

ARTÍCULO ORIGINAL

Pesquisa serológica y molecular de *Brucella* sp. en un rebaño bufalino lechero en la Cuenca del Sur del Lago de Maracaibo

Datty Rosales-Zambrano^{I,II}, Ángela Lugo^{II}, Félix Andueza^{II}, Ahidé López-Merino^{III}, Aurea Morales-Estrada^{III}, Ana María Bolívar^I

^ILaboratorio de Zoonosis «Ahide Lopez-Merino». Facultad de Bioanálisis. ULA. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: dattyrsl@gmail.com. ^{II}Laboratorio «Sixto David Rojo». Facultad de Ciencias. ULA. Mérida, Venezuela. ^{III}Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. Plan de Ayala. DF, México.

RESUMEN: En el siguiente estudio se presentan los resultados de un protocolo de diagnóstico de Brucelosis bovina, en una finca lechera bufalina (*Bubalus bubalis*) con problemas reproductivos. Un rebaño total de 80 búfalos se sometió a tamizaje con la prueba rápida de Rosa de Bengala (RB) y la prueba de microaglutinación para *Brucella*. Los resultados obtenidos se confirmaron con el ensayo de microaglutinación con 2-Mercaptoetanol, fluorescencia polarizada (FPA) y diagnóstico molecular por PCR, con la amplificación de la región 16S ADNr del género *Brucella*. El tamizaje detectó 51,25% (41/80) de reactores con RB, la prueba de microaglutinación con fenol detectó 8,75% de animales positivos (7/80) y, posteriormente, las técnicas confirmatorias de 2-Mercaptoetanol y FPA detectaron 6,25% (5/80) de animales positivos. El índice de Kappa para la prueba de tamizaje RB, comparada contra 2-Mercaptoetanol, fue de 0,119; para el ensayo de microaglutinación con fenol contra 2-Mercaptoetanol de 0,820 y de FPA contra 2-Mercaptoetanol fue de 1,0. Se evidenció una baja concordancia para RB contra 2-Mercaptoetanol y de buena a excelente para microaglutinación con fenol y FPA contra 2-Mercaptoetanol. La PCR logró detectar el 100% de los animales confirmados (5/5 animales). Las técnicas serológicas como FPA y el diagnóstico directo por PCR se convierten en valiosas herramientas para estudiar la brucelosis animal en zonas de alto riesgo, sin realizar aislamiento de la bacteria.

Palabras clave: *Bubalus bubalis*, *Brucella* sp., diagnóstico.

Serological and molecular investigation of *Brucella* sp. in a dairy buffalo herd at the south basin of Lake Maracaibo

ABSTRACT: The results of a diagnostic protocol for bovine brucellosis in a buffalo (*Bubalus bubalis*) dairy farm with reproductive failures are informed. A herd of 80 buffaloes was subjected to a screening with the Rose Bengal (RB) and Brucella agglutination (BMAT) tests, and the results subsequently confirmed by using the 2-mercaptoethanol agglutination test (2-ME), the fluorescence polarization assay (FPA) and the molecular diagnosis by PCR of the 16S rDNA region of the genus *Brucella*. The screening detected 51.25% (41/80) RB reactors and 8.75% positive animals (7/80) on BMAT. The confirmatory techniques (2-ME and FPA) detected 6.25% (5/80) of positive animals. The Kappa index was 0.119 for RB compared with 2-ME, 0.820 for BMAT against 2-ME, and 1.0 for FPA against 2-ME. A low agreement for RB to 2-mercaptoethanol and high to excellent for agglutination with phenol and FPA was evident. The PCR detected 100% of the confirmed animals (5/5 animals). Serological techniques such as FPA and direct diagnosis by PCR become valuable tools for animal brucellosis diagnosis without bacterial isolation in high risk areas.

Key words: *Bubalus bubalis*, *Brucella* sp., diagnosis.

INTRODUCCIÓN

El búfalo de agua (búfalo asiático) se introdujo en Venezuela hace 88 años, pero no fue hasta la década de los 70 cuando comienza su relevancia como especie de interés zootécnico en la producción de proteína animal. Venezuela tiene el segundo rebaño, en cabezas, de todo el continente americano y es el país que ha importado mayor número de animales y de óptima calidad. Su crecimiento ha sido constante, lo cual es una muestra de su adaptabilidad y potencial en diversos ecosistemas venezolanos (1).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2009, reportó que el rebaño bufalino tuvo un crecimiento del 50% en los últimos 28 años. En algunos países, la población ha crecido vertiginosamente y se encuentra presente en todos los países americanos, con la excepción de Chile y de Canadá; se estima que en el continente americano existen más de 3 800 000 ejemplares. Los países americanos con mayor población bufalina son Brasil, con 3 500 000 cabezas; Venezuela, con 150 000; Colombia, con 85 000 y Argentina, con 70 000 (2).

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a bovinos y otras especies domésticas tradicionales y no tradicionales como el búfalo, que se caracteriza por la producción de abortos en el último tercio de gestación, retención de placenta, metritis, infertilidad, natimortos, mastitis, menor producción y calidad de leche, afecciones articulares, orquitis, epididimitis y constituye, además, una zoonosis ocupacional que afecta con más frecuencia a los veterinarios y trabajadores rurales y aquellas personas vinculadas a la cadena productiva (3, 4).

En América Latina, las pérdidas económicas debidas a Brucelosis están cercanas a los 600 millones de dólares. En Brasil se calculan alrededor de 100 millones de dólares por año y para Venezuela no se han realizado estudios sobre el impacto económico en el subsector bufalino (5). En el caso del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), solo pocas búfalas desarrollan los signos clínicos de la enfermedad (abortos); sin embargo, muchas de ellas diseminan *B. abortus* en leche, lo cual es un grave riesgo para la salud pública (6). La región del Sur del Lago de Maracaibo es una zona de importante producción lechera, considerada endémica para Brucelosis bovina (7).

En la actualidad, el diagnóstico de laboratorio para animales de producción está basado en técnicas serológicas como son las pruebas de aglutinación rápida para tamizaje y técnicas confirmatorias como

ELISA indirecto, competitivo y fluorescencia polarizada (FPA) (8, 9). En cuanto al diagnóstico directo, el aislamiento y cultivo para *Brucella* sp. resulta complejo y largo, por lo cual es poco usado en el país, lo que hace que las técnicas de biología molecular puedan constituir una poderosa herramienta de identificación de este patógeno.

En la actualidad desconocemos la situación epidemiológica de esta enfermedad en el país y cuáles de las herramientas diagnósticas disponibles en Venezuela tienen más utilidad para esta especie. El artículo 23 de la Resolución Vigente estipula: «*Se utilizará como prueba oficial de campo para el diagnóstico de la Brucelosis, la Prueba de Card Test (Rosa de Bengala), quedando para confirmación definitiva las siguientes pruebas: ELISA competitivo, Prueba lenta en tubo, Prueba del 2- Mercaptoetanol y/o fijación de complemento*».

De ahí que el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio transversal en un rebaño bufalino, ubicado en la región del Sur del Lago de Maracaibo, empleando técnicas serológicas de tamizaje y confirmatorias oficiales y otras de uso más reciente como la FPA. Se implementó, además, el uso de la PCR para lograr un diagnóstico sin tener que realizar el aislamiento de la bacteria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon un total de 80 animales de una finca bufalina lechera ubicada en el Municipio Panamericano del Estado Táchira, en la cual se habían registrado abortos en el último tercio de gestación, durante los últimos meses; en la finca se aplica la vacuna RB51, según recomienda la casa comercial.

La recolección de sangre se realizó con el sistema Vacutainer, empleando tubos con EDTA y sin anticoagulante, con el fin de garantizar la asepsia; estos se transportaron al Laboratorio de Zoonosis de la Universidad de los Andes, bajo refrigeración inmediata a su toma, para extracción de ADN y estudios serológicos, respectivamente. Las técnicas serológicas empleadas fueron: prueba rápida de RB como prueba tamiz (10, 11, 12) y como métodos confirmatorios se utilizaron las pruebas de 2- Mercaptoetanol en formato de microplaca y FPA (10, 11), teniendo en cuenta que la utilización de la técnica de fluorescencia polarizada, en la especie bufalina, está recomendada por varios autores (11,12) por ser una técnica sencilla para determinar la interacción antígeno/anticuerpo que se puede realizar en instalaciones de laboratorio o en el campo de manera muy rápida (10, 11,12).

Para la prueba rápida se empleó el antígeno de RB producido por el INIA- Maracay, lote 01/2013, con una relación 1:1 de suero y antígeno, según la técnica descrita por la OIE (11).

La prueba de microplaca se realizó con el uso de antígeno de Wrigth para prueba de aglutinación estándar (MICSA-México), con sus dos variantes del ensayo de prueba de microaglutinación para *Brucella* (*Brucella* Microaglutination Test, de sus siglas en inglés BMAT) con solución fenolada al 0,5% y con solución de 2-Mercaptoetanol al 0,7% con un punto de corte de 1/50 y 1/25, respectivamente. Se realizaron diluciones seriadas desde 1/25 hasta 1/3200 para un formato de 200 µl.

La técnica de FPA se realizó con el paquete comercial de FPA-Diachemix, en formato de tubo, para lo cual se empleó una dilución 1/100 con volumen final de 1 ml. La lectura se realizó en un lector Sentry 100-Diachemix. Se utilizó el punto de corte establecido por el paquete comercial.

El software SPSS 15® Windows se empleó para realizar los cálculos de las frecuencias de seropositivos y reactivos, el índice de concordancia de Kappa con un IC de 95% y $p \leq 0.005$ para las técnicas de RB, BMAT, 2-Mercaptoetanol y FPA (13).

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 500 µl de sangre con EDTA; se adicionaron 500 µl de solución de lisis y 5 µl de proteinasa K, se incubó a 56°C durante 3 horas, luego se realizó la extracción con el procedimiento clásico de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (14). La PCR se realizó según lo descrito por Romero (15); se emplearon los oligonucleótidos F4 y R2, que amplifican la región 16S del ARNr de *Brucella* sp. con una talla de 905pb (Tabla 1). A los productos del PCR se les realizó electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y tinción en bromuro de etidio (0.5 µg/ml), para evidenciar si hubo amplificación del fragmento de interés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba tamiz RB detectó 51,25% (41/80) animales reactivos, lo cual es un valor alto si se compara con el 5,3% del último estudio reportado en la zona (7) u otros recientes realizados en búfalos en Colombia, donde encontraron 11-13% de seroprevalencia (2, 16). El porcentaje de reactivos que se detectó puede estar asociado a un alto porcentaje de falsos positivos, lo cual ya fue analizado en un estudio similar realizado en Trinidad y Tobago, donde determinaron que en muestras obtenidas de bovinos era más factible el aislamiento de *B. abortus* que en las muestras de búfalos; la posible explicación de esta diferencia es que se encontraron más reacciones serológicas falsas positivas en búfalos comparadas con los bovinos (14). Estos falsos positivos, por lo general, están asociados a infecciones por otras bacterias Gram negativas como *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* 0:157 (17). Esta prueba ha presentado resultados muy variables y controversiales en estudios realizados con búfalos, por lo cual su eficacia es muy criticada por sus valores de especificidad y sensibilidad (18).

La seropositividad para el rebaño, con el uso de BMAT, fue de 8,75% (7/80); con las pruebas confirmatorias 2-Mercaptoetanol y FPA-*Brucella* se obtuvo valores de 6,25% (5/80) con ambas técnicas, lo que coincide con los resultados de ensayos anteriores que se realizaron en la zona, que reportaron en bovinos seroprevalencias de 6,3% en el municipio Alberto Adriani con el uso de la prueba 2-Mercaptoetanol (7).

Los resultados de las pruebas serológicas para *Brucella* sp. se presentan en la Tabla 2. La región del Sur del Lago ha sido caracterizada por ser endémica a brucelosis bovina. Aunque no hay estudios recientes, históricamente, la Brucelosis en Venezuela se sitúa en valores que van desde 0,8% hasta 10,2%, en dependencia de la zona geográfica (19). Por lo tanto, resulta necesario estimar los indicadores asociados a

TABLA 1. Secuencia y ubicación de los oligonucleótidos del ARNr 16S de *Brucella* sp./ *Sequence and location of the oligonucleotides of the 16S rRNA of Brucella sp.*

Oligonucleótidos	Secuencia	Ubicación	Tamaño (pb)
F4	5-TCGAGCGCCCGCAAGGGG-3	63-79	905
R2	5-AACCATAGTGTCTCCACTAA-3	947-966	

TABLA 2. Resultados de las pruebas serológicas para brucelosis animal, aplicadas a sueros bufalinos en una finca lechera./ *Results of serological tests for animal brucellosis, serum applied to buffaloes on a dairy farm*

Pruebas serológicas	Rosa Bengala		MAP-Fenol		MAP-2-Mercaptoetanol		FPA	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Positivos	41	51,25	7	8,75	5	6,25	5	6,25
Negativos	39	48,75	73	91,25	75	93,75	75	93,75
TOTALES	80	100	80	100	80	100	80	100

esta patología en el país, ya que es un problema de alto impacto económico y sanitario en la producción bufalina.

El valor del índice de Kappa para RB fue de 0.119, BMAT de 0.806 y FPA 1.0, con respecto a la prueba de 2-Mercaptoetanol (Tabla 3), lo cual demuestra mala concordancia en el caso de RB, buena concordancia para BMAT y total concordancia para FPA al evaluarla contra 2-Mercaptoetanol. La prueba con antígeno acidificado RB ha sido objeto de múltiples discusiones debido a la gran variabilidad en cuanto a especificidad (Es) y sensibilidad (Sn) que presenta, con valores para Es de 68.8 a 100% y de Sn de 21 a 98%. Dentro de las posibles causas para tan discordantes índices se pueden mencionar la subjetividad de la prueba y la estandarización de la producción local del antígeno (20, 21). Para la técnica de BMAT, en un estudio realizado en un rebaño bufalino en Argentina, se encontró un valor de 0,636, considerado como un nivel de concordancia aceptable; en nuestro caso el valor fue superior a este, catalogado como de buena concordancia (22).

En cuanto a FPA, un estudio comparativo de pruebas diagnósticas en búfalos en Brasil determinó que la

FPA tuvo una concordancia de 0,836, al compararla con la prueba de oro 2-Mercaptoetanol; además, evaluaron ELISAi y ELISAc (23). Teniendo en cuenta que se obtuvo total concordancia en este estudio, podemos decir que la FPA es una prueba que puede ser empleada en la especie bufalina.

Las muestras positivas a las pruebas confirmatorias se analizaron por la técnica de PCR convencional para amplificar el gen del ARNr 16S de *B. abortus*, a partir de las cuales se evidenció un amplicón de 905pb, correspondiente con el segmento de interés (Fig. 1).

En este estudio se pudo evidenciar la aplicabilidad práctica del PCR, a partir de muestras de sangre, para lograr obtener un diagnóstico definitivo para *Brucella* sp. a partir de un animal serológicamente positivo. En la actualidad es bien conocido que las pruebas basadas en PCR son sensibles, específicas y relativamente económicas para detectar *Brucella*. Varias regiones del genoma de *Brucella* se han empleado en ensayos de PCR, por ejemplo: el IS711, también conocido como IS650 (24); el 16S rRNA (25), el gen que codifica para la proteína de membrana externa de 31 kDa (*Outer membrane protein*, de sus siglas en inglés OMP) (26,27), el gen que codifica para BCSP-31 (28), a partir de lisados de células crudas de *Brucella* sp.

En los rebaños bufalinos endémicos a *B. abortus* se estima que al menos el 20% será negativo a las pruebas serológicas de rutina; estos animales son reservorios importantes con largos periodos de eliminación de bacterias al medio ambiente, por lo cual la detección empleando técnicas moleculares es una buena alternativa (6). Estos resultados indican que el uso del PCR, en combinación con técnicas serológicas, como fluorescencia polarizada, pueden ser más eficientes para establecer, en la especie bifalina, el diagnóstico de la enfermedad en zonas endémicas a esta patología.

TABLA 3. Valores del índice de Kappa para las técnicas RB, BMAT y FPA usando como referencia el 2-Mercaptoetanol ($p \leq 0.05$) (Datos del software SPSS 15)./ *Kappa index for RB, BMAT and FPA as comparative techniques using the 2-mercaptoetanol agglutination test. ($p \leq 0.05$) (Data software SPSS 15)*

Prueba	Índice de Kappa (κ)	Concordancia
RB	0.119	Baja
BMAT	0.806	Buena
FPA	1.0	Excelente

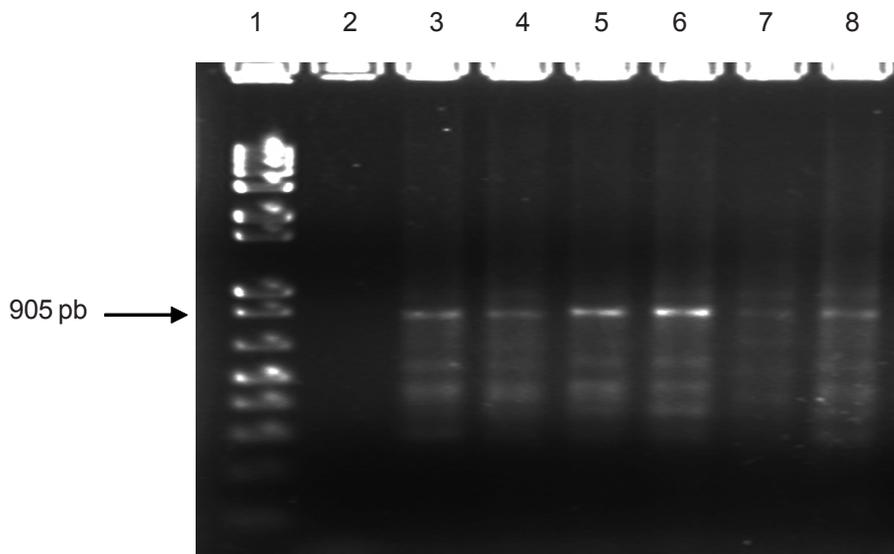


FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificados por PCR del gen ARNr 16S de *Brucella abortus*. 1: PM; 2: Negativo; 3: *Brucella abortus* 2308; 4 al 8: Cinco búfalos seropositivos a pruebas confirmatorias contra *Brucella* sp./ *Electrophoresis on agarose gel of the PCR amplified 16S rRNA gene of Brucella abortus*. 1: PM; 2: Negative; 3: *Brucella abortus* 2308; 4 to 8: Five seropositive buffaloes with *Brucella* sp. by the confirmatory tests.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por el proyecto FA-448-09-03C (CDCHTA-ULA). Se agradece la colaboración del Sr. G.M., por facilitarnos el acceso al estudio de su unidad de producción.

REFERENCIAS

1. Patiño E. Producción y calidad de la leche bubalina. *Tecnología en Marcha*, 2011;24(5):25.
2. Calderón A, Tique V, Ensuncho C, Rodríguez V. Seroprevalence of *Brucella abortus* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Córdoba. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*. 2010;13(2):125-132.
3. Jacobo R, Cipolini M, Storani C, Martínez D, Martínez E, Crudeli G. Diagnóstico clínico del complejo tristeza del bovino en búfalos. Datos preliminares en Argentina. *Sitio Argentino de Producción Animal*. 2006.
4. Lugo A, Roa V, Martínez A, Araque J, Rosales D, Andueza F. Aislamiento de cepas de *Brucella* sp., en muestras de leche bovina producidas en fincas del sector El Dos de Socopó, Estado Barinas, Venezuela. 2009. Universidad de Los Andes, SERBIULA - Venezuela. http://platon.serbi.ula.ve/librum/librum_ula/ver.php?ndoc=270038.
5. Nardi JG, Ribeiro M, Paulin L, Jorge A. Brucellosis in buffaloes: a review with emphasis on official serodiagnosis. *Vet Zootech- Lith*. 2012;19(2):142-156.
6. Borriello G, Capparelli R, Bianco M, Fenizia D, Alfano F, et al. Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect Immun*. 2006;74(4):2115-2120.
7. Rosales D, Lugo A. Evaluación de los antígenos utilizados para el diagnóstico de Brucelosis bovina en fincas lecheras del Municipio Alberto Adriani del Estado de Mérida (Tesis de Maestría). 2005. FCV. UCV. IRAIA. Maracay. Venezuela.
8. Rahman A, Dirk B, Fretin D, Saegerman C, Ahmed M, et al. Seroprevalence and risk factors for brucellosis in a high-risk group of individuals in Bangladesh. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9(3):190-197.
9. Tarangadia B, Nagamani K, Rana S, Srinivasan V, Montagnaro S. Evaluation of fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis in cattle and buffaloes in India. *Indian J Anim Sci*. 2012;82(6):561-564.

10. Ghodasara S, Roy A, Bhanderi B. Comparison of Rose Bengal Plate Agglutination, Standard tube agglutination and Indirect ELISA tests for detection of *Brucella* antibodies in Cows and Buffaloes. *World. 2010*;3(2):61-64.
11. López A. Manual de Técnicas y Procedimientos para el estudio de la Brucelosis. Secretaría de la Salud. Dirección General de Epidemiología. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Baez. 1989. México. DF.
12. Fosgate G, Adesiyun A, Hird D, Johnson W, Hietala S, et al. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Am J Vet Res. 2002*;63(11):1598-1605.
13. Cerda J. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil de Pediatría. 2008*;79(1):54-58.
14. Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. *In vitro* amplification of DNA by PCR. En *Molecular Cloning*. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA. 1989; pp. 9-14.
15. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goñi I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol. 1995*;33(3):615-617.
16. Motta J, Clavijo J, Waltero I, Abeledo MA. Seroprevalence of *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. and *Neospora caninum* in cattle, buffaloes and mixed farms, in the Department of Caqueta, Colombia. *Rev Salud Anim. 2014*;36(2):80-89.
17. Obukhovska O, Stegnyy B, Babkin A, Ibatullin I, Stegnyy M, et al. Identification of false-positive serological test results within brucellosis investigations in cattle. En: *Brucellosis 2014 International Research Conference*. Berlin. Bundesinstitut für Risikobewertung. 2014; pp 123.
18. Kumar M, Sindhi S, Matapathi B, Barad D, Javia B. Epidemiology and diagnosis of brucellosis in large ruminants. En: *Advanced Approaches for Diagnosis of Livestock Diseases*. Department of Veterinary Microbiology. Junagadh Agricultural University. Gujarat, India. 2013; pp 72-76.
19. Vargas F. Situación epidemiológica de la brucelosis en Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias. 2003*;8(2):69-78.
20. Gall D, Nielsen K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev Sci Tech. 2004*;23(3):989-1002.
21. Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu W. Diagnosis of brucellosis. *J Vet Sci. 2010*;4(1):46-60.
22. Martínez DE, Jacobo RA, Cipolini MF, Torioni De Echaide S, Martínez EI. Diagnóstico de brucelosis en búfalos (*Bubalus bubalis*). Utilidad de las pruebas de aglutinación en placa con antígeno tamponado (BPA), aglutinación en tubo (SAT) y 2-mercaptoetanol (2-ME). *Rev Med Vet. 2008*;89(3):76-80.
23. Paulin L, Samartino L, Conde S, Federsoni I, Ferreira F, et al. Fluorescence polarization assay, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-C) and indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Ciência Rural. 2012*;42(9):1621-1626.
24. Bricker B, Halling S. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol. 1995*;33(6):1640-1642.
25. Romero C, Lopez-Goñi I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microb. 1999*;5(8):3735-3737.
26. Morales-Estrada A, Castillo-Salto J, López-Merino A, Morales-García M, Valle-Valdez JG, Contreras-Rodríguez A. Characterization of *Brucella* species in Mexico by Bruce-Ladder polymerase chain reaction (PCR). *Afr J Microbiol Res. 2012*;6(11):2793-2796.
27. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, De Miguel M, Barquero-Calvo E, et al. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol. 2011*;154(1):152-155.
28. Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzza A, Gallo P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. *Vet Rec. 2000*; 147(22):634-636.

Recibido: 29-9-2014.

Aceptado: 2-2-2015.