

## Influencia de la edad de vacunación con la vacuna *B. abortus* S19 en la respuesta serológica inducida en terneras

Influence of age of vaccination with *Brucella abortus* S19 on humoral immune response in beef calf

Meglia, G.<sup>1</sup>; Gastaldo, M.<sup>1</sup>; Álvarez Rubianes, N.<sup>1</sup>; Oriani, S.<sup>1</sup>; Cerutti, D.<sup>1</sup>; Dubarry, J.<sup>1</sup>; Cisterna C.<sup>2,3</sup>; Perea, J.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam., General Pico, La Pampa; <sup>2</sup>Becaria CIC; <sup>3</sup>Instituto de Patobiología, INTA Castelar, Buenos Aires. <sup>4</sup>Univerisdad de Córdoba, España.

### RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los bovinos, entre otras especies, ocasionando importantes pérdidas por infertilidad. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la vacunación contra brucelosis sobre la respuesta inmunitaria humoral en dos grupos de terneras de diferente edad, como también precisar el grado de concordancia entre la prueba diagnóstica 2 mercapto-etanol (2-ME) y la polarización fluorescente (FPA) en animales BPA positivos. El grupo 1 fue vacunado a los 3,5 y el grupo 2 a los 7,5 meses de edad promedio. Los animales se sangraron mensualmente para determinar inmunoglobulinas IgM y/o IgG, e IgG a través de las pruebas de Wright y 2-ME, respectivamente. La concentración sérica de inmunoglobulinas fue significativamente superior en el grupo de terneras vacunadas a mayor edad en relación a las más jóvenes. En terneras BPA (+) FPA, dada su alta especificidad, reveló un número de animales negativos significativamente superior a los detectados por el 2-ME. Inesperadamente la presencia de animales positivos a FPA se mantuvo por más de 90 días en el grupo de terneras vacunadas a menor edad en relación a las de vacunación tardía, evidenciando un comportamiento de difícil explicación.

Palabras clave: (brucelosis), (vacunación), (respuesta humoral).

Correspondencia *e-mail*: Guillermo Meglia gmeglia@vet.unlpam.edu.ar

Recibido: 24-05-2011

Aceptado: 30-08-2011

## SUMMARY

Brucellosis is an infectious disease that affects bovine, among other species, producing losses through infertility. The objective of the present work was to assess the effect of vaccination against brucellosis over the humoral immune response in two groups of different age beef calves, as well as to determine the degree of relationship between 2 mercapto-ethanol and fluorescence polarization assay diagnosis in BPA positive animals. On average, group 1 was vaccinated at 3,5 and group 2 at 7,5 months of age. The animals were bled monthly, and the IgM and/or IgG, and IgG were assessed through Wright and 2-ME, respectively. The serum concentrations of immunoglobulin were significantly higher in the group 2 in relation to group 1. In animals BPA (+), FPA showed significantly lower positive values in relation to 2-ME. Moreover, the group of animals vaccinated at younger age showed positive serum FPA results for a period longer than 90 days in relation to the adult vaccinated ones, exhibiting an unexpected behavior.

Key words: (brucellosis), (vaccination), (humoral response).

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una de las principales zoonosis de origen bacteriano de importancia global, pudiendo ocasionar enfermedad con una dosis tan baja de 10 bacterias<sup>28</sup>. Es una enfermedad infecto-contagiosa causada por una bacteria GRAM negativa que afecta a los bovinos, entre otras especies, ocasionando importantes pérdidas económicas como consecuencia de infertilidad<sup>7, 4</sup>. La patogenicidad de la bacteria es muy compleja, pudiendo además ocasionar infecciones congénitas, generando animales infectados persistentemente, de muy difícil identificación ya que no inducen respuesta inmune detectable<sup>10</sup>. A pesar de las características indeseables enumeradas, de su condición de zoonosis y de que existe un plan nacional de vacunación y erradicación de la enfermedad, la prevalencia colectiva en el rodeo bovino local aún continúa siendo elevada, alrededor del 4-6%<sup>23</sup>. En ciertos países como Israel, Kuwait, Arabia Saudita, Brasil y Colombia la brucelosis es considerada una enfermedad re-emergente<sup>1, 5</sup>. No obstante, existen numerosos ejemplos donde la seriedad en el desarrollo e implementación de las campañas de vacunación han resultado en la erradicación de la enfermedad, tal el caso de países del norte de Europa.

Datos del año 2005 estimaron para La Pampa una población bovina de 4.100.000

cabezas, y considerando, por reglas naturales, que la mitad del rodeo son hembras, con un porcentaje de reposición promedio de las explotaciones ganaderas del 20% contaríamos con 410.000 animales en edad reproductiva, susceptibles a algún grado de exposición infecciosa. Samartino<sup>23</sup>, halló una prevalencia individual de brucelosis del 5%, hipotéticamente 20.500 hembras del rodeo provincial, solamente atribuible a esta enfermedad, podrían estar sufriendo algún grado de infertilidad que se traduce en cuantiosas pérdidas productivas y económicas para las explotaciones ganaderas. En este simple planteo, no se incluyen los machos enteros y el potencial riesgo de infección al personal que trabaja en estrecho contacto o hacen usufructo de ellos. Como resultado de este análisis, surge la necesidad de información científica que ayuden a comprender la compleja epidemiología de esta enfermedad.

En áreas donde la prevalencia de la enfermedad es moderada a alta, y el testeo y eliminación de los animales positivos se torna impracticable, la metodología más adecuada es el uso de la vacuna para reducir y controlar la enfermedad<sup>14</sup>. La vacuna de uso en la actualidad en Argentina es la cepa 19 de *Brucella abortus*, viva, de probada efectividad y seguridad con una tasa de infección residual de 2-3 cada 100.000 terneras vacunadas<sup>26</sup>. Ante el desafío antigénico vacunal, se generan

anticuerpos diagnósticos detectables por la prueba tamiz de uso oficial, Antígeno Buferado en Placa (BPA), y a medida que el animal crece, la concentración sérica de anticuerpos disminuye, dependiendo de la edad y vía de administración. La vacuna está indicada para hembras prepúberes, puesto que la vacunación tradicional por vía subcutánea en hembras sexualmente activas dificultaría el diagnóstico diferencial entre infección y vacunación por la persistencia de los anticuerpos. Por razones prácticas de manejo de las explotaciones ganaderas, el plan nacional contempla la vacunación de todas las hembras entre los 3-8 meses de edad con una dosis de 2 ml, que posee  $15 \times 10^9$  a  $30 \times 10^9$  células viables de S19 administradas por vía subcutánea<sup>24</sup>. Durante este amplio período de vacunación de cinco meses coexisten importantes cambios en el desarrollo del animal, que pueden afectar la respuesta inmunitaria contra la enfermedad. Existe escasa evidencia científica que documente la influencia de la edad de vacunación de las terneras en la persistencia de los títulos de anticuerpos específicos. Solamente datos procedentes de estudios realizados en Estados Unidos durante la década del 60 demostraron una relación positiva entre persistencia de anticuerpos diagnósticos y edad de vacunación de las terneras<sup>12</sup>. A la fecha y sin el conocimiento de los autores, no existe evidencia científica local que documente la curva de persistencia de anticuerpos en terneras vacunadas a diferente edad contra brucelosis bajo nuestras condiciones de producción.

El diagnóstico de la brucelosis bovina en Argentina se basa en la prueba tamiz BPA y las pruebas confirmatorias en paralelo de Wright o seroaglutinación en tubo y 2 Mercapto-etanol (2-ME). El fundamento de las pruebas en paralelo radica en que Wright detecta más eficientemente IgM, mientras que la especificidad en detectar IgG es menor, por consiguiente la prueba no se utiliza sola, sino en combinación con otros test como 2-ME<sup>22, 18</sup>. Recientemente ha sido aceptada por la Organización Mundial para la Sanidad Animal la Polarización Fluorescente

(FPA) como prueba prescrita en el diagnóstico de brucelosis para el transporte internacional de ganado<sup>19</sup>. Investigaciones en diferentes países, con sistemas productivos y especies diferentes como Argentina, México y Zambia, la sugieren en reemplazo de otras pruebas diagnóstica<sup>8, 13, 15</sup>. En nuestro país, a través de la resolución N° 438/2006 del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA)<sup>25</sup> esta técnica ha sido incorporada como prueba confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis, pero la información que se posee bajo nuestras condiciones y como prueba de reemplazo del 2-ME es muy escasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en el establecimiento privado "Don Benjamín", en la zona rural de Rancul, Provincia de La Pampa. El mismo está declarado como establecimiento libre de brucelosis por el SENASA.

### *Diseño experimental*

- Sesenta (60) terneras de raza británica fueron identificadas individualmente y se asignaron por edad en dos grupos de treinta (30) animales cada uno. Las terneras que integraron el grupo 1 (g1) se vacunaron por vía subcutánea entre los 3,5-4,5 meses de edad, mientras que las que compusieron el grupo 2 (g2) se vacunaron por la misma vía entre los 7-8 meses de edad.

- Independiente del grupo, se extrajo una primera muestra sanguínea al momento de aplicar la vacuna y se continuaron por un período de 10 meses, a razón de una por mes a cada animal vacunado.

- Un tercer grupo de treinta vacas adultas seronegativas a brucelosis se muestrearon por única vez, al promediar el trabajo, constituyendo el grupo control negativo (Gcn).

- Vacuna contra brucelosis bovina: para ambos grupos se utilizó la vacuna de uso comercial del laboratorio Agropharma (*Serie 85, Vencimiento: Marzo de 2009*), biológico elaborado con la cepa 19 de *Brucella abortus*, conteniendo entre  $15 \times 10^9$  a  $30 \times 10^9$  células bacterianas en fase lisa por cada dosis de 2 mL.

- Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 1500 rpm durante quince minutos para la obtención del suero. El mismo se almacenó en tubos plásticos a -20°C para su posterior análisis.

- Las muestras fueron analizadas para la presencia o ausencia de anticuerpos contra brucellosis a través de la prueba tamiz antígeno bufferado en placa (BPA), y las confirmatorias de Wright o seroaglutinación en tubo (IgM e IgG) y 2-ME (IgG).

- Desarrollo de las técnicas:

**Antígeno Bufferado en Placa - BPA:** 80 microlitros de suero fue mezclado con 30 µL de antígeno e incubado en una cámara húmeda durante cuatro minutos a temperatura ambiente, luego fue mezclado nuevamente e incubado por cuatro minutos más hasta su lectura según se describe en Bovine brucellosis<sup>19</sup>.

**Wright o seroaglutinación en tubo:** empleando una batería de tubos, se colocaron los siguientes volúmenes séricos: 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL, 0,01 mL y 0,005 mL. Luego se colocó 1 mL de solución fisiológica con 0,5% de fenol y finalmente 1 mL de antígeno al 2% en solución fisiológica, obteniéndose diluciones finales de suero de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400. Los tubos se incubaron a 37° C durante 48 horas y se leyeron los resultados como es descrito en Alton<sup>3</sup>.

**Mercapto Etanol - 2 M-E:** empleando una batería de tubos, se colocaron los siguientes volúmenes séricos: 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL, 0,01 mL y 0,005 mL. A continuación se colocó 1 mL de 2-ME 0,1 M y transcurrido 60 minutos se agregó 1 mL de antígeno al 2% obteniéndose diluciones de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400, se agitaron y se incubaron a 37° C durante 48 horas para su lectura según Alton<sup>3</sup>.

**Fluorescencia Polarizada - FPA:** El test emplea un extracto del polisacárido O de la pared celular de *Brucella abortus* que se conjuga con un marcador fluorescente, para la determinación de anticuerpos específicos. En detalle la prueba se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución, siendo el tamaño molecular el principal factor que influencia la

velocidad, con una relación de proporcionalidad inversa. Al añadir el suero problema para detectar la presencia de anticuerpos y agregar un antígeno de pequeño peso molecular marcado con un fluorocromo, es posible determinar el tiempo de rotación. La unión con el antígeno marcado provoca un descenso en su velocidad rotacional, que puede ser medida ya que una molécula grande emite más luz en un único plano que una pequeña que gira más deprisa y emite luz menos polarizada<sup>16</sup>. La calibración del equipo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Diachemix LLC, Illinois, USA) utilizando el control negativo del kit, con valor de corte fijo.

- Análisis estadístico:

Se determinó el grado de asociación entre la variable Grupo en cada nivel de la variable Control sobre la producción de anticuerpos al menos a una prueba:

- Variable dependiente: Positivo al menos a una prueba (categoría: 0 = negativo, 1 = positivo).

- Factor: Grupo

- Estadístico: chi-cuadrado. Si el valor p de chi-cuadrado es <0,05 hubo asociación significativa entre el momento de vacunación y la producción de anticuerpos.

A continuación, de los positivos detectados, se determinó si hubo asociación significativa entre el tipo de anticuerpos detectado y el grupo, en cada control:

- Variable dependiente: Positivo (categoría: 1 = Wright, 2 = 2-ME, 3 = ambos)

- Factor: Grupo

- Estadístico: chi-cuadrado. Si el valor p de chi-cuadrado es <0,05 hubo asociación significativa entre el momento de vacunación y la producción de anticuerpos.

Por último, se evaluó el efecto del tiempo en la producción de anticuerpos

- Estadístico: se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Si el valor p es <0,05 hubo diferencias significativa en la producción de anticuerpos en el tiempo.

## RESULTADOS

### Pruebas complementarias:

En las Figuras 1 y 2 se detallan las concentraciones sanguíneas de inmunoglobulinas IgM y/o IgG, e inmunoglobulina G en terneras vacunadas a diferente edad, respectivamente.

Las concentraciones de IgM y/o IgG ( $p=0,001$ ) como solamente de IgG ( $p=0,009$ ) fueron significativamente superiores en el grupo de terneras vacunadas a mayor edad en relación a aquellas inmunizadas más jóvenes, no obstante la persistencia sérica de inmunoglobulinas no mostró diferencias entre ambos grupos.

### Polarización fluorescente (FPA):

Al igual que las pruebas complementarias, la polarización fluorescente clasifica a los animales en positivos, negativos o sospechosos a brucelosis. Al ser comparados los resultados de las pruebas de FPA con aquellos obtenidos a través de las pruebas complementarias, las diferencias halladas no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,7819$ ). No obstante, en los casos de terneras positivas a BPA la prueba de FPA detectó un número superior de animales negativos que las pruebas complementarias, indicativo de su alta especificidad.

Los valores de corte establecidos para FPA fueron: 65 – 94 mp, negativo; 95 – 104 mp, sospechoso; >105 mp, positivo. Hasta un 25% de los animales vacunados, independientemente del grupo, fueron positivos a esta prueba dentro de los 60 días de la inmunización, para luego tornarse negativos a medida que nos apartamos de la fecha de vacunación. Tabla 1.

## DISCUSIÓN

La brucelosis es una enfermedad de elevada y renovada notoriedad, siendo considerada por algunos países como una enfermedad re-emergente<sup>5</sup>. En medicina general humana fue reclasificada como una zoonosis de importancia y se están llevando a cabo grandes esfuerzos para deducir la compleja patogenia bacteriana. En medicina veterinaria aún existen numerosos interrogantes sobre la confusa interrelación bacteria – sistema inmunitario del animal huésped. En respuesta a los objetivos planteados en el presente trabajo, y en concordancia con los primeros datos reportados por King and Frank<sup>12</sup> las concentraciones séricas de inmunoglobulinas totales contra brucelosis alcanzaron un pico al mes posvacunación, para luego disminuir constantemente hasta hacerse imperceptibles, a las pruebas convencionales, a partir de los nueve meses.

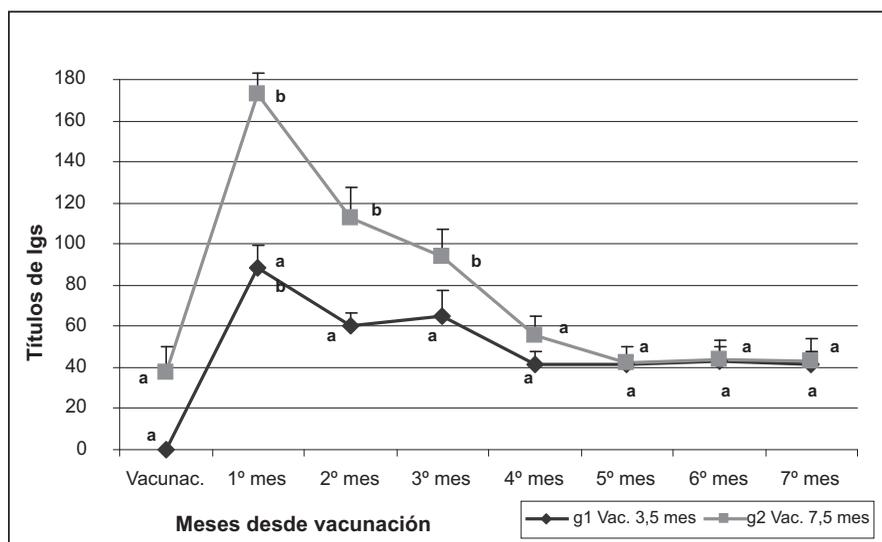


Figura 1. Resultados del Wright.

\*Letras disímiles entre puntos y líneas indica diferencias estadísticas significativas

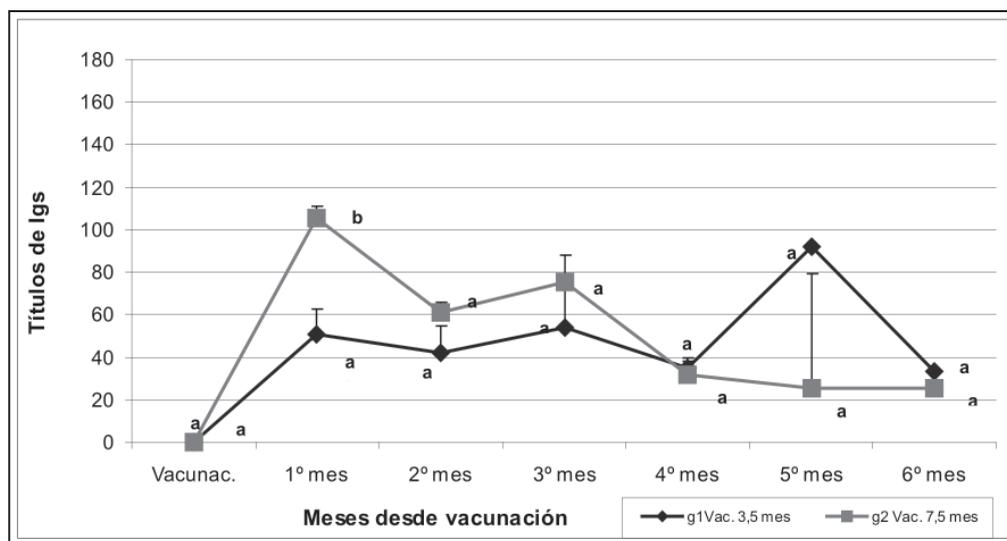


Figura 2. Resultados del 2-ME

\*Letras disímiles entre puntos y líneas indica diferencias estadísticas significativas

Tabla 1. Porcentaje de animales sospechosos y positivos a FPA

Días desde Vacunación	Grupo 1			Grupo 2		
	Sospechosos	Positivos	Nº animales	Sospechosos	Positivos	Nº animales
Día 0	0,0	0,0	31	0,0	0,0	28
28 días	16,7	13,3	30	16,7	25,0	24
59 días	3,7	25,9	27	34,5	25,0	28
89 días	16,7	20,0	30	24,1	10,3	28
127 días	13,8	3,5	29	7,1	3,6	28
153 días	13,8	3,5	29	4,4	0,0	23
182 días	14,3	7,4	14	0,0	0,0	10
218 días	0,0	7,4	14	0,0	0,0	11
280 días	0,0	0,0	10	0,0	0,0	10

Tanto la concentración parcial como total de inmunoglobulinas fueron significativamente superiores en las terneras inmunizadas a mayor edad (7 – 8 meses) en relación a aquellas más jóvenes (3 – 5 meses). La vasta información práctica, sin rigor científica, observada por veterinarios rurales concuerda con los resultados informados en el presente trabajo, no obstante su significado aún es materia de especulaciones. Se presume que la mayor producción de inmunoglobulinas, es consecuente a una superior respuesta inmunitaria por parte de

los animales mayores en relación a los más jóvenes, ya que la edad de los animales fue la única variable entre los grupos. Particularmente la función de las inmunoglobulinas en la protección contra la infección por *Brucella* en bovinos es discutida. Al inicio de la infección y/o vacunación, como resultado de la estimulación del sistema inmunitario predomina la IgM, que opsoniza y favorece la eliminación bacteriana por el accionar del complemento, no obstante a medida que se incrementa la concentración sérica de IgG,

disminuye el accionar bactericida del suero como consecuencia de la aparición de subtipos de IgG bloqueantes<sup>11, 21, 6</sup>. Este fenómeno, beneficiaría la aparición de infecciones crónicas o incluso episodios de abortos, pero a su vez, como mecanismo de defensa, se favorecería la ingestión bacteriana por las células fagocíticas y se evitaría la eliminación sérica masiva de bacterias con su consecuente liberación de endotoxinas<sup>6</sup>. Consecuentemente surgen ciertas preguntas que directamente no han sido respondidas, es decir, la mayor concentración de inmunoglobulinas sanguíneas en los animales inmunizados a mayor edad se correlaciona con un mayor grado de protección cuando el animal es adulto, luego de su tercera o cuarta parición, partiendo de la base que la producción de IgG tiene una relación directa con la inducción de inmunidad de base celular<sup>27</sup>.

Tal vez la mayor fortaleza de la prueba de polarización fluorescente (FPA) es la capacidad de diferenciación entre anticuerpos vacunales de aquellos de origen infecciosos, bajo el programa de vacunación de terneras con la cepa 1917. No obstante, también se destaca su elevada especificidad, simplicidad y rapidez en relación a otros test como ELISA competitivo o seroaglutinación<sup>16, 2, 9, 4, 20</sup>. Los resultados hallados en el presente trabajo concuerdan con los datos informados por Nielsen<sup>16</sup>, en resumen, en casos de animales negativos a BPA, también lo son a las pruebas de FPA y complementarias; pero si es positivo a BPA, FPA tiende a confirmar como positivos a menos animales que las pruebas complementarias, esto es indicativo de su alta especificidad.

Teniendo en cuenta la capacidad de la prueba para diferenciar anticuerpos vacunales de infecciosos, una observación negativa fue el hallazgo de animales positivos desde el mes y hasta los 218 días pos vacunación (Tabla 1). Por lo general, en los sistemas tradicionales de producción de carne, estos animales no se muestrean porque aún no han entrado en servicio (18 a 24 meses de edad), no obstante en aquellas explotaciones con servicio adelantado de vaquillonas, complicaría la

situación epidemiológica, y la ventaja de la FPA con respecto a las pruebas convencionales (seroaglutinación en paralelo con 2-ME) no sería tal. Sorprendentemente, las terneras inmunizadas a mayor edad se tornaron negativas a la prueba de FPA 91 días antes que aquellas inmunizadas a una edad menor (Tabla 1). Indudablemente, la información documentada merita nuevos estudios.

## CONCLUSIONES

- La concentración sérica de inmunoglobulinas totales (IgM y/o IgG) y parciales (IgG) contra brucelosis fue significativamente mayor en aquellas terneras inmunizadas a mayor edad en relación a las más jóvenes.

- Siendo las terneras positivas a BPA, la FPA confirma como positivos a menos animales que las pruebas complementarias, indicando una alta especificidad.

- No es determinante la facultad atribuida a la polarización fluorescente en el hallazgo solo de anticuerpos de origen infeccioso.

- Será imperioso realizar nuevos estudios para determinar si el mayor título de IgG hallado en las terneras inmunizadas a mayor edad se correlaciona con un mayor grado de inmunidad de base celular y de memoria.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, H.; Agab, H. A review of camel brucellosis. *Prev Vet Med.* 2002; 55:47-56.
2. Aguirre, NP.; Vanzini, VR.; Torioni de Echaide, S.; et al. Antibody dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with Brucella abortus strain 19, using seven serological tests. *J Immunoassay Immunochem.* 2002; 23:471-478.
3. Alton, GG.; Jones, LM.; Pietz, DE. *Las técnicas de laboratorios en la brucelosis.* 2nd Edición. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, 1976.
4. Bowden, RA.; Baldi, PC.; Cassataro, J.; et al. 2007. *Brucella. Microbiología Veterinaria.* Stanchi, N. (ed.). Intermedica. Buenos Aires, Argentina, 2007:281-293.

- MEGLIA, G.; GASTALDO, M.; ÁLVAREZ RUBIANES, N.; ORIANI, S.; CERUTTI, D.; DUBARRY, J.; CISTERNA C.; PEREA, J.
5. Corbel, M. Brucellosis: an Overview. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3:213-221.
  6. Corbeil, LB.; Blau, K.; Inzana, TJ.; *et al.* Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun.* 1988; 56:3251-3261.
  7. Cutler, SJ.; Whatmore, AM.; and Commander, NJ. Brucellosis - new aspect of an old disease. *J Appl Microbiol.* 2005; 98:1270-1281.
  8. Dajer, A.; Luna-Martínez, E.; Zapata, D.; *et al.* Evaluation of fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in México. *Prev Vet Med.* 1999; 40:67-73.
  9. Gall, D.; and Nielsen, K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev Science Tech.* 2004; 3:989-1002.
  10. Grillo, MJ.; Barberan, M.; Blasco, JM. Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *Vet Rec.* 1997; 140:602-605.
  11. Huddleson, FI.; Wood, EE.; Cressman, AR.; Bennett, GR. The bactericidal action of bovine blood for brucella and its possible significance. *J Bact.* 1975; 50:261-277.
  12. King, NB., and Frank, NA. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. *JAVMA.* 1961; 139(1):100-103.
  13. Muma, JB.; Lund, A.; Nielsen, K.; *et al.* Effectiveness of Rose Bengal test and fluorescence polarization assay in the diagnosis of *Brucella* spp. infections in free range cattle reared in endemic areas in Zambia. *Trop Anim Health Prod.* 2009; 41:723-729.
  14. Muñoz, PM.; de Miguel, MJ.; Grillo, MJ.; Marín, CM.; Barberan, M.; Blasco, JM. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine.* 2008; 26:2562-2569.
  15. Nicola, AM.; Elena, S.; Alonso, B.; Esteves Madero, J. Evaluation of the Fluorescence Polarization Assay (FPA) for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats in Argentina. *Prilozi.* 2010; 31:133-143.
  16. Nielsen, K.; Gall, D.; Jolley, M.; *et al.* A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J Immunol Methods.* 1996; 195:161-168.
  17. Nielsen, K.; Min, L.; Jolley, M. Fluorescent Polarization Immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods.* 2000; 22:71-76.
  18. Nielsen, K.; and Yu, WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi.* 2010; 31:65-89.
  19. Organización Internacional de Epizootias. Bovine brucellosis. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.* 5th Ed. OIE, Paris. 2004:409-438.
  20. Organización Internacional de Epizootias. 2009. Bovine brucellosis. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.* OIE, Paris. Chapter 2.4.3. 2009:10.
  21. Parma, AE.; Santisteban, G.; Margni, RA. Analysis and in vivo assay of *B. abortus* agglutinating and non-agglutinating antibodies. *Vet Microbiol.* 1984; 9:391-398.
  22. Rice, C.; and Boyes, B. Serum immunoglobulins in bovine brucellosis. *NZ Vet J.* 1971; 19:146-154.
  23. Samartino, LE. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol.* 2002; 90:71-80
  24. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Restablecer el Programa de control y erradicación de la brucellosis bovina en todo el país. Resolución 150/2002.
  25. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Programa de control y erradicación de la brucellosis bovina. Resolución 438/2006.
  26. Szyfres, B. El diagnóstico de la brucellosis bovina en el contexto de un programa de lucha. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Buenos Aires, Argentina. 1983, Boletín Técnico N° 2.
  27. Tizard, IR. *Veterinary immunology: An Introduction.* 8<sup>th</sup> Edition. Saunders. USA, 2008.
  28. Woods, JB. *USAMRIID's Medical Management of biological casualties.* 6th Edition. Fort Detrick, Maryland. U. S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases. 2005:26.