

21
29



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán

Determinación de la Incidencia de Brucelosis en Ganado Bovino Lechero en la Región de Ixmiquilpan, Estado de Hidalgo (Valle del Mezquital)

Tesis Profesional

Que para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista

presenta

AURELIO CLARO MAYORGA

Asesor: M.V.Z. ARMANDO ENRIQUE ESPERON SUMANO

México, D. F.

1988

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

1.- INTRODUCCION	1
2.- ANTECEDENTES	4
3.- MATERIALES Y METODOS	23
4.- RESULTADOS	31
5.- DISCUSION	35
6.- CONCLUSIONES	40
7.- BIBLIOGRAFIA	42

1. INTRODUCCION

Las infecciones causadas por las diferentes especies de Brucela en los animales domésticos y en el ser humano, se encuentran ampliamente distribuidas en todos los países del mundo, causando así graves pérdidas económicas en la industria y constituyendo una constante amenaza en la salud pública (5, 9, 10, 11, 13, 14).

En nuestro país, la brucelosis bovina se encuentra difundida en todo el territorio nacional y en forma más manifiesta en explotaciones intensivas y en zonas con condiciones climatológicas y tipo de terreno que favorecen la mayor persistencia del germen, esto es, el sureste, zonas costeras y centro del país, principalmente (10, 22).

Por lo general, la enfermedad se caracteriza por afectar los órganos genitales, produciendo de esta manera una reducción considerable de la eficiencia reproductiva de los animales (10, 14). En México, según estudios realizados por diversos autores, las pérdidas económicas ascienden a varios miles de millones de pesos anuales y tomando en cuenta que afecta a la mayoría de las especies domésticas, más aún si consideramos que los datos manejados en estos estudios son hasta cierto punto relativos, ya que no se ha logrado cuantificar de manera exacta lo que con da-

tos reales, estas cantidades ascenderían aún más (2, 5). - Esto nos da un panorama del problema causado por la enfermedad.

Siendo una enfermedad de carácter zoonótica, en el hombre es conocida como "Fiebre de Malta" o "Fiebre Ondulante" cuyo aspecto de mayor interés es tratarse de una enfermedad de tipo profesional o laboral, ya que los afectados - con mayor frecuencia son los trabajadores de rastros, ganaderos y médicos veterinarios (9, 11, 24).

Ahora bien, desde que Bruce aisló por primera vez este agente, se han realizado numerosos estudios tendientes a - conocer plenamente los métodos de diagnóstico, control y - erradicación de la enfermedad (27). Probablemente la Brucelosis cuenta con más pruebas de diagnóstico que ninguna otra enfermedad; sin embargo, las dificultades técnicas siguen creando la necesidad de desarrollar investigaciones - con el propósito de incrementar la eficiencia de las técnicas de laboratorio (20). Este aspecto se torna más importante por la necesidad que existe por diferenciar entre - animales con anticuerpos por infección natural y aquellos con anticuerpos vacunales, tomando en cuenta que en los - últimos años se está utilizando como medida de prevención en ganado adulto la aplicación de la vacuna de Brucella abortus (B. abortus) dosis reducida, lo que hace que la ma

yorfa de las pruebas no sean confiables por si solas para emprender medidas de control y/o erradicación de la enfermedad en forma satisfactoria (19, 23, 27).

1.1. OBJETIVOS

a).- Determinar a través de una encuesta serológica - la incidencia de la enfermedad en la región de Ixmiquilpan (Valle del Mezquital), donde se está impulsando la explotación de ganado lechero.

b).- Conocer hasta qué grado ha influido en este renglón, el hecho de que un gran porcentaje del ganado llevado a la región, provienen de dos Estados de la República - con alta incidencia de Brucelosis (Querétaro y México).

c).- Al final de la encuesta serológica, sugerir posibles medidas de prevención y/o control de la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1. CARACTERISTICAS DE LA ENFERMEDAD.

La Brucelosis se define como una enfermedad infecto-contagiosa, generalmente de curso crónico que se presenta en los animales y en el hombre. En el ganado, se caracteriza por manifestar procesos localizados y afectar principalmente a los órganos de la reproducción ocasionando el aborto en las hembras gestantes, infertilidad temporal o permanente y consecuentemente disminución de la producción lactea (8, 22).

En 1887, Sir David Bruce descubre que la etiología de la Fiebre de Malta en el hombre y en la cabra es la Brucella melitensis, y es en honor a él que la enfermedad recibe el nombre de Brucelosis. Sin embargo, no es sino hasta 1897 cuando Frederik Bang en Dinamarca realiza el aislamiento e identificación de Brucella abortus (B. abortus) a partir de fetos bovinos abortados y membranas fetales, por lo que la enfermedad en ganado bovino fue designada como "enfermedad de Bang" o "enfermedad abortiva de Bang" (2, 10, 26).

En nuestro país, el primer caso de brucelosis humana fue reportado por Carbajal en 1906 y en 1937 se iniciaron

estudios en ganado bovino y caprino sobre esta enfermedad que se encuentra difundida en todo el territorio nacional (21, 22, 24).

2.2. AGENTE ETIOLOGICO.

La enfermedad es causada por micro-organismos del género *Brucella*; en el caso de los bovinos el agente específico es *B. abortus*, pero ocasionalmente puede ser causada por *B. suis* o *B. melitensis*, esto nos indica que se pueden dar infecciones cruzadas y casi todas las especies domésticas son susceptibles. Además de las especies antes mencionadas, se conocen otras tres que son: *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae* (7, 10, 17, 18).

Los miembros del género *Brucella* son bacterias Gram negativas, cuyo tamaño van de 0.5 a 0.7 μ , de forma coccobacilar, inmóviles, no poseen cápsula, tampoco forman esporas. La mayoría de las especies son catalasa y oxidasa positivas. Si bien las brucelas utilizan carbohidratos, éstas no producen ácidos ni gas en cantidades significativas, por lo que es imposible demostrar el uso de carbohidratos mediante las pruebas bioquímicas comunes. La temperatura y pH óptimos para el crecimiento de estos microorganismos es de 37°C y 6.8 respectivamente (10, 14).

Las brucelas son gérmenes aerobicos estrictos; algunas de ellas requieren sobre todo para su aislamiento inicial, se añada CO_2 a la atmosfera de incubación en proporción de 5 al 10%, este es el caso de B. abortus (12).

Los medios de cultivo requieren de tiamina, niacina y biotina para su crecimiento y el pantotenato de calcio tiene con frecuencia efecto estimulante (10).

La diferenciación de las seis especies y sus biotipos se efectúa en base a su capacidad de producir H_2S , necesidades de CO_2 y habilidad de crecer en medios conteniendo concentraciones variables de fusina básica y tironina, aglutinación por sueros monoespecificos y susceptibilidad a sufrir lisis por el fago tibilisi. Asimismo, es de gran importancia determinar los patrones de metabolismo oxidativo para la identificación de las especies del género *Brucella* y sus biotipos correspondientes (12).

Por último, las especies del género *Brucella* se caracterizan por mostrar cierta especificidad de hospedero, lo que es de importancia para su clasificación (12, 14).

De las seis especies de *brucella* que se conocen, solo B. ovis y B. canis se presentan en forma rugosa (R), las colonias de las otras especies se presentan predominante-

mente en forma lisa (S), aunque son susceptibles a presentar disociación, originando cuatro tipos de colonias diferentes: lisa, intermedia, mucoide y rugosa. Estos cambios ocurren en la superficie de la célula al modificarse el contenido de lípidos y polisacáridos, lo cual parece estar asociado con sus propiedades antigénicas y virulencia; de tal forma que las colonias lisas (S) suelen ser más patógenas que las rugosas (10,12).

Se ha demostrado la presencia de dos antígenos primordiales en la superficie de las brucellas lisas, mismos que fueron identificados como A y M. Estos antígenos están compuestos por lipopolisacáridos y cantidades variables de polipeptido, que poseen características endotóxicas similares a las endotoxinas de las enterobacterias. La fracción polisacárida de estos antígenos es la que posee mayor capacidad antigénica y es responsable de la especificidad. La proporción de estos antígenos es variable según la especie de brucella lisa que se trate, a diferencia de las colonias rugosas que poseen composición y características antigénicas similares entre sí (12, 14).

Varios autores han señalado que el crecimiento de las brucellas es estimulado por el carbohidrato eritritol, por lo que se explica su localización preferente sobre las membranas placentarias y tejidos fetales en las hem-

bras, y en epidídimo, tejido testicular y vesículas seminales en los machos, en donde se encuentra dicho sustrato con cierta abundancia (10, 12, 17).

2.3. TRANSMISION.

La brucelosis es transmitida por varias vías, siendo la vía oral la más común. Por tal razón, la ingestión de alimentos y agua de bebida contaminados con cualquiera de las materias virulentas juegan el principal papel en la infección natural de la enfermedad; siguen en importancia a la vía digestiva, las mucosas conjuntivales, genitales externos y la cutánea, ya sea a través de la piel intacta o lesionada. La transmisión venérea o coital de la enfermedad por toros infectados a vacas susceptibles, puede ocurrir, pero no es común, ya que la eliminación de brucelas a través del esperma solo ocurre en casos raros de sementales fuertemente contaminados y con orquitis o vesiculitis (8, 10, 17, 18, 22). La infección puede ser transmitida también mediante la inseminación artificial cuando se utiliza semen contaminado y éste es depositado en útero (3, 17, 18).

Las vías de eliminación del germen más importantes son: las cubiertas fetales, líquido amniótico y feto abortado, excremento de animales recién nacidos, secrecio

nes vaginales que fluyen tras el aborto, la leche, que puede constituir una fuente de eliminación continua ya que presenta brucellas prácticamente todo el tiempo que dura la infección, la orina, sobre todo durante los primeros 2 a 5 meses de enfermedad. El esperma, solo en raras ocasiones constituye una vía de eliminación (7, 17, 22).

Es importante señalar, que una vaca infectada es el medio más corriente de diseminación de la enfermedad tanto dentro del hato, como de un hato a otro. Los fetos abortados y envolturas fetales pueden ser llevados de una explotación a otra por medio de perros, zorras y coyotes principalmente, pero también puede ser diseminados por roedores y pájaros; los vehículos lavados y desinfectados incorrectamente al transportar ganado sano pueden infectarlo. Otras formas de contagio y difusión de la enfermedad que no deben descartarse son los mercados, ferias y exposiciones donde hay contacto con ganado extraño y los cercos sucios e incluso es posible que los arroyos o drenajes que cruzan de una explotación a otra pueden diseminar la enfermedad (22).

En cuanto a resistencia, las brucellas son altamente susceptibles a la acción directa de los rayos solares. En tejido necrótico, tanto en fetos como en placenta, estas bacterias son capaces de vivir hasta por seis meses; mien-

tras que en el suelo, en ambiente seco y protegidas de la luz solar resisten de dos a tres meses. En agua, leche, orina y otras secreciones, en bajas temperaturas pueden vivir hasta dos o más años. A la pasteurización las brucellas son destruidas fácilmente. Para la desinfección, se obtienen resultados satisfactorios usando fenol, formol, cuaternarios de amonio o sosa (12).

2.4. HOSPEDERO.

En el ganado bovino, la infección natural casi siempre es causada por Brucella abortus, aunque ocasionalmente puede ser por Brucella melitensis y Brucella suis; las cabras y las ovejas son huéspedes comunes de la Brucella melitensis, pero la Brucella abortus puede provocarles la enfermedad aunque con menor frecuencia; en cerdos, la enfermedad es causada casi exclusivamente por biotipos de Brucella suis, pero también pueden ser susceptibles a B. abortus en los perros se sabe que la infección natural es debida generalmente por Brucella canis, pero no se descarta la posibilidad de que la enfermedad sea causada por B. abortus, B. suis o B. melitensis; finalmente, el caballo puede ser infectado con Brucella Spp., especialmente B. abortus o B. suis. Así pues, podemos observar que las especies animales, aunque cada uno es hospedador natural de un tipo de Brucella, puede producirse la infección cruzada por otros

tipos, siendo esto más esporádico y por tanto, con menor capacidad de difusión y persistencia ya que la *Brucella* se propaga más fácilmente entre los animales de la especie hospedadora natural (18, 22). Cabe mencionar que el hombre puede ser hospedador de cualquiera de las especies de *Brucella* ya citadas, aunque las infecciones más severas son las causadas por *Brucella melitensis* (9, 24).

También ha de considerarse la brucelosis en animales silvestres, ya que pueden actuar como reservorios y fuentes de infección para los animales domésticos y al hombre. Actualmente se ha demostrado la enfermedad en ratas, ratones, venados, zorras, camellos, búfalos, renos, yaks, gamuzas, antílopes, llamas, liebres, impalas y otros (10).

2.4.1. PATOGENIA.

Las brucellas al introducirse a los tejidos a través de las mucosas son ingeridas por células fagocitarias que las transportan a los tejidos del sistema retículo endotelial. Las bacterias se multiplican en el interior de estas células y llegan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales provocando así una linfadenitis; algunas células mueren liberando bacterias y factores que activan la multiplicación de más mononucleares. Las células parasitadas que sobreviven son transportadas al torrente sanguí-

neo causando así una bacteremia, la cual puede persistir por mucho tiempo. La diseminación hemática de las bruceelas le permite llegar a los órganos y tejidos de su predilección como son: bazo, nódulos linfáticos, glándula mamaria y especialmente útero gravido, placenta y tejidos fetales; en los machos, la bacteria se localiza principalmente en tejidos linfoides, testículos y glándulas accesorias. Ocasionalmente se localiza en las estructuras sinoviales causando así una tendovaginitis, artritis o bursitis subcutánea principalmente tarsiana y carpiana (3, 10 - 17).

La reacción inflamatoria es el principal mecanismo de acción de las bruceelas en el tejido placentario. Especialmente en los placentomas, las bacterias penetran y se multiplican dentro del citoplasma de las células epiteliales coriónicas. Así, las células parasitadas pueden necrosarse y desprenderse de la membrana basal de las vellosidades del corión, ésto provoca trastornos en la nutrición del feto que a la vez puede contraer la enfermedad ya sea por vía sanguínea cuando las bruceelas entran al torrente sanguíneo a través de las vellosidades o bien, directamente por vía digestiva al deglutir el líquido amniótico rico en gérmenes. Todo lo anterior acelera la placentitis, provocando poco a poco la muerte del feto y finalmente con la expulsión da lugar al aborto. En el caso de las hembras -

no gestantes, la enfermedad puede permanecer latente y desarrollarse hasta el momento de la gestación. En los machos, la infección se localiza sobre todo en testículos, epidídimo y glándulas accesorias, adquiriendo generalmente carácter de tipo crónico (16, 22).

Los bovinos jóvenes muestran una relativa insensibilidad hasta que alcanzan la pubertad. Pueden ser infectados por vías y procedimientos comunes, incluyendo la ingestión de leche contaminada, pero la infección desaparece en el curso de pocos meses (17).

2.4.2. MANIFESTACIONES CLINICAS.

El aborto después del quinto mes de gestación constituye signo clínico fundamental de esta enfermedad, este aborto suele ser espontáneo y seguido frecuentemente de retención placentaria y metritis. En la siguiente gestación el aborto tiene lugar más tardíamente, para terminar el proceso clínico con un parto prematuro o bien con un parto aparentemente normal pero con producto poco viable, siendo muy rara la presentación de tres abortos consecutivos (3, 18, 22). De las vacas infectadas, el aborto ocurre aproximadamente en un 65% por primera vez; en un 23% en dos ocasiones y un porcentaje mínimo, más de dos abortos. Además gran porcentaje de las vacas afectadas sufren daños en su

capacidad reproductiva (10).

En los toros se puede observar orquitis y epididimitis, que puede ser uni o bilateral con tumefacción aguda y dolorosa que aumenta hasta dos veces su tamaño normal. La tumefacción persiste durante varias semanas y los testículos experimentan necrosis por licuefacción quedando finalmente destruidos si la infección es grave. Con frecuencia las vesículas seminales son afectadas pudiendo advertirse su agrandamiento por palpación rectal. Los toros enfermos suelen ser estériles cuando la orquitis es aguda, pero pueden recuperar su fecundidad normal sobre todo si la afección ha sido unilateral y no muy severa. Estos animales pueden actuar como propagadores potenciales de la enfermedad si se utilizan para inseminación artificial, pues el semen contiene exudado inflamatorio y bacterias viables (3).

2.4.3. LESIONES.

La Brucella abortus tiene una especial afinidad con el endometrio gestante y la placenta, produciendo lesiones con una variación considerable dependiendo la gravedad y avance de la enfermedad. Cuando las lesiones son graves, resulta frecuente el aborto o el parto prematuro, en cambio cuando la severidad es menor el ternero puede nacer a

término y ser o no viable.

El útero gestante y algunas veces la placenta infectados, tienen apariencia externa normal, pero entre el endometrio y el corión en la zona intercotiledonaria hay un exudado más o menos abundante inodoro, de color amarillo sucio, viscoso y espeso, conteniendo residuos floculentos con tonalidad gris amarillenta. Las membranas fetales y el cordón umbilical están saturados de líquido edematoso, pudiendo también presentar un engrosamiento hasta de 1 cm. o más; y aunque los fluidos fetales suelen tener una apariencia normal, en ocasiones el líquido amniótico es viscoso (17).

Las lesiones placentarias no son uniformes. Los cotiledones pueden estar afectados en grado muy variable, apareciendo así desde algunos más o menos normales hasta otros con necrosis muy extensa. En la placenta intercotiledonaria las lesiones son más manifiestas en zonas próximas a los cotiledones, además de mostrar engrosamientos y contener un fluido gelatinoso opaco amarillento y denso, se recubre con coágulos de exudado inflamatorio y células epiteliales degeneradas y descamadas. Los cotiledones afectados aparecen blandos y de color amarillo-grisáceos pudiendo estar recubiertos de un exudado pardo viscoso e inodoro (17, 25).

En el estroma placentario afectado hay una marcada leucocitosis, destacando fundamentalmente células mononucleares y algunos neutrófilos. Sobre los placentomas suele observarse el mismo tipo de placentitis, pero la afección de las células epiteliales que recubren las vellosidades cotiledonarias no es tan grave, salvo en su base o en el epitelio de las criptas carunculares. Las porciones intervellosas de la placenta o arcadas placentarias son severamente afectados, acumulándose en este lugar el exudado inflamatorio. En estos espacios normalmente hay algo de exudado placentario y pequeñas hemorragias, pero en el proceso de enfermedad el volumen es muy exagerado con alto contenido de leucocitos, restos epiteliales y bacterias. Los placentomas en su porción materna no están afectados, excepto en los extremos dilatados de las vellosidades que se encuentran bañadas en exudado contenido en las arcadas placentarias, consecuentemente se encuentran desnudas y con necrosis superficial. En las vellosidades maternas, debajo de las zonas necrosadas hay infiltración de leucocitos y una manifiesta inflamación productiva. La hipertrofia inflamatoria de las vellosidades maternas en sus porciones terminales origina un mayor grado de trabamiento placentario y probablemente a esto se deba la alta frecuencia de retención de placenta en esta enfermedad (17, 25, 26).

En el feto, las lesiones que causa son especialmente en el

cuajar en donde se encuentran masas de moco de color blanco o amarillento; en las paredes del estómago, intestinos y vejiga se pueden observar puntos hemorrágicos. En cavidad torácica y abdominal suele contener en cantidad variable un líquido serosanguinolento con coágulos de fibrina, éste mismo líquido puede encontrarse en tejido subcutáneo. Los ganglios linfáticos y el bazo están aumentados de tamaño y con focos hemorrágicos. Otra lesión causada frecuentemente es la neumonía y también infiltrado seroso en el cordón umbilical (17, 22).

En los toros, provoca hemorragias y focos necróticos en las vesículas seminales; en los testículos se encuentran focos de pus o toda su masa se transforma en una masa de color amarillo-pálido. El escroto se presenta engrosado y endurecido, rasgo que puede detectarse en el animal vivo. Es frecuente también que se aprecien cojeras de pendientes de alteraciones articulares y musculares como son tendovaginitis, artritis o bursitis (3, 17, 22).

2.4.4 DIAGNOSTICO.

Clinicamente resulta difícil precisar el diagnóstico de la causa del aborto en un animal o en un grupo de animales por la gran variedad de las mismas que lo pueden provocar. Si bien, abortos tardíos o partos prematuros con re-

tención de placenta, pueden inducir a una sospecha de brucelosis, el certificado de dicho diagnóstico se basa en los resultados de los exámenes bacteriológicos y serológicos (3, 18).

Para efectuar el aislamiento bacteriológico se hacen cultivos de: exudado uterino producido inmediatamente antes del aborto, durante el mismo o una a dos semanas después de éste; fetos abortados, membranas fetales o bien de leche proveniente de ubres infectadas. El aislamiento e identificación de la B. abortus dan la prueba más fidedigna de brucelosis (10).

Es probable que la brucelosis sea la enfermedad que cuenta con más pruebas de diagnóstico que ninguna otra y las dificultades técnicas que presenta siguen creando la necesidad de mayor investigación para aumentar la eficiencia de las mismas. Entre los métodos con que se cuenta para el diagnóstico de la brucelosis tenemos los siguientes, separados de acuerdo con las muestras empleadas y el tipo de reacción (20).

I. Suero sanguíneo.

A. Cuantitativas.

1.- Aglutinación.

- a). Tubo lento o rápida en placa.
- b). Antiglobulina de Coombs.
- c). Hemoaglutinación.

2.- Fluorescencia indirecta.

3.- Prueba de ELISA (Enzima conjugada con inmunosorbentes) o prueba de ELA (Anticuerpo conjugado con la enzima).

B. Cualitativas y cuantitativas.

1.- Aglutinación.

- a). Inactivación por calor.
- b). Antígeno acidificado, tamponado, rosa de bengala, tarjeta.
- c). Mercaptoetanol.
- d). Rivanol.

2.- Fijación de complemento.

3.- Precipitación.

- a). Difusión en gel.
- b). Radioinmunoensayo.

4.- Hemoaglutinación indirecta (HI).

II. Sangre.**A. Estimulación de linfocitos.****B. Inhibición de la migración.****III. Leche o suero de leche.****A. Prueba de anillo por hato o individual.****B. Seroaglutinación, placa o tubo.****C. Antiglobulina de Coombs.****D. Fijación de complemento.****IV. Especial.****A. Determinación de anticuerpos.**

1.- Moco vaginal.

2.- Plasma seminal.

3.- Anticuerpos fluorescentes.

B. Determinaciones bacteriológicas.1.- Feto, tracto reproductor, glándula mamaria
tejidos placentarios, etc.

De todas estas pruebas, se ha visto que es superior la serología cualitativa a la determinación cuantitativa de -

anticuerpos.

2.4.5. PREVENCIÓN.

Entre las medidas preventivas actualmente utilizadas para el control de la brucelosis, la más común es el empleo de la vacuna viva atenuada de B. abortus cepa 19, ésta se aplica a becerras de entre 3 a 6 meses de edad, utilizando títulos de 60×10^9 a 80×10^9 gérmenes viables en dosis de 5 ml. la aplicación de esta vacuna ofrece varias ventajas, entre las más importantes se señala que: no se propaga de un animal a otro; los animales vacunados les confiere resistencia a la infección con cepas virulentas de B. abortus por lo menos durante siete años, por lo que no es necesaria la revacunación ya que este lapso es más o menos el tiempo de vida productiva de una vaca, esta medida de prevención no se recomienda en ganado adulto (19).

En los últimos años, se ha aceptado la vacunación de ganado adulto empleando la misma cepa 19, pero en concentración de 3×10^9 (dosis reducida) aplicada por vía subcutánea. Este procedimiento ha demostrado significativa protección, además de ser inocua para los animales gestantes (15, 19, 27).

2.4.6. TRATAMIENTO.

A pesar de ser las brucelas altamente susceptibles a la acción de sulfas y antibióticos in vitro, el uso de estos medicamentos en animales que sufren la infección natural no son muy alagadores. La razón principal por la cual existe gran diferencia entre los resultados in vivo e in vitro se deben fundamentalmente a la capacidad de las brucelas de sobrevivir en el interior de las células en donde la concentración de antibióticos suelen ser muy bajos (12) Tratando de vencer este obstáculo se ha empleado últimamente la oxitetraciclina micronizada (OTM) en animales infectados, mostrando una disminución en los títulos de anticuerpos post-tratamiento (27).

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

a).- Suero sanguíneo de 153 bovinos.

Las muestras sanguíneas fueron tomadas en 36 diferentes establos de la región, habiendo variado de tres a seis muestras por establo, considerando que en algunos de éstos había antecedentes de problemas reproductivos como son: - vacas repetidoras, abortos y retención de placentas. Del número total de muestras, 150 correspondieron a vacas en producción y 3 a toros que se utilizaban como sementales, teniendo como origen de la misma región y de los Estados de México y Querétaro (CUADRO 1).

CUADRO 1: Total de animales muestreados, su origen y sexo.

ORIGEN	S HEMBRAS	E X	O MACHOS	SUMA
Regional	89		3	92
Estados de Méx. y Qro.	61		0	61
Total	150		3	153

b).- Antígeno de B. abortus cepa 119-3, para la prueba

de placa de laboratorios PRONABIVE.

c).- Antígeno de B. abortus cepa 119-3, para la prueba de tarjeta del mismo laboratorio.

d).- Antígeno para la prueba de mercaptoetanol.

3.1.2. MATERIAL DE VIDRIERIA.

a). Tubos de vidrio.

b). Pipetas de Bang de 0.2 ml. (con graduación de 0.08 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml.).

c). Pipetas de 10 ml.

d). Placa de vidrio cuadrículada.

3.2. METODO DE RECOLECCION DE MUESTRAS Y PRUEBAS EFECTUADAS.

Se tomaron 153 muestras sanguíneas de bovino utilizando equipo vacutainer, de las cuales se procedió a obtener el suero, algunas mediante centrifugación a 5000 RPM durante 10 minutos y otras por reposo de las muestras. Una vez obtenidos los sueros, cada muestra es sometida a tres pruebas diferentes que fueron: a). Prueba rápida en placa, b). Prueba de tarjeta y c) Prueba de mercaptoetanol. Tomando como base la prueba de tarjeta, mientras que las otras se emplearon como complementarias y para reducir reacciones inespecíficas o posibles reacciones vacunales.

A continuación se describen las pruebas serológicas --
empleadas.

3.2.1. PRUEBA RAPIDA EN PLACA.

Para efectuar esta prueba se emplea el antígeno de placa, el cual está teñido con verde brillante y cristal violeta, con una concentración celular de 12%, mismo que al mezclar 0.03 ml. de este antígeno con 0.08, 0.04, 0.02, - 0.01 y 0.005 ml. del suero problema, se obtiene una concentración de 1:25, 1:100, 1:200 y 1:400 respectivamente (6).

Procedimiento de la prueba: antes de iniciar la prueba, se retira del refrigerador las muestras de suero y el antígeno, se dejan durante 30 a 60 minutos a temperatura - ambiente y se prepara la placa de vidrio cuadrículada.

Con la pipeta de Bang de 0.2 ml. se extrae el suero - problema manteniendo la pipeta con un ángulo de 45° y la - punta tocando la placa de aglutinación; se deposita en el centro del primer cuadro de la placa la cantidad de 0.08 - ml. de suero y se continúa depositando en los siguientes - cuadros las cantidades respectivas del suero problema hasta llegar a 0.01 ml.

Posteriormente, del frasco que contiene el antígeno de

placa, se homogeniza por agitación manual durante un minuto y se deposita 0.03 ml. del mismo sobre cada cantidad de suero en la placa. Con un removedor se agitan las mezclas de antígeno y suero en forma rotatoria, de esta manera se obtienen las diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 respectivamente.

Después de mezclar las diluciones, se mueve suavemente la placa en forma rotatoria durante 30 segundos; esta operación se repite a los cuatro y a los ocho minutos y se procede de inmediato a hacer la lectura e interpretación de los resultados con la ayuda de una caja aglutinoscópica.

Lectura e interpretación de la prueba.

REACCION COMPLETA: Es aquella en la cual al mezclarse el suero y el antígeno, la mayor parte de las células bacterianas son aglutinadas. El tamaño de los grumos puede ser muy variable, desde extremadamente finos, hasta los gruesos.

REACCION INTERMEDIA O INCOMPLETA: Incluye todos los grados intermedios de reacción, abarcando desde pequeñas cantidades de células bacterianas aglutinadas, hasta casi la totalidad de las mismas.

REACCION NEGATIVA: Se manifiesta con una mezcla homogénea de suero-antígeno, sin evidencia alguna de aglutinación.

CUADRO 2. Interpretación de la prueba de placa (1).

DILUCIONES				DIAGNOSTICO	
1:25	1:50	1:100	1:200	NO VACUNADOS	VACUNADOS
-	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
I	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
+	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
+	I	-	-	SOSPECHOSO	NEGATIVO
+	+	-	-	SOSPECHOSO	NEGATIVO
+	+	I	-	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
+	+	+	-	POSITIVO	SOSPECHOSO
+	+	+	I	POSITIVO	SOSPECHOSO
+	+	+	+	POSITIVO	POSITIVO

3.2.2. PRUEBA DE TARJETA.

En esta prueba, se utiliza un antígeno teñido con rosa de bengala cuya concentración celular es de 8% y tiene por característica ser más específico que el utilizado en la prueba de placa ya que no reacciona con ciertos tipos de -

aglutininas (4). Esta prueba no permite medir el título de anticuerpos, siendo así un método cualitativo no cuantitativo, obteniéndose algunas diferencias cuando se compara con la prueba de aglutinación en placa. Asimismo, es una prueba rápida y práctica lo que permite realizar el sangrado de los animales y efectuar la prueba de inmediato e identificar a los reactores positivos en un mínimo de tiempo (6). Es así como esta prueba parece poco sensible pero más específica que las demás. Por lo que se puede utilizar para separar los animales positivos de un hato (28).

Procedimiento de la prueba: Al igual que en la prueba de la placa, utilizando la pipeta de Bang, se deposita 0.03 ml. (de 0.04 a 0.01 en la pipeta de Bang) del suero problema sobre la placa de vidrio, posteriormente se agrega 0.03 ml. de antígeno para prueba de tarjeta y se hace la mezcla; se mueve suavemente la placa en forma rotatoria y se hace la lectura a los 4 minutos.

En esta prueba se considera positivo a cualquier grado de aglutinación.

3.2.3. PRUEBA DE MERCAPTOETANOL.

Con el fin de diferenciar niveles de anticuerpos vacunales de los adquiridos por procesos infecciosos activos -

se han desarrollado pruebas serológicas que incluyen reactivos con capacidad de destruir la actividad aglutinante y fijadora de complemento de las IgM resultantes de la vacunación. Entre estas pruebas está la de mercaptoetanol. Para efectuar esta prueba, se utiliza una solución al .01 molar de 2-mercaptoetanol.

Procedimiento de la prueba: Con la pipeta de Bang se deposita cuidadosamente 0.08 ml, 0.04 ml, 0.02 ml y 0.01 ml. en cada tubo, posteriormente se le agrega 1 ml de la solución preparada con mercaptoetanol y finalmente se agrega 1 ml de antígeno a cada uno de los cuatro tubos que corresponden a cada muestra y así se obtienen concentraciones de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 respectivamente. Teniendo estas mezclas se agitan suavemente y se incuban a 37°C durante 48 horas.

Lectura e interpretación de la prueba.

REACCION POSITIVA: Es aquella en que la mezcla de suero-antígeno esta clara y al realizar una suave agitación se observa grumos en suspensión que no se diluyen.

REACCION INCOMPLETA: Es aquella en que la mezcla de suero-antígeno está parcialmente clara y al realizar una suave agitación se observan grumos en suspensión que no se

diluyen.

REACCION NEGATIVA: Es aquella en que la mezcla de suero-antígeno es turbia y al realizar una suave agitación no revela grumos.

En esta prueba se consideran animales negativos aquellos que resultan con reacción negativa en 1:50, animales sospechosos aquellos que resultan con reacción incompleta o reacción completa en 1:50, 1:100 y con reacción incompleta en 1:200 y animales positivos aquellos que resultan con reacción completa en 1:200.

4.- RESULTADOS.

Al efectuar la prueba de placa se obtuvieron los resultados que se resumen en el cuadro siguiente:

CUADRO 3 Resultados de la prueba de placa aplicando el cuadro de interpretación de la misma, especificando el número de muestras y su reacción mostrada en cada una de las diluciones.

	D I L U C I O N E S				DIAGNOSTICO
	1:25	1:50	1:100	1:200	
NUMERO DE MUESTRAS Y SU REACCION	-(128) I(5) +(10)				NEGATIVOS
		I(1) +(4)	I(0)		SOSPECHOSOS
			+(4)	I(0) +(1)	POSITIVOS

Habiendo considerado a la prueba de placa como prueba inicial y de ahí partir para continuar con las dos siguientes pruebas, se tomaron las 25 muestras que tuvieron desde

una reacción incompleta en 1:25, hasta positiva en 1:200, para hacer la prueba de tarjeta, cuyos resultados se describen en el CUADRO 4.

CUADRO 4 Resultados de la prueba de tarjeta, tomando como base las 25 muestras que tuvieron desde una reacción incompleta en 1:25, hasta reacción positiva en 1:200 en la prueba de placa.

N° DE PROCESADAS	POSITIVAS	NEGATIVAS
25	5	20

A las muestras que se les hizo la prueba de tarjeta - también se procesaron con la prueba de mercaptoetanol, los resultados se presentan en el CUADRO 5.

CUADRO 5. Resultados de la prueba de mercaptoetanol y su interpretación.

	D I L U C I O N E S				DIAGNOSTICO
	1:25	1:50	1:100	1:200	
NUMERO DE MUESTRAS Y SU REACCION	-(11)				NEGATIVOS
	I(2)				
	+(3)				SOSPECHOSOS
		I(3)			
	+(0)	I(3)			
			+(1)	I(0)	POSITIVOS
				+(2)	

CUADRO 6 Resumen general de los resultados obtenidos en las 3 distintas pruebas serológicas efectuadas y su interpretación, considerando que para las pruebas de tarjeta y mercaptoetanol se tomaron como base las 25 muestras que tuvieron desde una reacción incompleta en 1:25 hasta reacción positiva en 1:200 en la prueba de placa.

PRUEBA EFECTUADA	POSITIVOS	SOSPECHOSOS	NEGATIVOS
PLACA	5	5	143
TARJETA	5		20
MERCAPTOETANOL	2	7	16

5. DISCUSION.

En este trabajo se identificó individualmente a cada uno de los animales muestreados siguiendo una numeración progresiva, considerando además su origen geográfico y sexo (CUADRO 1) y se anotó como observación para aquellos animales que habían tenido transtornos reproductivos, lo que finalmente permitió hacer una correlación entre los resultados de las pruebas serológicas con los antecedentes clínicos de los animales.

Los animales muestreados que tenían origen de la misma región, no habían sido vacunados y los provenientes de los Estados de México y Querétaro no se dispuso del dato de estar vacunados o no.

De las pruebas serológicas empleadas, la de tarjeta es la que se consideró como base para identificar a los animales reactores positivos, por ser una prueba de anticuerpos cualitativos y sumamente sensitiva para emplearse como procedimiento único en la identificación de los reactores (19). Las otras dos pruebas (placa y mercaptoetanol) se emplearon como complementarias.

Los resultados obtenidos variaron en cada una de las pruebas serológicas. La prueba de placa, registró un to-

tal de 5 positivos, 5 sospechosos y 143 negativos; la prueba de tarjeta con 5 positivos y los 148 restantes se consideraron negativos; la prueba de mercaptoetanol, con 2 positivos, 7 sospechosos y 144 negativos de un total de 153 muestras. Considerando a las 128 muestras que no reaccionaron a ningún título con la prueba de placa, como negativas para la prueba de tarjeta y mercaptoetanol (CUADRO 7). Estas variaciones en los resultados puede atribuirse a reacciones inespecíficas o bien a reacciones vacunales.

CUADRO 7 Resumen de resultados obtenidos en las 3 pruebas considerando 153 muestras en total.

PRUEBA SEROLOGICA	POSITIVOS	SOSPECHOSOS	NEGATIVOS
Placa	5	5	143
Tarjeta	5	-	148
Mercaptoetanol	2	7	144

De los 153 animales muestreados, 92 (60.14%) tienen su origen en la misma región, dos de ellos resultaron positivos; los 61 (39.86%) restantes procedían de los Estados de México y Querétaro, de los cuales resultaron 3 positivos (CUADRO 8). Sin embargo, con esta diferencia y por el nú-

mero de muestras procesadas no se puede atribuir que la incidencia de la enfermedad en la región se deba a la introducción de animales traídos de los Estados mencionados, considerados con alta incidencia de brucelosis (10).

CUADRO 8 Resumen general de reactores, tomando en cuenta su origen geográfico.

REACCION	ORIGEN REGIONAL	GEOGRAFICO MEX./QRO.	T O T A L
	92 (100%)	61 (100%)	153 (100%)
POSITIVOS	2 (2.17%)	3 (4.91%)	5 (3.26%)
NEGATIVOS	90 (97.83%)	58 (95.09%)	148 (96.74%)

Haciendo una correlación de resultados de las tres pruebas serológicas, finalmente se determinaron 5 animales reactores positivos cuyo número progresivo que ocuparon en el muestreo, origen geográfico y comportamiento en las diferentes pruebas es la siguiente (CUADRO 9).

N° DE MUESTRA	ORIGEN GEOGRAFICO	P. DE PLACA	P. DE TARJETA	P. DE MERCAPTOETANOL
1	REGIONAL	+ 1:50	+	1 1:50
72	MEX. O QRO.	+ 1:100	+	1 1:100
127	REGIONAL	+ 1:100	+	+ 1:100
142	MEX. O QRO.	+ 1:200	+	+ 1:200
145	MEX. O QRO.	+ 1:100	+	+ 1:200

De los 36 establos muestreados, 4 de ellos tuvieron reactores positivos; 3 con uno cada uno y solo uno con 2 reactores.

Con estos resultados al igual que en muchos otros trabajos se puede apreciar la dificultad que se encuentra para emprender algún programa de erradicación de la enfermedad, ya que la mayoría de las pruebas de diagnóstico convencionales no son confiables por sí solas (19, 23), lo que hace necesaria la aplicación de pruebas complementarias para detectar animales positivos y eliminarlos del hato si así se considera conveniente; pues en muchos casos esta medida no es muy adecuada por su alto costo y dificultad para conseguir animales de reposición (5).

Por tal motivo y con el propósito de emprender medidas de prevención y control de la enfermedad, sería de gran utilidad seguir impulsando el uso de la vacunación en becerras de entre 3 a 6 meses de edad con la vacuna de B. abortus cepa 19 (8), o bien aplicando la vacunación en ganado adulto con dosis reducida de la misma cepa, ya que su empleo es inocua para animales gestantes y ha demostrado protección significativa (15, 19, 22, 27). Esto sobre todo, porque en la mayoría de los establos de la región no se aplica ninguna medida preventiva para esta enfermedad por la dificultad para detectarla o por las diversas for-

mas de manifestarse.

Finalmente, debido a que no hay datos sobre estudios de incidencia de brucelosis específicos de la zona, cabe destacar que la incidencia obtenida con este trabajo es baja (3.26%), comparada con los datos mencionados por C. Escudero, cuya incidencia estatal y nacional es de 10.04% y 10.93% respectivamente (10), pudiendo atribuirse a que este resultado se restringe a esta región del Valle del Mezquital, cuyas condiciones climatológicas son semidesérticas.

6. CONCLUSIONES.

a). Se tomó a la prueba de tarjeta como prueba confiable para detectar a los reactores, obteniendo como resultado 5 positivos correspondiente al 3.26% del total de muestras.

b). En cuatro establos de los 36 muestreados se detectaron animales reactores positivos.

c). De los 5 reactores positivos, según su comportamiento en cada una de las pruebas se determinó que:

- 2 reaccionaron positivamente a las tres pruebas.

- 2 reaccionaron positivamente a la prueba de placa y tarjeta, mientras que con la prueba de mercaptoetanol fueron sospechosos.

- 1 reaccionó positivamente solo en la prueba de tarjeta y sospechoso en la de placa y mercaptoetanol.

d). De los 5 reactores positivos, 3 de ellos coincidieron con sus antecedentes clínicos ya que habían presentado abortos y/o retención placentaria; los otros dos no tenían este antecedente o bien no se habían observado cui-

dadosamente y no se proporcionó este dato.

e). De un total de 153 muestras procesadas, se incluían los sueros de 3 machos que se utilizaban como seminales, ninguno de estos resultó positivo a cualquiera de las pruebas, descartando la posibilidad de que actuaran como transmisores de la enfermedad.

f). Tomando en cuenta su origen geográfico, se observó que reaccionaron positivamente 2 animales de la misma región (2.17%) y 3 provenientes de los Estados de México o Querétaro (4.91%).

g). El porcentaje de reactores positivos fue mayor en los animales introducidos, comparado con los animales de la misma región. Sin embargo, por el número de muestras empleadas es probable que esta diferencia no sea muy representativa y confiable y se requiera de un estudio más amplio para determinar si la intruducción de animales a la región influye sobre el porcentaje de incidencia de la enfermedad.

7. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alton, G.G., Jones, L.M., and Pietz, D.E., Laboratory Techniques in Brucellosis, Second Edition, 1975 Who. - Genova.
- 2.- Bautista, O.P. - "Estudio Serológico y Aislamiento Bacteriológico de la Brucelosis en cerdos residentes en una granja de San Pedro, Atocpan, en el Distrito Federal". Tesis de Licenciatura, FES-C. UNAM, México, D.F. 1981.
- 3.- Blood, D.C., Henderson, J.A., Medicina Veterinaria, Tr. Fernando Colchero A., Editorial Interamericana, 3a. - Edición en Español, 1976, pp. 388-396.
- 4.- Centro Panamericano de Zoonosis.- Elaboración y Normalización de Antígenos para las Pruebas de Seroaglutinación de Brucelosis. Argentina, 1969, nota técnica # 3.
- 5.- Ciprian, C.A.- Repercusión Económica de la Brucelosis en México, Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis, pp. 76-83, INIP y ENEP-C, UNAM. México, diciembre 1978
- 6.- Cortés, N.A., Cabello, F.E.- Pruebas Serológicas de Rutina para el Diagnóstico de Brucelosis. Campaña Nacio-

- nal para el Control de la Brucelosis, D.G.S.A. S.A.G., Boletín Técnico # 1.
- 7.- Deyoe, B.L., Bovine Medicine and Surgery, Second Edition, 1980, Vol. I, American Veterinary Publications, Inc. pp. 285-297.
 - 8.- Dirección General de Sanidad Animal.- "BRUCELOSIS", Boletín de la Campaña Nacional contra la Brucelosis, México 1975.
 - 9.- Escárzaga, E.- Brucelosis: Algunos aspectos de la infección en humanos. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis, pp. 47-59, INIP y ENEP-C. UNAM, México, diciembre 1978.
 - 10.- Escudero, G.C., "Frecuencia y Distribución de la Brucelosis Bovina en la República Mexicana en el período 1973-1978". Tesis de Licenciatura, ENEP-C, UNAM. México, D. F. 1980.
 - 11.- Esperón, S.E., Paredes, A.G. - Informe de una encuesta serológica de Brucelosis en Médicos Veterinarios en el Estado de Querétaro, Méx. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, 1982, pp. 143-145.

- 12.- Flores, C.R., Características de la Brucelas, Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis, pp. 1-9, INIP y - ENEP-C, UNAM. México, diciembre 1978.
- 13.- Flores, C.R., Carmichael, L.E. Brucelosis: Causada por Brucella canis, Ciencia Veterinaria, Vol. 3, pp. 177--197, UNAM, México, 1981.
- 14.- Flores, C.R., Ciprian, C.A. - Diagnóstico de las enfermedades del cerdo, pp. 539-544, Editores, Ramiro Ramirez Necochea y Carlos Pijoan Aguadé. Primera Edición, México, 1982.
- 15.- Flores, C.R., del Río, V.J., Manzano, C.C., Fernández de la C.L. - Respuesta Serológica a la revacunación - con dosis reducida de B. abortus cepa 19, Reunión de - Investigación Pecuaria en México, 1982, FES-C, UNAM, - D.G.S.A. - SARH.
- 16.- Jensen, R., Donald, R.M. Enfermedades de los bovinos - en los corrales de engorda, pp. 103-110, Editorial - UTEHA, 1a. Edición, México 1973.
- 17.- Jubb, K.V.F. and Kennedy, P.C., Pathology of Domestic Animals, Edit. Academic Press, Second Edition, 1970, -

Vol. 1, New York, U.S.A.

- 18.- Merck Veterinary Manual, Published by Merck and Co., - Inc., Rahway, N.J., U.S.A., Fifth Edition, 1979, pp. - 366-369.
- 19.- Nicoletti, P. - Control de Brucelosis con Enfasis en - la vacunación de ganado adulto. Memorias del Foro Na - cional sobre Brucelosis, pp. 106-109, INIP y ENEP-C, - UNAM, México, diciembre 1978.
- 20.- Nicoletti, P. - Diagnóstico de Brucelosis, algunos pro - blemas y nuevos descubrimientos. Memorias del Foro Na - cional sobre Brucelosis, pp. 67-69, INIP y ENEP-C, - UNAM, México, diciembre 1978.
- 21.- Del Rfo, V.J.A. - Campaña contra la Brucelosis en Mé - xico., Antecedentes y Estrategias. Memorias del Foro - Nacional sobre Brucelosis, pp. 84-105, INIP y ENEP-C. UNAM. México 1978.
- 22.- Rodríguez, H.G.A. - Epizootiología de la Brucelosis. - Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis, pp. 10-13 INIP y ENEP-C, UNAM. México, diciembre 1978.
- 23.- Rodríguez de L.V., Flores, C.R., Mancera, M.A., Weimer

- sheimer, J. - Utilización del Antígeno POLI-B para -
diagnosticar Brucelosis en Bovinos en México. Memorias
de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, pp.
127-130, 1982.
- 24.- Ruiz, C.M., Brucelosis un Problema Universal, Editorial
La Prensa Médica Mexicana, 1a. Edición, 1954.
- 25.- Rennells, R.A., Monlux, W.S. and Monlux, A.W., Princi-
pios de Patología Veterinaria, Editorial C.E.C.S.A., -
1a. Edición en Español 1968, pp. 945-948.
- 26.- Smith, H.A., Jones, T.C. and Hunt, R.D., Veterinary -
Pathology, Edit. Lea and Febiger, Fuorth Edición, 1972
USA, Philadelphia, pp. 594-599.
- 27.- Tenorio, G.V., Torres, R.G., Stoppelli, B.A., Mancera
M.A., Flores, C.R. - Vacunación de un hato lechero y
la posible utilidad de la oxitetraciclina en animales
Brucelosos. Memorias de la Reunión de Investigación -
Pecuaria en México, 1982, pp. 119-123.
- 28.- Tizard, R.I. - Inmunología Veterinaria. Tr. Dr. Rober-
to Folch Fabre. 1a Edición al Español, 1979. Editorial
Interamericana.