits *et al.* (13) cuando evaluaron un sistema de flujo lateral para el diagnóstico de anticuerpos IgM e IgG contra *Brucella* en humanos y obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 96% y 99%, respectivamente.

El porcentaje de coincidencia entre los resultados por sangre y suero fue 100%, lo que demuestra, de forma preliminar, que el sistema pudiera emplearse tanto para sangre total como en suero y que podría utilizarse como una prueba de campo para la identifi-

cación y rastreo de animales infectados cuando se evalúe con muestras positivas; esto resultaría de mucha utilidad para el control de la infección, ya que las acciones de intervención epizootiológica pudieran tomarse de manera inmediata y se reduciría la probabilidad de transmisión y propagación de la enfermedad.

Poder realizar en un mismo diagnosticador el estudio de las especies animales más afectadas por esta enfermedad y de humanos, sin dudas resulta una ventaja. Los resultados obtenidos indican que el EIFL desarrollado es una alternativa simple, rápida, sensible y específica para la detección de la brucelosis en especies animales de alto valor económico y en humanos, particularmente en zonas donde puedan existir brotes de la enfermedad. En Cuba, según reportes del MINSAP y del IMV durante los años 2012 y 2013, las provincias con mayor cantidad de casos en humanos resultaron las mismas con el mayor número de animales afectados (6,7). La carencia de equipos, medios y reactivos en muchos laboratorios municipales y provinciales que no permiten arribar a conclusiones diagnósticas es, según el IMV, una de las principales vulnerabilidades del programa de control de la brucelosis (6), de tal manera que el posible empleo del diagnosticador rápido desarrollado sería útil en el control de esta infección.

Los EIFL tienen varias ventajas prácticas sobre las pruebas convencionales para el diagnóstico de la brucelosis, que pueden hacerlo el método ideal para el pesquiasaje de la infección en animales localizados en zonas remotas o del personal asociado a estos. Dentro de estas ventajas prácticas están que no requiere una formación específica para su ejecución, experiencia, electricidad ni equipos costosos y los dispositivos pueden almacenarse sin necesidad de refrigeración, brindan resultados casi instantáneamente y la interpretación se realiza por inspección visual.

Se desarrolló un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral para el diagnóstico serológico de la brucelosis en cuatro especies diferentes, que puede emplearse en condiciones de campo. Los resultados satisfactorios de desempeño y la simplicidad del ensayo permiten recomendar su empleo para el pesquiasaje de anticuerpos contra *Brucella* sp. en las especies estudiadas, como otra herramienta para el diagnóstico serológico de la brucelosis. No obstante, recomendamos aumentar el número de muestras a estudiar para cada una de las especies y evaluar la correlación de los resultados por sangre y suero en poblaciones afectadas.

REFERENCIAS

1. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croat Med J.* 2010;5:296-305.
2. Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Contributions Sec Biol Med Sci.* 2010;XXXI(1):65-89.
3. Elshemey TM, Abd-Elrahman AH. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for Detection of *Brucella Abortus* Antibodies in Egyptian Cattle Sera and Milk. *AJVS.* 2014;40(1):24-28.
4. Seoane, G, Toledo M. Situación de la brucelosis bovina en Cuba. Seminario-Taller Zoonosis bacterianas de impacto para los países de América Latina. Sociedad Cubana de Microbiología Veterinaria, 19-21 de mayo 2004; p.12.
5. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Sanidad Animal en 2012. Situación sanitaria animal y las medidas de control por país/territorio (Cuba). Tomo 1. 2013: 268-274.
6. Instituto de Medicina Veterinaria (IMV). Ministerio de la Agricultura. Informe de balance IV trimestre. La Habana. 2013: 26-28.
7. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Dirección Nacional de Estadísticas. Listas de enfermedades de declaración obligatoria de los años 2012, 2013 y 2014. 2015.
8. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Caprine and ovine brucellosis; Bovine Brucellosis En: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* 2012. (<http://www.oie.int>).
9. Instituto de Medicina Veterinaria (IMV). Diagnóstico Veterinario. Brucelosis. Método de ensayo NRAG 586 Ministerio de la Agricultura. República de Cuba. 1982.
10. Ortiz E, Silva E, Izquierdo M. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. Tesis de Master en Microbiología Veterinaria, REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 2007;VIII(4), <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040407.html>.

11. Abdoel T, Dias IT, Cardoso R, Smits HL. Simple and rapid field test for brucellosis in livestock. *Vet Microbiol.* 2008;130:312-319.
12. Genç O, Büyüktanır Ö, Yurdusev N. Rapid immunofiltration assay based on colloidal gold-protein G conjugate as an alternative screening test for bovine and ovine brucellosis. *Trop Anim Health Prod.* 2012;44:213-215.
13. Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:1141-1146.
14. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2013;32(1):177-188.
15. Beesley J. Colloidal gold. A new perspective for cytochemical marking. *Royal Microscopical Society Handbook N. 17.* Oxford Science Publications. Oxford University Press. 1989.
16. Hermanson G. Bioconjugate Techniques. USA. Edit. Academic Press. 1996: 593-604.
17. Pajuaba A, Silva D, Mineo JR. Evaluation of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and IgG Avidity Assays Using a Protein A-Peroxidase Conjugate for Serological Distinction between *Brucella abortus* S19-Vaccinated and -Infected Cows. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(4):588-595.
18. Díaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The Rose Bengal Test in Human Brucellosis: A Neglected Test for the Diagnosis of a Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(4):950.
19. Nielsen K, Smith P, Yu W, Halbert G. *Salmonella enterica* Serotype Urbana interferes with brucellosis serology. *J Immunoassay Immunochem.* 2007;28:289-296.
20. Contribución al estudio epidemiológico de la brucelosis bovina en la Comunidad Autónoma de Galicia: investigación y aplicabilidad de las nuevas técnicas diagnósticas. ISBN 978-84-9887-615-4 (Edición digital PDF). Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria Patología Animal. 2011.
21. Jong WK, Young JL, Moo YH, Dong HB, Suk CJ, et al. Evaluation of Immunochromatographic Assay for Serodiagnosis of *Brucella canis*. *J Vet Med Sci.* 2007;69(11):1103-1107.
22. Rodríguez GO, Argote PE, Pérez CO, Tabares VD. Evaluación del ELISA DAVIH-BRU-1 en el diagnóstico serológico de la brucelosis humana. *Rev Cub Med.* 1995;34(3).
23. Silva EC, Izquierdo MM, Nibot C, Martin RZ. Evaluation of the ELISA system DAVIH BRU 3 in the diagnosis of brucellosis in different animal species. *Rev Salud Anim.* 2006;28(1):31-35.
24. Ortiz E, Nibot C, Silva E, Izquierdo M, Cabrera C, Rodriguez O. Application of DAVIH BRU 3 ELISA system in the serological diagnosis of pig brucellosis. *Rev Salud Anim.* 2005;27:166-170.
25. Montasser MA, K, Khoudair MR, Soliman SH, Eman AK. Evaluation of Immunochromatographic Assay for Serodiagnosis of *Brucella* among Cattle, Sheep and Goats in Egypt. *Glob Vet.* 2012;8(5):511-518.

Recibido: 30-9-2014.
Aceptado: 13-4-2015.