

## **Desarrollo y evaluación de un protocolo serológico de fluorescencia polarizada en el estudio de anticuerpos contra *Brucella spp* en humanos.**

*Alfredo Sánchez-Villalobos<sup>1</sup>, Margelys Urdaneta-Fernández<sup>2</sup>, Elí Rubio-Fuenmayor<sup>2</sup>, Gladys Molero-Saras<sup>3</sup>, Carlos Luzardo-Charris<sup>4</sup> y Carlos Corona-Mengual<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Unidad de Investigaciones Clínicas, <sup>2</sup>Sección grandes animales, Policlínica Veterinaria Universitaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Zulia, Campo Experimental La Cañada, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y

<sup>4</sup>Centro de Investigación Estudiantil de Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo Venezuela.

**Palabras clave:** Brucelosis humana, fluorescencia polarizada, punción capilar.

**Resumen.** A objeto de mostrar el desarrollo y alcance de un método de análisis serológico basado en la técnica de fluorescencia polarizada (FPA) a partir de una gota de sangre obtenida mediante punción capilar, se realizó la determinación de anticuerpos antibrucelosis de un conjunto de 321 personas de alto riesgo laboral. Los resultados se compararon con la data proveniente del análisis de sueros sanguíneos mediante FPA e inmunoanálisis enzimático competitivo (ELISA-c). El número de concordantes fue 318 (99,06%), los 3 discordantes (0,93%) resultaron negativos con fluorescencia polarizada en suero (FPAs) y ELISA-c, pero positivos con FPA capilar (FPAc). Los resultados comparativos de FPAc fueron: sensibilidad: 100%; especificidad: 99,05%; valor predictivo positivo: 66,67%; valor predictivo negativo: 100,0%; proporción de falsos positivos: 0,95%; proporción de falsos negativos: 0%; exactitud: 98,0%; razón de probabilidades: 203,00. La J de Youden para ambos métodos de FPA fue de 0,667. La determinación se consideró confiable y la concordancia de ambos procedimientos de FPA y ELISA-c resultó sin diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ), lo que permite recomendar ampliamente la implementación del estudio de la brucelosis humana con sangre proveniente de punción capilar como método preliminar.

**Development and evaluation of a serological protocol of fluorescence polarization for the preliminary study of *Brucella* spp antibodies in humans.**  
***Invest Clin* 2011; 52(1): 48 - 57**

**Key words:** Human brucellosis, fluorescence polarization, blood capillary.

**Abstract.** In order to show the development and scope of a serological analysis method based on fluorescence polarization assay (FPA) from a drop of blood obtained by the capillary technique, a *Brucella* antibody assay was performed on a group of 321 high-risk workers. The results were compared with data from the analysis of blood serum by FPA and a competitive enzyme immunoassay (ELISA-c). The number of concordance was 318 (99.06%), and discordant 3 (0.93%), which were negative in serum by fluorescence polarization (FPAs) and ELISA-c, but positive with capillary FPA (FPAc). The comparative results FPAc were: sensitivity 100%; specificity: 99.05%; positive predictive value 66.67%; negative predictive value 100.0%; false positive rate: 0.95%; false negative rate: 0%; accuracy: 98.0%; odds ratio: 203.00. The youden J for both FPA methods was 0.667. The identification was considered reliable and the correlation of both procedures, FPA and ELISA-c, was no statistically different ( $P > 0.05\%$ ), which allows to highly recommend the study implementation of human brucellosis with capillary blood as a preliminary method.

*Recibido: 30-01-2010. Aceptado: 19-01-2011.*

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis (BRC) es una enfermedad zoonótica centenaria, que afecta a la mayoría de las especies domésticas, de la cual el hombre es solo un huésped secundario accidental (1-3). Es de difusión cosmopolita, y aunque ha sido erradicada en algunos países industrializados, continúa siendo hoy en día, un grave problema para la salud pública, la producción animal y las economías de muchas regiones (4-6).

Pese a ser una enfermedad de notificación obligatoria, las estadísticas oficiales no reflejan el número real de personas infectadas, por lo que se estima que la verdadera incidencia es 10 a 25 veces más alta que la reportada internacionalmente (3, 6, 7). Los casos a menudo no son reconocidos clínicamente, ni considerada la patología en el

diagnóstico presuntivo del paciente (3, 6). Esto responde, entre otras deficiencias, a la inexistencia de una prueba preliminar, que facilite su identificación inmediata, lo que impide el seguimiento, tratamiento oportuno y la intervención epidemiológica adecuada. Incluso, cuando se despierta la sospecha clínica en un paciente, el diferimiento de un apropiado procedimiento de descarte o confirmación, y el temor a someterse a un proceso invasivo, bloquea la posibilidad cierta del despistaje (6-8).

Aunque el aislamiento de *Brucella* es evidencia irrefutable de infección, los métodos serológicos prueban indirectamente la presencia del germen (2, 9). De las técnicas convencionales usadas como tamiz en el diagnóstico de BRC humana, sólo han sido recomendadas la prueba rosa de bengala (RB) y la del antígeno tamponado en placa

(BPA) (10, 11); aunque importantes limitantes han sido descritas (12). De las denominadas pruebas confirmatorias tradicionales, únicamente resulta útil la prueba de fijación de complemento, aunque pruebas como: lenta en tubo (Wright) y 2-mercaptoetanol, siguen utilizándose en algunos países, pese al rechazo desde el año 2004, por parte de la Organización Mundial en Sanidad Animal (OIE) (11). Si bien se reconoce que fijación de complemento es una prueba sensible y específica, capaz de detectar inmunoglobulinas G (IgG) que predominan en los casos crónicos, tiene el inconveniente del alto poder anticomplementario que presentan algunos sueros, siendo además muy laboriosa y poco apropiada en casos agudos (13).

Las pruebas de unión primaria, de más reciente desarrollo, tienen la ventaja de poseer alta sensibilidad y especificidad, detectan anticuerpos asimétricos comunes en los pacientes humanos crónicos y reducen la reacción cruzada con otros gérmenes gram negativos. El inmunoanálisis enzimático de competencia (ELISA-c) ha demostrado tener una sensibilidad del 98,3% y una especificidad de 99,7%, y detecta casos agudos y crónicos (14). La técnica de fluorescencia polarizada (FPA) tiene la ventaja de realizarse en pocos minutos y detentar una sensibilidad del 96,1% y una especificidad del 97,9% y al igual que ELISA-c detecta casos agudos y crónicos (15).

A pesar de los progresos logrados en el diagnóstico de brucelosis, es menester incorporar algunos procedimientos miniatura a objeto de facilitar la extracción de las muestras y desarrollar protocolos de cuantificación de anticuerpos, que permitan establecer acciones destinadas a identificar de forma preliminar, rápida, sencilla y eficiente a los pacientes humanos infectados. En tal sentido, este trabajo tiene como finalidad mostrar el desarrollo y alcance (en términos de epidemiología clínica) de un mé-

todo de análisis serológico basado en el ensayo de fluorescencia polarizada a partir de una gota de sangre obtenida mediante la técnica de punción capilar.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Dado los propósitos y objetivos trazados y en virtud que la enfermedad bajo estudio ha sido catalogada de riesgo profesional o laboral (3, 4, 6, 16), la población estuvo conformada por cuatro subconjuntos de personas que consintieron participar en el estudio: profesionales de la medicina veterinaria o afines (n= 97; 30,2%); propietarios y/o administradores de fincas (n= 18; 5,6%); trabajadores en tareas directas de sacrificio y/o beneficio de bovinos y cerdos (n= 27; 8,4%); estudiantes de medicina veterinaria o carreras afines (n= 179; 55,7%). La investigación se llevó a efecto durante un año en diferentes escenarios (reuniones de profesionales del agro, ganaderos o estudiantes; en fincas; y en salas de beneficios).

La unidad primaria de análisis consistió en una muestra de sangre capilar que se obtuvo por punción de la yema del dedo pulgar derecho de los pacientes, previamente desinfectada con alcohol de 70°, para lo cual se utilizó un lapicero especial (Accu-Chek Softclix, Roche, Alemania) provisto de aguja (lanceta). Con una micropipeta se recogió una gota de 10  $\mu$ L de sangre que se colocó directamente en un tubo de borosilicato de sodio contentivo de 1 mL de solución tampón previamente diluida (1:25) en agua de-ionizada, según instrucciones del fabricante del estuche diagnóstico de FPA (Diachemix, EUA). Finalmente, se empleó una torunda de algodón empapado de alcohol para mantener la asepsia del sitio y se aplicó ligera presión para contrarrestar el sangrado. Los resultados provenientes de esta gota de sangre a través del ensayo de FPA se identifican como FPA-c.

Fue necesaria una segunda muestra de sangre para evaluar, comparar y corroborar los resultados obtenidos con la muestra de sangre capilar. De ese modo, sangre de la vena cubital fue tomada por personal especializado mediante tubo al vacío, dejada en reposo y posteriormente centrifugada (Clay Adams, Serofuge 2002, EUA) a 1500 g por 6 minutos. El suero obtenido fue colocado en tubos eppendorf de 1,6 mL y se congeló hasta el momento de su evaluación mediante FPA-suero (FPA-s) y ELISA-c. Los sueros controles positivo y negativo para BRC fueron provistos por el fabricante del estuche.

### Procesamiento

#### Prueba con fluorescencia polarizada.

El diagnóstico mediante FPA se realizó atendiendo las indicaciones del manual de procedimiento de la OIE (11) y las observaciones sobre validación hechas para Venezuela (17). Para la prueba se empleó como antígeno un fragmento de 22 kD de la porción O del lipopolisacárido (sLPS) de *B. abortus* (S1119-3) proveniente de Diachemix DLL, EUA. Las lecturas se efectuaron mediante un lector portátil de fluorescencia polarizada de tubo (Sentry 100, Diachemix DLL, EUA) (15, 18, 19). La prueba se consideró válida de acuerdo al criterio de verificación del fabricante, al encontrarse que los sueros controles negativos y positivos se mantuvieron dentro de los valores estándares.

**ELISA competitivo.** El ELISA-c utilizado (SVANOVIR® *Brucella abortus*, Svanova Biotech, Suecia) detecta anticuerpos específicos contra *Brucella abortus*. La metodología empleada a tal efecto ha sido descrita con anterioridad (11, 20-22). La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro modelo Elx 800 de Bio-Tek Instruments®, EUA a 450 nm. La validez de la prueba se estableció según criterios del fabricante, los cuales se cumplieron satisfactoriamente. Posteriormente se calcularon los valores de

densidad óptica (OD) para los controles y las muestras, que conllevaron al porcentaje de inhibición (PI) de la siguiente manera:

$$PI = 100 - \left( \frac{OD \text{ del control o muestra} * 100}{OD \text{ del Control Conjugado}} \right)$$

De manera preeliminar y de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit, todo resultado con PI superior a 30, se consideró positivo.

**Determinación de los valores umbrales.** Ante la inexistencia de ensayos con atributos para ser considerados prueba de oro (14, 15, 21), la inexistencia de investigaciones previas y la imposibilidad de utilizar el análisis de las características del operador receptor (análisis ROC) (11, 21) para determinar los valores umbrales (*cut-off*) y describir directamente la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas comparadas (23), se consideró válido proceder al estudio de un umbral diagnóstico adaptado a las condiciones en la que se llevó a cabo la investigación.

En esencia, los cálculos se realizaron tras un estudio preliminar con 35 pacientes con estatus previo negativo a la enfermedad. Su obtuvo así promedios y desviación estándar para cada prueba. Los puntos de corte se establecieron mediante la sumatoria de cada promedio más tres veces la desviación estándar de dicho cómputo (23, 24). Este punto de corte permitió inferencias directas sobre el nivel de anticuerpos presentes, diferenciado negatividad de enfermedad (24), facilitando la introducción preliminar de estas pruebas diagnósticas en la especie humana.

### Análisis estadístico

El estudio tuvo como base la aplicación de principios y métodos estadísticos dirigidos al diagnóstico de problemas médicos dentro de la doctrina de la epidemiología clínica, para lo cual se utilizó el paquete

estadístico Win Episcopo® versión 2,0 de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (España) y obtenido desde [http://infecepi.unizar.es/ratio/soft\\_sp.htm](http://infecepi.unizar.es/ratio/soft_sp.htm).

Las estimaciones fueron hechas con un nivel de significancia de 0,05 admitiendo un error del 5% y un intervalo de confianza del 95%. Las informaciones procedentes de la investigación se organizaron, analizaron y presentaron mediante elementos de estadística descriptiva (25), lo que permitió definir de forma precisa las variables estudiadas. Se determinó la proporción de positivos y negativos para cada prueba. Los datos concernientes se presentaron en Tablas.

## RESULTADOS

Los resultados generales de la investigación registran concordancia parcial entre los ensayos de FPA-s y FPA-c, Tabla I, donde se evidencia que sólo 6 de 9 pacientes previamente positivos a esta prueba, fueron confirmados por ELISA-c y FPA-s. Encontrándose concordancia perfecta entre estas dos últimas, Tabla II. En esa misma Tabla se engloba la data correspondiente a la validez, seguridad y coeficiente de verosimilitud, entre otros, de la técnica de FPA-c en comparación a los otros ensayos, destacándose que la capacidad de detección de pacientes positivos a BRC fue de un 100%.

## DISCUSIÓN

En general, al estudiar el alcance de una prueba diagnóstica se espera, entre

otras características, que posea alta sensibilidad para poder captar a todos los enfermos (26), aspecto que se demuestra respecto a FPA-c. Pero, dado que la BRC es una enfermedad de graves consecuencias y de tratamiento difícil (6), es lógico que despierte gran interés determinar la ausencia de la enfermedad, por lo que una alta especificidad, también es necesaria. Varios han sido los intentos en desarrollar una prueba rápida para el despistaje de BRC (27, 28) sin lograr satisfacer tales requerimientos hasta el presente. Sin embargo, los hallazgos presentados en este informe avalan el establecimiento de la prueba FPA-c como prueba tamiz. Pese a estas cualidades, cabe destacar que tras el despistaje se requieren pruebas diagnósticas confirmatorias que, en especial, posean excelente valor de predicción positivo y de especificidad.

El análisis comparativo de los datos de la Tabla II permite sostener que FPA-c posee un buen nivel de seguridad, representado por los valores de predicción positivo y negativo (VP+: 66,67%; y, VP-: 100%). Ello refleja que un resultado positivo tiene una probabilidad del 66,67% de resultar con BRC y que uno negativo posee una credibilidad del 100% de estar realmente sano. Estas cifras, aunque inferiores a las pruebas con las que se compara, se consideran satisfactorias y permiten gracias a la excelente sensibilidad, simplicidad del método y bajo costo económico, recomendar ampliamente el uso de FPA-c cuando se requiera la pesquisa presuntiva de BRC.

**TABLA I**  
RESULTADOS COMPARATIVOS DE BRUCELOSIS DE PACIENTES HUMANOS CON RIESGO OCUPACIONAL MEDIANTE LOS MÉTODOS DE FLUORESCENCIA POLARIZADA EN SANGRE CAPILAR (FPA-c) Y DE ELISA-c / FPA-s EN SUERO SANGUÍNEO

		Pos ELISA-c /FPA-s	Neg ELISA-c /FPA-s	
FPA Capilar	Pos	6	3	9
	Neg	0	312	312
Total		6	315	321

**TABLA II**  
 VALIDEZ, SEGURIDAD Y VEROSIMILITUD DE LA TÉCNICA DE SANGRE CAPILAR  
 EN EL DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE BRUCELOSIS HUMANA MEDIANTE EL ENSAYO  
 DE FLUORESCENCIA POLARIZADA

	FPAc	FPA <sub>s</sub>	ELISA-c
Muestras		321	
Concordantes		99,06%	
	-		100%
Discordantes		0,93%	
	-		0%
J De Youden		0,667	
	-		0,999
	Promedio	Límite inferior	Límite Superior
Sensibilidad	100%	100%	100%
Especificidad	99,05%	97,98%	100%
Prevalencia V.	1,87%	0,39%	3,35%
Prevalencia A.	2,80%	0,99%	4,61%
Valor Predictivo Positivo	66,67%	35,87%	97,47%
Valor Predictivo Negativo	100%	100%	100%
Verosimilitud Positiva	105	34,05	323,81
Verosimilitud Negativa	0	0	0
Falsos Positivos	0,95%	%	%
Falsos Negativos	0%	0%	0%
Exactitud	98%	96,89%	99,97%
Razón de Probabilidades	203,00	28,73	1434,21

FPA= fluorescencia polarizada. FPAc= FPA capilar. FPA<sub>s</sub>= FPA suero. ELISA-c= ensayo inmunoanálisis competitivo. Prevalencia V.= Prevalencia verdadera. Prevalencia A.= Prevalencia aparente. IC95%.

Es importante destacar que el concepto de valores predictivos presenta la limitante de depender en gran medida de lo frecuente que sea la enfermedad a diagnosticar en la población objeto del estudio (29). Cuando la prevalencia es baja (como en el caso que se estudia) un resultado negativo permitirá descartar la enfermedad con mayor seguridad. Por el contrario, un resultado positivo no permitirá confirmar el diagnóstico, traduciéndose en un bajo VP+. Queda de esa forma establecido que, en virtud que la prevalencia es un factor determi-

nante de los valores predictivos de un test, éstos no pueden ser utilizados como índices a la hora de comparar dos métodos diagnóstico diferentes, ni tampoco a la hora de extrapolar resultados de otros estudios a datos propios, por lo que resulta necesario determinar otros índices de valoración que no dependan de la prevalencia.

La razón de verosimilitud o de probabilidad ofrece la ventaja de relacionar la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica en un mismo índice, que no varía con la prevalencia, lo cual permite utilizar-

lo como índice de comparación entre diferentes pruebas para un mismo diagnóstico, en este caso BRC. Así, la razón de verosimilitud positiva para el diagnóstico de BRC mediante FPA-c fue excelente. Este índice señala que una prueba de sangre capilar positiva es 105 veces más probable en un paciente con BRC que en uno sano, y que un resultado negativo es apenas probable en uno saludable.

El valor de la J de Youden es otra medida del grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas, de forma que los valores próximos a uno (1) o a menos uno (-1), indican concordancia total, mientras que los valores cercanos a cero (0) denotan discordancia. De esa forma, la prueba FPA-c mostró buenos valores de concordancia (0,667) con FPA-s; mientras que entre FPA-s y ELISA el grado de correspondencia fue casi total (0,999). La medida del error diagnóstico corroboró la alta confiabilidad de la prueba en el despistaje de BRC, siempre y cuando las condiciones que determinan la prevalencia se mantengan intactas.

Dado que los resultados reportados provienen de una investigación sin precedentes, una comparación directa y extrapolación con otras indagaciones, como ya se señaló, no es posible. Otros trabajos se han desarrollado a objeto de medir los logros y alcances de FPA y ELISA-c individualmente e incluso, su eficiencia ha sido comparada. Lucero y col. (15) compararon la utilidad potencial de FPA, ELISA-c y las pruebas serológicas convencionales con los resultados de cultivos bacteriológicos en el diagnóstico de BRC en un total de 587 sueros de humanos. La sensibilidad de FPA se estimó en 96,1% y la especificidad fue de 97,9% con un valor de corte similar al utilizado en la presente investigación. La validez reportada para ELISA-c fue similar, aunque se identificaron algunas discrepancias con FPA, las cuales se asociaron con

bajos niveles de anticuerpos en pacientes en recuperación (15).

Otras importantes razones que impiden una comparación entre investigaciones precedentes, tienen que ver con las características epidemiológicas propias de la BRC humana y la forma sesgada en que han sido manejados los grupos controles dentro de muchas indagaciones. Martín-Moreno y col. (30) indicaron que en la mayoría de los estudios, los grupos controles estuvieron integrados por individuos saludables o pacientes con otras enfermedades o ambos y no por pacientes que estaban expuestos por razones laborales a la BRC. Este sesgo llevaría, en áreas endémicas, a desaciertos a cerca de la validez y presunta seguridad de las pruebas estudiadas (12), dado el carácter oligosintomático, o incluso asintomático y autolimitado de la enfermedad, la exposición múltiple a la infección (28), la persistencia de anticuerpos –IgG– durante muchos meses después de la conclusión del tratamiento y episodios de infección comunes (31). Lo cual explica la alta seroprevalencia de anticuerpos anti-Brucella en regiones endémicas y en los individuos. Este tipo de razonamiento permitió a Ruiz-Mesa y col. (12) advertir que la prueba RB no es fiable como única herramienta de diagnóstico para BRC en zonas endémicas para personas que están expuestas en repetidas ocasiones a la enfermedad, y menos aún con las personas que tienen una historia reciente de la enfermedad.

Las diferencias encontradas entre los dos procedimientos de FPA (FPA-c y FPA-s) puede solo deberse al origen primario de la muestra. Si bien, la sangre capilar tiene muchas ventajas, tales como ser relativamente fácil de obtener, también se han reportado desventajas (32): se obtiene poca cantidad, las mediciones pueden resultar inexactas, como electrolitos falsamente elevados y valores de conteos sanguíneos inconsistentes. Además, de los riesgos asocia-

dos con el procedimiento de extracción. Sin embargo, estos aspectos se contraponen a las características intrínsecas que envuelven la obtención de suero sanguíneo, que resulta siempre un método invasivo y doloroso, por lo que en general es rechazado por las personas, especialmente aquellas de bajo grado de instrucción (15, 22, 28).

Adicionalmente, la metodología exigida en la mayoría de pruebas diagnósticas involucra procedimientos laboriosos que se traducen en retraso en la condición de salud de los pacientes (6, 15), aunque esta afirmación requiere de un análisis más profundo, ya que por las características del sLPS de *Brucella*, este agente patógeno tiene una capacidad muy baja para causar sepsis severa, shock y coagulación intravascular diseminada (12), de modo que un retraso en el tratamiento durante unos pocos días puede no afectar el pronóstico. Como los resultados de las pruebas están generalmente disponibles dentro de las 48 h, no cabría justificación alguna para no usarlas en pacientes en particular (12). Lo importante, en todo caso, sería reducir la carga de trabajo y costo, al utilizar de manera primaria una prueba tamiz como FPA-c.

En conclusión, pese a los importantes avances realizados en el diagnóstico de BRC en humanos, el mismo aún depende de la demostración de anticuerpos específicos por medio de diferentes técnicas serológicas (8, 26, 28, 32). Esto se debe principalmente a la falta de una técnica ideal y porque la mayor incidencia se encuentra en los países subdesarrollados con pobres recursos técnicos, así como al hecho que la enfermedad tiende a ocurrir en las zonas rurales (12, 30). Sobre este panorama, es indudable que una prueba tamiz incruenta, miniatura, fácil, rápida de ejecutar e interpretar, con excelentes índices de validez, seguridad y verosimilitud comparada, podría ser fácilmente asumida por entes públicos y privados para el despistaje de BRC en zonas en-

démicas. Tras la identificación de los pacientes reaccionantes, pruebas confirmatorias como FPA y/o ELISA-c serán requeridas para la confirmación definitiva de la enfermedad.

#### AGRADECIMIENTO

Los resultados mostrados derivan de los trabajos del programa "Salud Poblacional: Vigilancia Epidemiológica para brucelosis", y han sido posibles gracias al cofinanciado de la Comisión de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES LUZ). A los pacientes que colaboraron para la realización de este trabajo. Especial tributo al señor Daniel Boscoboinik (Argentina) y a la empresa Diachemix DLC (EUA) por el apoyo dispensado.

#### REFERENCIAS

1. **Ariza J, Pellicer T, Pallares A, Foz A, Gudiol F.** Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992; 14:131-140.
2. **Lucero NE, Siñeriz F.** The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech Develop Rev* 2005; 8(1):99-120.
3. **Yagupsky P, Baron EJ.** Laboratory exposures to *brucellae* and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis* 2005; 8:1180-1185.
4. **Lucero NE, Greco G, Carrete PA.** *Brucella melitensis* biovar 3 in Argentina?. *Rev Argent Microbiol* 1999; 31(suppl 1):58-59.
5. **Pessegueiro P, Barata C, Correia J.** Brucelose -uma revisão sistematizada. *Med Interna*. 2003; 10(2):91-100.
6. **Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI.** A new variant of *Brucella melitensis*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:593-596.
7. **García-Carrillo C.** In Animal and human brucellosis in the Americas. Office International des Epizooties, Paris, France. 1990; 4-30.

8. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352:2325-2336.
9. García-Carrillo C, Lucero NE. Diagnóstico bacteriológico. De Diego (Ed.), Brucelosis bovina. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 1993, P 97-98.
10. Lucero NE, Bolpe JE. The buffered plate antigen as a screening test for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1425-1427.
11. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Brucelosis bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2006, p 445-476.
12. Ruiz-Mesa JD, Sánchez-González J, Reguera JM, Martín L, López-Palmero, S; Colmenero JD. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:221-225.
13. Gazapo EJ, González-Lahoz J, Subiza L, Baquero M, Gil J, de la Concha E. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time -importance for diagnosis and follow up. *J Infect Dis* 1989; 159:219-225.
14. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K. Competitive Enzyme Immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10), 3245-3248.
15. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Paulo PS, Nielsen K. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *J Med Microbiol* 2003, 52:883-887.
16. Young EJ. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1995, 21:283-290.
17. Sánchez-Villalobos A, Pino-R D, Becerra-R L, Gutiérrez JC, Boscán-O J, García-B D, Molero-SG. Validación de la prueba fluorescencia polarizada en el diagnóstico de brucelosis y comparación con otras pruebas bajo condiciones naturales de infección en Venezuela. *Rev Cientif FCV-LUZ* 2008, XVII (supl 1):497-498.
18. Nielsen K, Gall D, Lin M, Massangill C, Samartino L, Pérez B, Coats M, Hennager S, Dajer A, Nicoletti P, Thomas F. Diagnosis of bovine brucellosis using homogeneous Fluorescence Polarization Assay. *Vet Immunol Immunopathol* 1998, 68: 321-329.
19. Megiven JA, Tucker JD, Perrett LL, Stack JA, Brew SD, Macmillan AP. Validation of FPA and eELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and Ielisa. *J Immunol Methods* 2003; 278 (1-2):171-178.
20. Araj GF, Lulu AI, Mustafa MY, Khateeb MI. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J Hyg Lond* 1986; 97:457-469.
21. Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Balsevicius S, Nicoletti P, Kelly W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46:285-291.
22. Young EJ. Utility of the enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing neurobrucellosis. *Lett Clin Infect Dis* 1998, 26:1481.
23. Argimon-Pallás JM, Jiménez-Villas J. Contextos de la investigación en ciencias de la salud. Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica. 3era Ed. Madrid. 2004, P 1-404.
24. Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev Sel Tech Off Inf Epiz* 1998, 17: 507-526.
25. Wright PF, Nilsson E, Van roodij M, Letenta M, Jeggo M. Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for detection of antibody in infectious diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1993, 12:435-450.
26. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits H. Human brucellosis. *The Lancet Infect Dis* 2007; 7(12):775-786.
27. Smits H.L, Basahi M, Díaz R, Marrodan T, Douglas J, Rocha A, Veerman J, Zheludkov M, Witte O, Jong J, Gussenhoven G, Goris M, van der Hoorn M. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12):4179-4182.
28. Abdoel T, Smits H. Rapid latex agglutination test for the serodiagnosis of human

- brucellosis. *Diag Microb Infect Dis* 2005; 57(2):123-128.
29. **Lucero NE, Ayala SM, Escobar, GI, Jacob NR.** The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 2007; 3:27-35.
  30. **28. Martín-Moreno S, Guinea-Esquerdo L, Carrero-González P.** El diagnóstico de la brucelosis en un área endémica. Valoración de las pruebas diagnósticas habituales. *Med Clin* 1992; 98:481-485.
  31. **Takkouche B, Iglesias J, Alonso-Fernández JR, Fernández-González C, Gestal-Otero JJ.** Detection of *Brucella* antibodies in eluted dried blood: a validation study. *Immunol Letters* 1995; 45(1-2): 107-108.
  32. **Kunda J, Fitzpatrick J, Kazwala R, French NP, Shirima G, MacMillan A, Kambarage D, Bronsvort M, Cleaveland S.** Health-seeking behaviour of human brucellosis cases in rural Tanzania. *BMC Public Health* 2007; 7:315.