

34
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

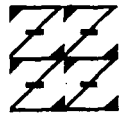
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

EVALUACION DE LA PRUEBA
DIAGNOSTICA DE BRUCELOSIS, DE
ANILLO EN LECHE DE CABRAS
VACUNADAS CON DOSIS REDUCIDA
DE VACUNA DE Brucella Melitensis REV 1,
A DOSIS REDUCIDA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
ELBA DOLORES NUÑEZ TORRES

DIRECTOR DE TESIS: Q. FRANCISCO VELAZQUEZ QUEZADA
ASESOR INTERNO: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

U. N. A. M.
FES.
ZARAGOZA



LO ANIMADO ES
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

TESIS CON 1994
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

G. FRANCISCO VELAZQUEZ QUEZADA. QUIEN ME AYUDO CON SU EXPERIENCIA EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO.

DR. EFREN DIAZ APARICIO. CUYO APOYO FUE MUY IMPORTANTE PARA CONCLUIR EL TRABAJO.

A LOS INTEGRANTES DEL PROYECTO ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS RUMIANTES

M.V.Z. JESUS VAZQUEZ
M. en C. ARTURO MANCERA
M. en C. LOURDES ONTIVEROS
M.V.Z. FRANCISCO AGUILAR
M. en C. FRANCISCO MORALES
M. en C. VICTOR TENDRIO
G.F.B. LAURA HERNANDEZ
G.F.B. LAURA JARAMILLO

POR SUS VALIOSAS APORTACIONES
M.C. AMPARO MARTINEZ
M.V.Z. LUIS LECUDNA

DE LA DIRECCION GENERAL DE MEDICINA PREVENTIVA DE LA SECRETARIA DE SALUD CUYAS OPINIONES TAN VALIOSAS SE INTEGRARON AL TRABAJO.

INDICE.

	Página
Introducción	
Historia	3
Situación de la brucelosis en México	4
Etiología	6
Transmisión y Patogenia	7
Respuesta Inmune	8
Diagnóstico	12
Prevención y Control	14
Justificación	17
Hipótesis	17
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	18
Material y Metodos	19
Diseño Experimental	20
Prueba Serológica de Tarjeta	20
Prueba de Anillo en Leche	21
Análisis Estadístico	22
Resultados	23
Discusión	30
Conclusiones	35
Bibliografía	36

DEDICATORIA

A MIS PADRES

DON LINDO
DOÑA MARTHA

A LINA Y CESAR

A MI ASESOR INTERNO DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO.

A MIS MAESTROS Y AMIGOS.

CON CARINO A LA F.E.S. ZARAGOZA.

RESUMEN .

Los métodos que actualmente se usan para detectar una infección por Brucella sp. Se basan en encontrar anticuerpos circulantes en suero sanguíneo, sin embargo estas técnicas son en su mayoría tardadas y costosas lo que limita su uso en campañas de erradicación de esta enfermedad, por lo que en bovinos se ha utilizado la prueba de anillo en leche reduciendo costos y principalmente tiempo. Se considera importante implementar la esta prueba para el ganado caprino, pero al utilizarse la técnica diseñada originalmente para leche de vaca, se presentan dificultades en su lectura e interpretación.

Por lo anterior, en este trabajo se tuvo como objetivo estandarizar y evaluar la prueba de anillo en leche, y además determinar la especificidad dela misma, en cabras vacunadas con dosis reducida. Para lograrlo, se modificó la técnica empleada en vacas, en relación al tiempo de incubación, se adicionó cloruro de sodio y distintas grasas, encontrandose que de las grasas ensayadas, el aceite de maíz da resultados similares a los que se obtienen con leche de vaca. Se evaluó la prueba en cabras vacunadas con Rev 1, comparándose con la prueba de tarjeta (que es una prueba oficial dentro de la campaña de control); y se encontraron diferencias significativas entre ambas pruebas en todos los muestreos. Por otra parte, el grupo testigo negativo durante todos los muestreos dio parcialmente reacción positiva, especialmente después de la vacunación de las otras cabras, cuando los anticuerpos comenzaban a declinar; se sospechó de la posible

eliminación de la cepa vacunal en la leche.

En este trabajo, la prueba de anillo en leche individual en cabras logró adaptarse satisfactoriamente, y mostró una especificidad en cabras vacunadas con dosis reducida de Rev 1 del 77% a los 126 días posvacunación, cabe destacar que la prueba se utilizó de manera individual para controlar las variables de la prueba y determinar su especificidad.

I N T R O D U C C I O N .

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta al ganado bovino, ovino, caprino y otras especies de animales domésticos, además del hombre (OIE, 1987); debido a esta última característica se le clasifica dentro del grupo de las zoonosis (OMS/FAO, 1982).

Historia.

A la brucelosis se le ha llamado fiebre ondulante del Mediterráneo. En 1886 Bruce aisló por primera vez al microorganismo causal y lo nombró Microoccus mellitensis. Bang en 1897, describe el agente que produce el aborto en el ganado de Dinamarca. Evans en 1918 demostró la similitud entre la bacteria de Bang y M. mellitensis. El tercer agente de Brucelosis fue aislado por Traum (1914); Huddleson (1929) llamó al organismo Brucella suis. Buddle en 1956 reportó Brucella ovis y en 1957 Lackman aisló Brucella neotomae de una rata del desierto; Carmichael y Bruner (1968) fueron los primeros en reconocer infecciones en perros causadas por Brucella canis (Moyer y Hausler, 1991; y Alton, 1981).

La brucelosis es un problema que afecta mundialmente a diferentes especies de animales (Díaz y Mancera, 1990) y también al hombre. En México no se tiene conocimiento preciso sobre cuando entró esta enfermedad, pero algunos autores creen que llegó en las primeras importaciones de animales de España o de los Estados

Unidos (García, 1987). Se tienen antecedentes de que el primer diagnóstico de brucelosis humana fue en 1905. En 1923 se aisló la primera cepa de Brucella melitensis. Para 1945 se tenía registro de 1432 casos de brucelosis humana de 21 de las 32 entidades federativas que informan.

Debido al impacto que tiene la enfermedad sobre la población humana en México la primera encuesta serológica de trascendencia que se llevó a cabo para determinar la prevalencia de la brucelosis bovina en México, fue en 1952. Posteriormente se realizaron otros estudios mediante los cuales se apreció la importancia de la enfermedad, y en 1970 se implementó un programa permanente que en 1981 se oficializó, estableciéndose la campaña nacional contra la brucelosis (Gurría, 1993).

Situación de la Brucelosis Caprina en México.

La investigación sobre la brucelosis caprina ha sido dejada a un lado por los países desarrollados, y en su mayoría ha sido generada por países subdesarrollados como el nuestro. Esto es debido principalmente a que los ovinos y bovinos son especies de mayor importancia económica en los países desarrollados, sin embargo la economía de muchas zonas áridas o semi-áridas depende en gran parte de la explotación de caprina, en México en las zonas desérticas tienen gran importancia social y económica, siendo el principal sosten económico de los productores rurales ya que la agricultura está en un nivel secundario y la cría de otras especies animales es difícil.

El número de cabras en nuestro país no se conoce con

exactitud, en 1989 se estimaba en 11 millones (Casillas y Garza, 1990), en 1994 se manejan cifras de entre 9 y 10 millones de cabezas (Gurría, 1994).

La brucelosis caprina es endémica en México, manejándose prevalencia entre 1.6 y 7.6% , datos poco confiables (Casillas y Garza, 1990).

Un problema serio conciste en la poca atención que se ha prestado a las cabras, como lo de muestra la cobertura diagnóstica y de vacunación para brucelosis que de 1982 a 1992 no ha rebasado nunca el 1% del censo caprino (Casillas y Garza, 1990; Gurría, 1993).

En 1993 parece ser más halagüeño, ya que aumento a un 3% la cobertura diagnóstica y de vacunación (Gurría, 1994). Es de esperarse que con la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis Animal que arrancará en 1994, se tomen medidas pertinentes para el control de la brucelosis caprina. En 1992 de 38,743 cabras 2,018 (5.2%) fueron probadas como positivas.

En una encuesta serológica realizada en humanos en 1992, se detectaron 697,200 casos seroprevalentes en el país, mientras que en alimentos se identificaron 325,039, según una encuesta realizada por el departamento de prevención y control de brucelosis en los servicios estatales de salud para 1992 (Secretaría de Salud, 1992). Estos datos indican la prevalencia de la enfermedad, y su diseminación por los alimentos. Teniendo en cuenta que dentro de este programa muchos estados de la República no informan sobre la enfermedad o no la cuantifican, estas cifras, sólo son

aproximaciones a la realidad, en 1992 la morbilidad fue de 5,958 casos (Secretaría de Salud, 1993).

La presencia de la enfermedad en el país, en términos generales, produce un doble efecto:

Desde el punto de vista económico productivo, resulta una limitante muy seria que ha impedido el pleno desarrollo de la ganadería, afectada por el mal, como ejemplo: las pérdidas estimadas para 1990 en un hato lechero constituido por 195 vientres ubicado en el estado de Hidalgo se calcularon en N\$22,210.57 (Valdespino y Batalla, 1991).

Por lo que respecta a la salud pública, de acuerdo con resultados parciales reportados por la Secretaría de Salud, la tasa de morbilidad promedio es del 4.3 a nivel Nacional; sin embargo, analizado a nivel estatal, se ubica en el rango de 23.9 a 0.03 (Secretaría de Salud, 1992 y Arteaga, 1993).

Por grupos de edad, el 25% corresponde a individuos de 15 a 44 años, población económicamente activa y que representa una pérdida en el ingreso familiar y nacional (Secretaría de Salud, 1993).

Etiología.

Morfológicamente los organismos del género Brucella son coccobacilos, con 0.5 a 0.7 μm de anchura y 0.6 a 1.6 μm de longitud. Por lo general aparecen aislados o en pares, pero a veces se ven cadenas cortas o grupos, son Gram negativos sin coloración bipolar no tienen cápsula verdadera, no producen esporas ni flagelos por lo que son inmóviles.

Los requerimientos nutricionales de las brucelas son complejos, sobre todo en aislamiento primario. Bruceella no se desarrolla en medios de cultivo que contengan solamente peptonas; se requiere triptosa o tripteína y algunas veces suplementos tales como infusión de hígado, suero de bovino o hidrolizado de levadura. El microorganismo no produce hemólisis ni pigmento cuando se desarrolla en medios que contienen sangre. Aún en estos medios enriquecidos, los organismos se desarrollan lentamente, y los cultivos deben mantenerse por lo menos durante tres semanas antes de ser descartados como negativos. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero puede desarrollarse entre los 20-40°C. Estas bacterias no producen gas, ni ácido a partir de los hidratos de carbono en medios que contienen peptona. Las características diferenciales importantes del género Bruceella son: desarrollo estrictamente aeróbico, catalasa y citocromo oxidasa positivo; reducción de nitratos a nitritos y producción de ureasa (por lo menos débil en todas las especies, y fuerte en B. suis) (Koneman, 1984 y Moyer, 1992).

Transmisión y Patogenia.

Los animales infectados liberan al microorganismo en leche, orina, semen y especialmente en secreciones vaginales (Alton et al., 1988; García 1987). Esto último es importante como mecanismo de diseminación de la bacteria, particularmente después de que ha ocurrido el aborto, ya que se tiene conocimiento de que cuando ocurre éste, el feto y sus membranas contienen alrededor de 10¹¹ bacterias y los fluidos aproximadamente 10¹¹; en los partos a

término de animales infetados, el contenido uterino también presenta una gran cantidad de brucelas (Alton, 1981).

La vía de entrada más importante en la cabra es la oral a través de la ingestión del agente etiológico, aunque existen publicaciones que señalan la infección por vía conjuntival y nasal, mediante aerosoles. Las bacterias pueden traspasar la mucosa oral y una vez dentro del organismo, las brucelas son ingeridas por fagocitos. Debido a la capacidad de estas bacterias de multiplicarse en el interior de los fagocitos, causan la destrucción de los mismos y logran llegar a los ganglios linfáticos; ahí se produce una respuesta inmunológica caracterizada por la formación de granulomas. Cuando la infección logra superar este mecanismo de defensa, entonces la bacteria invade al sistema linfático y por medio del conducto torácico llega a la sangre; la bacteremia propicia la localización posterior de la bacteria en sitios de su predilección como son bazo, hígado, médula osea, ganglios linfáticos, glándula mamaria y especialmente en el útero grávido y tejidos fetales; por lo que las hembras infectadas pueden transmitir la infección a sus crías in útero, o bien mediante la leche durante la lactancia. En los machos las bacterias tienen afinidad por los tejidos de órganos genitales; la localización posterior de la bacteria en ciertos tejidos parece ser influenciada por el eritritol (Flores, 1990).

Respuesta Inmune.

La respuesta individual a una infección es variada y con frecuencia muy compleja. En una población este hecho se ve

reflejado en los diferentes grados de resistencia y susceptibilidad mostrados por cada uno de sus miembros. La resistencia natural o no específica a una enfermedad infecciosa está bajo control genético y diversos estudios han demostrado que la herencia de esta resistencia es poligénica en la mayoría de los casos. Un elemento primario fundamental en la resistencia no específica es la integridad de la piel y las mucosas. Siendo las mucosas el primer sitio de interacción entre *Brucella* y el huésped, se desconoce cómo se efectúa este evento, es aún poco lo que se conoce sobre la estructura y el papel biológico de la molécula receptora sobre las células epiteliales (López *et al.*, 1991).

Una vez en la sangre, las brucelas se encuentran con una batería bioquímica entre las que destacan la lisozima y las sustancias oxidantes (peróxidos, ion superóxido y sistema mieloperoxidasa). En bovinos existe un azúcar, llamado eritritol, sobre las células epiteliales del útero y otros órganos del aparato reproductor, tanto de machos como de hembras maduras, que forma parte de una molécula con aparente actividad de receptor para *Brucella*, que estimula el crecimiento de *B. abortus* y es en parte responsable de que la infección por dicha bacteria se establezca en el aparato reproductor, y de que las becerras antes de la pubertad rechacen la infección y queden inmunes (Pijoan y Montaraz, 1978).

La respuesta inmune tiene tres etapas secuenciales principalmente: producción de inmunoglobulinas M (IgM), seguido de inmunoglobulinas G (IgG) e inmunoglobulinas A (IgA), que ocurren después de la estimulación antigénica inicial. Cuando la infección

comienza, la presencia de IgM se determina con pruebas serológicas de aglutinación, precipitación y de fijación del complemento. La presencia de IgG indica convalecencia, infección crónica o exposición continua; ésta también se demuestra con las pruebas serológicas antes mencionadas (Moyer y Hausler, 1991).

Aparentemente, después de la vacunación aparecen títulos tanto de IgG, IgM e IgA. Sin embargo, los niveles de IgG son de bajo nivel y desaparecen con rapidez, contrario a lo que sucede normalmente, donde es la IgM la que desaparece. Además esto sucede con animales adultos, pues las becerras no púberes desarrollan títulos que en ambas globulinas son transitorios y desaparecen. Independientemente de lo ocurrido con las inmunoglobulinas en los animales inmunizados, hay que tener presente que la vacunación genera linfocitos B y T de la memoria, los que en segundo contacto con la brucela desarrollan, en un lapso de 3 a 5 días, una respuesta secundaria. Este hecho representa una gran ventaja al evitar la transmisión de la enfermedad a los humanos.

Aún así, el efecto de los anticuerpos es poco claro, pero son elementos importantes en la defensa del organismo, sin embargo se debe resaltar que en las bacterias, su acción es de apoyo a otros sistemas tales como el complemento o la fagocitosis, porque por sí solos no causan daño alguno a la bacteria. Los anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA intervienen en esta función, pero cada uno de manera distinta. La IgG actúa fundamentalmente estimulando a la fracción C1 que es la que inicia la fijación del complemento, el cual perfora la membrana citoplasmática de las bacterias; además

este anticuerpo puede prevenir la citoadherencia de la bacteria al unirse al receptor de ésta. La adherencia es muy importante para la patogenicidad de la bacteria.

Debido a su alta valencia, la IgM tiene una poderosa actividad aglutinante que favorece la fagocitosis. La IgM es más eficiente que la IgG tanto en los procesos de bacteriolisis mediada por complemento como de inmovilización. Su localización exclusivamente sérica la hace especialmente valiosa en casos de bacteremia.

La inmunoglobulina IgA posee una actividad antibacteriana que previene la adhesión de bacterias a epitelios "externos", tales como traqueobronquial, intestinal, genitourinario, etc. En los casos en que esta adhesión es indispensable, la acción de la IgA es suficiente para prevenir la enfermedad. Sin embargo, su incapacidad de fijar complemento o adherirse a macrófagos la hacen poco eficiente contra bacterias.

La inmunidad celular juega un papel fundamental en la protección, especialmente contra bacterias facultativas intracelulares. Los mecanismos exactos no son bien conocidos, pero por lo menos dos han sido descritos.

1.-Secreción de linfocinas por el linfocito T. Cuando el linfocito T se adhiere específicamente a su antígeno, secreta una serie de sustancias solubles que ayudan a las defensas del animal. Estas linfocinas incluyen una inhibidora de la migración de macrófagos (MIF), una quimiotáctina para monocitos y otra para neutrófilos; una estimuladora de la diapedesis y que aumenta la permeabilidad capilar; una que obliga a los linfocitos a dividirse,

un factor de agregación de plaquetas, interferón y una serie de linfocinas que inhiben la producción de células blanco. Es evidente que la acción conjunta de todas estas sustancias da como resultado un incremento en la fagocitosis, destrucción de células deformadas e inhibición viral.

2.-Actividad de macrófagos. Cuando el linfocito T se une con el antígeno se produce el factor activador de los macrófagos cercanos provocando una mayor movilidad del citoplasma y los gránulos mejor definidos. Esta célula es capaz de fagocitar más rápidamente. Aunque la activación es inmune, la acción intensificada del macrófago es inespecífica y actúa sobre cualquier bacteria, haciéndolo mucho más efectivo (Morilla, 1989).

Diagnóstico.

Existen varios métodos para el diagnóstico de Brucella melitensis, los métodos convencionales se basan en detectar en suero sanguíneo anticuerpos contra este microorganismo, aunque el método confirmatorio es el aislamiento de la bacteria de los animales que padecen la infección (Flores, 1990).

Las pruebas serológicas detectan la presencia de los anticuerpos IgM. Los anticuerpos IgM aglutinan más intensamente que los IgG ya que, al ser las moléculas más voluminosas, poseen un mayor número de sitios de reacción, por lo que se supone que pueden alcanzar más fácilmente que las IgG los determinantes antigénicos ubicados sobre moléculas adyacentes. Algunas de las pruebas utilizadas en el diagnóstico serológico son: La prueba de

aglutinación rápida en placa (Huddleson y Abel), la prueba de aglutinación en tubo (Wright), la prueba de fijación del complemento (FC), la prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol (2-ME), la prueba de precipitación con rivanol y la prueba de la tarjeta o "Card Test", entre otras. Las pruebas que se ocupan para leche son: Prueba del anillo en leche (PAL) colectiva a partir de tanque o bote de leche, prueba del anillo en leche de animales individuales, prueba del anillo en crema, detectan anticuerpos IgA, IgM e IgG (Casas, 1978).

En el ganado bovino la prueba de anillo en leche es el método más práctico y económico para detectar hatos lecheros infectados y para la vigilancia epizootológica de los que están exentos de la enfermedad. Se efectúa tres o cuatro veces por año en cada hato con una combinación de muestras de leche y permite detectar la mayoría de los infectados. Se dispone ahora de modificaciones del procedimiento original que aumenta la sensibilidad de las pruebas para emplearlas en hatos grandes. También se puede usar para detectar la infección en hatos nómadas o seminómadas, lo que la hace especialmente valiosa para el diagnóstico de la enfermedad en cabras, dadas las condiciones generales de explotación que se dan en el país. Cuando se obtienen resultados positivos con la prueba del anillo en la leche, se examina el rebaño mediante pruebas serológicas o con la leche de cada animal para identificar los animales infectados. Se pueden preparar diluciones en serie de la leche de cada animal en leches exentas de Brucella para determinar la titulación final de la reacción del anillo en leche (Alton,

1981; FAO/OMS 1986). Sin embargo disponer de una prueba que detecte la presencia de los anticuerpos en leche ya sea individualmente o en rebaño, ha significado una serie de dificultades en cabras, debido a que la PAL en cabras no funciona tan bien como en las vacas, ya que el anillo que se presenta en positivos a PAL en cabras no está en la superficie, sino que se va al fondo del tubo, además la PAL no está lo suficientemente evaluada en cabras. Por tal motivo, es de importancia estandarizar y evaluar la prueba de anillo en leche ya que puede ser de utilidad para detectar con más facilidad rebaños lecheros infectados y así poder implementar medidas de control.

El diagnóstico epizootiológico, se basa en la observación de la evolución de la enfermedad, en algunos lugares endémica o no, (Frappe, 1981).

Clinicamente, se caracteriza por abortos múltiples en el último tercio de la gestación, casos esporádicos de orquitis, metritis e infertilidad, trastornos locomotores, retención placentaria y endometritis. El método más seguro para el diagnóstico de la enfermedad, es el aislamiento del agente etiológico. Esto puede lograrse a partir del exudado vaginal o leche de las hembras que estén infectadas. Se recomienda también el cultivo a partir de las placentas y tejidos fetales, especialmente de contenido estomacal (Flores, 1990)

Prevención y Control.

La brucelosis es una enfermedad difícil de controlar y

erradicar, lo que ha hecho que se recurra a procedimientos de carácter preventivo, siendo la vacunación el método más recomendable; existen numerosas investigaciones sobre la vacuna Rev 1, que es de baja virulencia en las cabras, altamente antigénica, estable y no revierte a patógena por pases continuos, teniendo en cuenta que se trata de una cepa viva atenuada y por tanto supone la penetración y multiplicación de dicha cepa en los animales (Flores, 1986).

En México, la vacunación en caprinos se realiza por vía subcutánea en hembras de 3-4 meses de edad, y la inmunidad dura al menos 4 a 5 años; sin embargo, existen determinados aspectos en su aplicación que todavía son motivo de controversia entre los investigadores. En opinión de los expertos de FAO/OMS (1986) son notables las discrepancias en las respuestas serológicas posteriores a la vacunación de caprinos, ya que dicha respuesta oscila, según diversos autores, entre 4 y 20 meses, si bien este hecho puede obedecer a diferencias entre razas de animales vacunados, al tipo de prueba serológica utilizada para su control o la interpretación de sus resultados. La dosis normal no se aplica en adultos gestantes, pues llega a causar aborto y la bacteria puede persistir en ganglios linfáticos y glándula mamaria (Flores, 1990).

La dosis normal no debe aplicarse en animales adultos pues puede producir aborto, eliminación en leche y persistencia de los títulos posvacunales por largo tiempo. Una alternativa es el uso de la dosis reducida en adultos ya que los anticuerpos alcanzan

títulos más bajos y desaparecen más rápidamente que en los vacunados con dosis normal (Elberg, 1981). En un trabajo realizado en el Centro Panamericano de Zoonosis, los títulos aglutinantes desaparecieron 7 meses después de la vacunación, mientras las pruebas de fijación de complemento y 2-mercaptoetanol se volvieron negativas entre los 2 y 3 meses (Mancera, 1990).

El comportamiento de los anticuerpos posvacunales en cabras adultas vacunadas con dosis reducida, no es conocido, por lo que no sabemos el porcentaje de falsos positivos, que se presentan con la PAL a los diferentes días posvacunación, ni a que tiempo desaparecen dichos reactores y por lo tanto cuando podemos realizar la PAL con la confianza de no dar como positivos animales que están vacunados.

JUSTIFICACION.

Al no contar con una prueba diagnostica para brucelosis caprina que sea útil en el diagnostico preliminar a nivel rebaño es necesario estandarizar la prueba de anillo en leche que cubre estas necesidades en los bovino, para que pueda ser utilizada en caprinos.

H I P O T E S I S .

1. Al utilizarse distintas modificaciones a la técnica original de anillo en leche para vacas, la prueba funcionará satisfactoriamente en el diagnóstico de la brucelosis caprina.

2. Al vacunar cabras adultas con dosis reducida la especificidad de la prueba de anillo en leche será alta.

OBJETIVO GENERAL .

Estandarizar y evaluar la prueba de anillo en leche utilizando para ello, leches procedentes de cabras infectadas naturalmente, cabras negativa a brucelosis y de cabras vacunadas experimentalmente con la cepa Rev 1 de Brucella melitensis.

OBJETIVOS PARTICULARES .

A) Analizar el efecto que tienen sobre la prueba de anillo en leche la adición de diferentes grasas de origen animal y vegetal.

B) Evaluar la prueba de anillo en leche utilizando cabras vacunadas con Rev 1, leches inoculadas con sueros hiperinmunes contra Brucella melitensis, y leches de cabras positivas y negativas a brucelosis.

MATERIAL Y METODOS .

- Animales de experimentación.

Se utilizaron 10 caprinos hembras de raza Granadina con signos clínicos de brucelosis y positivos a las pruebas serológicas de tarjeta y fijación de complemento (FC) y 57 caprinos hembras de la raza Nubia entre el primer y tercer parto, no vacunados contra brucelosis y negativos en las pruebas serológicas de tarjeta (T) y fijación de complemento (FC). Las cuales se agruparon como: grupo control negativo y grupo problema, las cuales, fueron vacunadas con la cepa Rev 1 de B. melitensis y posteriormente muestreadas cada tres semanas para realizar la prueba serológica de tarjeta y la prueba de anillo en leche.

- Vacunas.

Se emplearon vacunas vivas de la cepa Rev. 1, B. melitensis a dosis reducida (1×10^4 UFC -Unidades Formadoras de Colonias-/ml) de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE-México).

- Antígenos.

Para realizar las pruebas serológicas, se utilizaron los antígenos comerciales de tarjeta y anillo en leche elaborados por PRONABIVE-México.

- Diseño experimental.

Las cabras fueron distribuidas de la siguiente manera:

I) 15 cabras sin vacunar procedentes de un rebaño libre de brucelosis (control negativo).

II) 10 cabras positivas a las pruebas serológicas de tarjeta y fijación de complemento, procedentes de un rebaño con brucelosis (control positivo).

III) Se vacunaron 42 cabras por vía subcutánea con vacuna PRONABIVE de Brucella melitensis Rev 1, procedentes de un rebaño libre de brucelosis y negativas a las pruebas serológicas de tarjeta y de fijación de complemento

Los animales estuvieron conviviendo constantemente durante el trabajo ya que se mantuvieron en condiciones de pastoreo como se tenían antes de la vacunación, excluyendo las cabras del grupo control positivo.

- Prueba Serológica de Tarjeta.

El muestreo serológico se realizó de la siguiente manera:

-Se ocuparon tubos y agujas vacutainer para la toma de muestras, una vez formado el coágulo se eliminó por centrifugación, dejando unicamente el suero; éste se mantuvo en congelación hasta el día que se realizó la prueba, siendo un tiempo máximo 72 horas.

La prueba de tarjeta (Rosa de Bengala) se realizó de la siguiente manera:

-Se ocupó una placa de vidrio perfectamente limpia y seca.

-Se empleó el antígeno Rosa de Bengala de B. abortus cepa

1119-3 en una concentración de 8% amortiguada a un pH de 3.55 ± 0.05 de tipo comercial el cual se manipuló teniendo precaución de que la temperatura fuera la del ambiente, conservándose en refrigeración mientras no se utilizó.

-Para realizar la prueba se dejaron a temperatura ambiente tanto suero como antígeno. Se colocó en la placa de vidrio 0.030 ml de suero al que se le agregó una cantidad igual de antígeno, inmediatamente después, se mezclaron con un agitador múltiple, tomando la placa se agitó en círculo 6 veces, seguido por otras 6 veces en sentido opuesto. La mezcla de suero antígeno se agitó por 4 min., y una vez transcurrido este tiempo, se leyeron las reacciones en un trasiluminador. Los resultados se interpretaron como positivos o negativos, según la presencia o ausencia de aglutinación (Alton, 1988)

- Prueba de Anillo en Leche.

En la prueba de anillo en leche, los anticuerpos fueron detectados por adición a la leche, del antígeno brucelar teñido con hematoxilina (azul). Estas aglutininas, son las responsables de que se agrupen y asciendan a la superficie.

-El muestreo se realizó en tubo de 13 X 100 mm o en botellas pequeñas con solución de formalina al 0.75% (0.5 ml/10ml de leche), la muestra se conservó en refrigeración sólo de 48-72 horas antes del examen.

-Para realizar la prueba, se mantuvieron a temperatura ambiente, se agitaron perfectamente y se transfirió 1ml a un tubo de

ensaye (13 X 100 ml), a los que se les adicionó 0.3 ml de solución de NaCl al 25%; de manera separada pero durante el mismo tiempo (15 min) se mantuvieron a temperatura ambiente el antígeno y las grasas a probar; transcurrido el tiempo se adicionaron 0.03 ml de cualquiera de las diferentes grasas a probar (vaselina, glicerol, aceite de maíz, mezcla de vaselinas y crema de vaca), además de 0.03 ml del antígeno; se mezcló, verificando que la muestra fuera lo más homogénea posible, y se incubó durante 2 horas en una estufa bacteriológica a 37°C.

- La lectura se hizo una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron negativas en los casos en que la mezcla permaneció homogénea. Cuando la grasa quedaba flotando en forma de anillo, en la superficie de la columna de la leche y se coloreó más que el resto de la leche, se consideró positiva (Alton, 1988).

- Análisis Estadístico.

Tanto los resultados obtenidos en la prueba de anillo en leche como los obtenidos en la pruebas serológica de tarjeta fueron analizados por medio de la prueba de χ^2 -cuadrada, con fórmula corregida de Yates (Reyes, 1983).

R E S U L T A D O S .

1.-PRUEBA DE ANILLO EN LECHE.

1.1.-Modificaciones para su uso en cabras.

Al utilizar las modificaciones ya descritas en la metodología, se obtuvieron los siguientes resultados:

La adición de NaCl funcionó de manera satisfactoria durante la prueba ya que se comprobó que su uso facilitaba la formación del anillo.

El aumento al tiempo de incubación, permitió obtener un mayor ascenso del complejo antígeno-anticuerpo a través de la columna de leche y se apreció que dicho ascenso se observaba a las 2 horas de incubación.

La funcionalidad de la grasa, se valoró según el color, la forma y el tiempo que se mantuviera el anillo en la superficie de la columna durante la lectura además de la claridad de ésta. En estos términos se elaboró la siguiente lista en orden decreciente de efectividad.

- Crema de leche de vaca (negativa a brucelosis)
- Aceite de maíz
- Vaselina
- Glicerol
- Mezcla de vaselinas

Sin embargo, para la realización de la prueba de anillo en leche nos decidimos por usar el aceite de maíz, debido a que se tiene la certeza de que se encuentra libre de Brucella o posibles reactores, como podría ser en el caso de la crema de leche.

Todas las modificaciones mencionadas, se ensayaron en leches de cabras negativas, con la adición de sueros hiperinmunes para su evaluación ya que así se tuvo la certeza de la presencia de anticuerpos, hasta que se logró que la prueba tuviera una lectura fácil y clara.

1.2.-Valoración con cabras vacunadas y cabras control negativo.

En la prueba diagnóstica de anillo en leche de cabras vacunadas con dosis reducida se presentaron constantemente animales positivos, por lo que al graficar se obtuvo una gráfica campana, alcanzando la mayor cantidad de positivos a los 42 días posvacunales (cuadro 1, gráfica 1), por lo que cuando se realizó la comparación estadística se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) por ejemplo: entre el muestreo realizado a los 21 días comparado con el realizado a los 42 días, sin embargo el muestreo realizado a los 21 días comparado con el último muestreo (126 días), la diferencia estadística no es significativa (cuadro 4).

Los resultados de la prueba de anillo en leche para los testigos negativos (Cuadro 3, gráfica 2), presentaron un comportamiento similar al del grupo vacunado, pero diferente al esperado, es decir que durante todos los muestreos se registraron animales positivos, comenzando por el primer muestreo posvacunal del otro grupo, donde el número de positivos fue mayor para el grupo testigo que para el grupo problema, que posteriormente declinó, describiendo al momento de graficar a partir del día 42

una gráfica en forma campana, pero en menor proporción que en el grupo vacunado, por lo que al realizar la prueba estadística existieron menos diferencias ($P < 0.01$) que en el grupo anterior (cuadro 4).

2.-Prueba de tarjeta.

2.1.-Resultado en cabras vacunadas y cabras control negativo.

Al realizar la prueba de tarjeta a los sueros de las cabras vacunadas se encontraron animales positivos únicamente a los 42 días posteriores a la vacunación, dando como resultado un 2%, esto se demuestra en el cuadro 2 y en la gráfica 1. Para los testigos negativos no se registraron animales positivos en ninguno de los muestreos realizados posteriormente a la vacunación.

Al realizar la comparación entre pruebas diagnósticas para el grupo testigo negativo, mostró diferencias significativas en todos los casos ya que en la Prueba de Tarjeta no se registraron positivos en ninguno de los muestreos, mientras que en la PAL siempre existieron positivos. En el caso del grupo vacunado existieron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre pruebas, ya que en la prueba de tarjeta el máximo y único valor que se obtuvo de positivos fue de 2% que correspondió también al valor máximo de positivos para la PAL, sólo que para esta última el valor correspondiente fue de 66%, por lo que al realizar la prueba estadística se encontró con diferencias significativas (Cuadro 4).

CUADRO 1.

Resultados de la prueba de Anillo en Leche para las cabras vacunadas con dosis reducida (1X10⁷UFC).

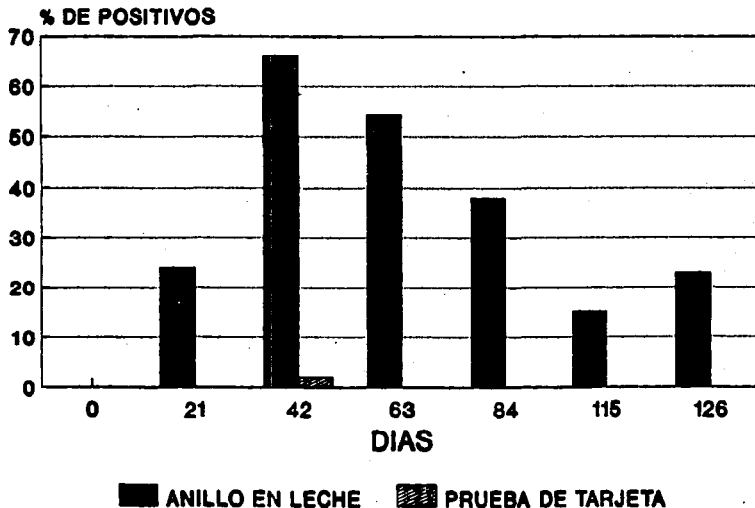
		D I A S P O S V A C U N A C I O N .						
RESULTADO DE LA PRUEBA	0	21	42	63	84	115	126	
POSITIVOS %	0	24	66	54	38	15	23	
NEGATIVOS %	100	76	34	46	62	85	77	
TOTAL %	100	100	100	100	100	100	100	

CUADRO 2.

Resultados Porcentuales de la Prueba de Tarjeta para las cabras vacunadas con dosis reducida (1×10^6 UFC/ml).

D I A S P O S V A C U N A C I O N .							
RESULTADO DE LA PRUEBA	0	21	42	63	84	115	126
POSITIVOS %	0	0	2	0	0	0	0
NEGATIVOS %	100	100	98	0	0	100	100
TOTAL %	100	100	100	100	100	100	100

PORCENTAJE DE REACTORES A LAS PRUEBAS DE ANILLO EN LECHE Y TARJETA EN CABRAS VACUNADAS CON DOSIS REDUCIDA DE REV 1 DURANTE 126 DIAS POSVACUNACION.



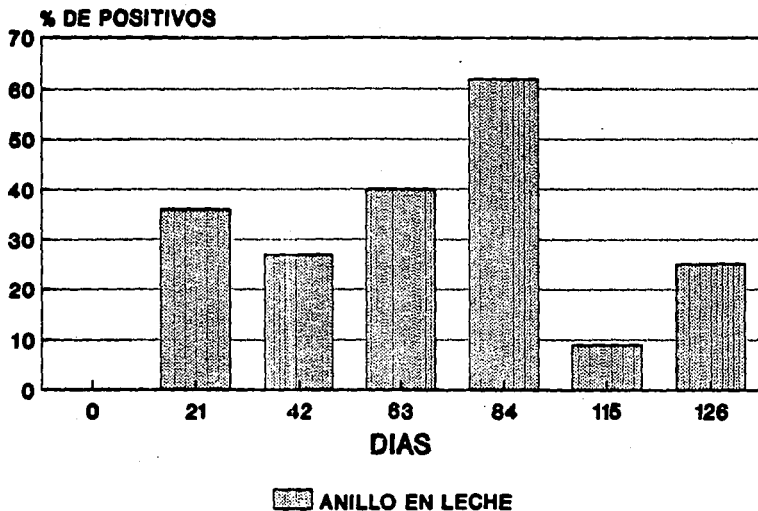
GRAFICA 1

CUADRO 3

Resultados Porcentuales de la Prueba de Anillo en Leche para las cabras control negativo (grupo no vacunado).

	D I A S P O S V A C U N A C I O N .						
RESULTADO DE LA PRUEBA	0	21	42	63	84	115	126
POSITIVOS %	0	36	27	40	62	9	25
NEGATIVOS %	100	64	73	60	38	91	75
TOTAL %	100	100	100	100	100	100	100

PORCENTAJE DE REACTORES A LA PRUEBA DE ANILLO EN LECHE EN CABRAS NO VACUNADAS, UTILIZADAS COMO CONTROL NEGATIVO.



GRAFICA 2

CUADRO 4.

Comparación estadística de los resultados de las pruebas diagnósticas de Anillo en Leche y Rosa de Bengala en muestreos posvacunales de cabras vacunadas en dosis reducida de Rev. 1 y un grupo control negativo (No vacunadas).

CABRAS CONTROL NEGATIVO.		CABRAS VACUNADAS CON REV 1.	
DIAS	% POSITIVOS DE ANILLO EN LECHE.	% POSITIVOS DE ANILLO EN LECHE.	% POSITIVOS DE ROSA DE BENGALA.
0	0	0	0
21	36	24	0
42	27	66	2
63	40	54	0
84	63	38	0
115	9	15	0
126	25	23	0

Valores con distinta literal minúscula en una misma columna y mayúscula en un mismo renglon presentan diferencia estadística significativa ($P < 0.01$) χ^2 tabla de contingencias.

DISCUSION.

Cuando la leche es ordeñada arrastra una gran cantidad de bacterias que generalmente están localizadas en el canal del pezón, sin importar que la cabra esté completamente sana. Se ha calculado por ejemplo que de 9,000 bacterias por ml. que se encuentran posteriormente a la ordeña, estas llegan a duplicarse en tan sólo 6 horas a 25°C (Sanchez, 1989; Flores, 1990). Por este motivo es de gran importancia la utilización de un conservador que sea capaz de disminuir esta multiplicación de bacterias, ya que la presencia de una gran cantidad de células interferiría con una prueba diagnóstica como es la de anillo en leche, tomando en cuenta además que por la lejanía del sitio de muestreo las pruebas por lo general se realizan dentro de las 48 hrs siguientes a la colecta. Por estos motivos fue utilizada la formalina como preservativo.

Los anticuerpos contra Bruella en las pruebas de seroaglutinación generalmente forman un complejo denominado antígeno-anticuerpo, sin embargo la reacción se ve afectada por la existencia de anticuerpos "incompletos" o "univalentes" que se unen al antígeno pero no producen la segunda fase de la reacción, es decir la agregación, por lo que no es posible una observación macroscópica, este suceso se conoce como fenómeno de prozona (Casas, 1978; Ciprian, 1990). Ya que en las cabras y en los ovinos es más común encontrar anticuerpos incompletos se ha recomendado el uso del NaCl (Flores, 1990) en las pruebas serológicas de tubo y de inmunodifusión radial, lo que aumenta la sensibilidad.

En la leche, la solución de NaCl colaboró para el libre movimiento de las proteínas globulares; entre los que se encuentran los anticuerpos contra Brucella y el antígeno, que son solubles en este tipo de sistemas acuosos por la misma función móvil o dinámica que desempeñan dentro de la célula (Lehninger, 1982).

En un estudio realizado por Sutra et al. (1985), en bovinos infectados experimentalmente y naturalmente, el tiempo de incubación se modificó a 18 hrs a una temperatura de 20°C, encontrándose resultados positivos más claros, con esto se logró bajar el límite de detección, con respecto a la prueba usual de anillo en leche.

Con este antecedente y partiendo del hecho de que en la PAL en cabras el volumen total de leche aumentó por la adición de otros reactivos que no se utilizan para la prueba original con leche de vaca, se incrementó el tiempo de incubación logrando así que el complejo antígeno-anticuerpo lograra recorrer toda la columna de leche, hasta formar un anillo claro y definido en la superficie.

Al momento de la unión del antígeno con el anticuerpo (si está presente) se dará de manera simultánea la unión de este complejo a los glóbulos de grasa, que se encuentran en forma de emulsión. El porcentaje de grasa en la muestra influye en la prueba, ya que la formación del anillo de crema en la superficie dependerá de la cantidad de grasa (Casas, 1978). La proporción de glóbulos grasos en la leche de cabra es superior que en la leche de vaca, sin embargo el tamaño y peso del glóbulo en la leche de cabra es menor (Casas, 1978), por lo que este factor dificulta el ascenso del

complejo antígeno-anticuerpo lo que da lugar a una molécula grande y más pesada que la molécula de grasa de la leche de cabra.

En la prueba de tarjeta se presentaron reactores unicamente a los 42 días posteriores a la vacunación, estos resultados son distintos a los obtenidos por Díaz (1989) y Mancera (1990), donde los títulos para la dosis reducida 1×10^3 de Rev 1 persistieron hasta los 180 días, pero son similares a los reportados por Pérez et al., (1991), quienes obtuvieron un nivel máximo de reactores para la prueba de tarjeta a los 30 días posteriores a la vacunación, manteniendose hasta los 45 días, para posteriormente declinar. A diferencia del presente trabajo, solamente el muestreo realizado a los 42 días presentó positivos (2%) y en los muestreos previos y posteriores no se presentaron positivos (Gráfica 1).

Para la prueba de anillo en leche, los primeros reactores se detectaron a los 21 días posvacunación, alcanzando el mayor número de positivos a los 42 días; en los muestreos consecutivos fueron disminuyendo los positivos hasta el día 126, en donde se registró un nuevo incremento, por lo que al realizar el análisis estadístico para comparar ambas pruebas diagnósticas siempre se presentaron diferencias entre si.

Estas diferencias pueden explicarse partiendo de que en bovinos la prueba de tarjeta detecta principalmente anticuerpos de tipo IgG1 aunque también reacciona con las IgM (Cortés, 1987), pero no con las IgG2 (Casas, 1978). Los isotipos de inmunoglobulinas presentes en concentraciones significativas en suero de bovinos son IgG1, IgG2, IgM e IgA. Isotipos similares, pero en diferentes

concentraciones ocurren en leche, sin embargo hay mayor concentración de IgA en esta secreción. Concentraciones de IgA en suero de bovino son usualmente muy bajas y la función de este isotipo en varias pruebas serológicas no están claramente definidas. Por lo que la presencia de IgA en leche juega un papel muy importante en la PAL. Sutra y col. (1985) encontraron que en vacas positivas a brucelosis en la PAL, la IgA siempre estaba presente asociada la mayoría de las veces a la IgM y en menor medida a IgG.

Como ya se dijo la IgG y la IgM también participan en la reacción del anillo que cuando se encuentran asociados pueden producir una aglutinación en el fondo del tubo por la formación de otros isotipos (FAO/OMS, 1986).

Los isotipos IgM además reaccionan más intensamente que los IgG, ya que al ser la molécula más voluminosa tiene más sitios de reacción por lo que facilita su observación en la PAL, se cree que esta puede ser la razón por la que se presentaron más positivos en PAL que en tarjeta. En caprinos las inmunoglobulinas tienen una clasificación de isotipos similar a la de bovinos, sin embargo poca información está disponible sobre la acción de estos isotipos en relación a las pruebas serológicas (FAO/OMS 1986).

A pesar de que la literatura señala que la Rev 1 en dosis reducida no se elimina en leche u otras secreciones (Ruiz, 1986). Los datos del presente trabajo indican que esto podría no ser del todo cierto, idea que es compartida por Díaz (1989). Para aclarar esto se evaluó el comportamiento del grupo testigo, que mostró

durante todo el muestreo posvacunal (115 días) para la prueba de anillo en leche animales positivos. En dicho grupo la presencia de positivos se empezó a dar a los 21 días después de aplicada la vacuna al otro grupo y el pico se alcanzó a los 84 días, mientras que en el grupo vacunado los positivos se presentaron también a los 21 días, pero su pico fue a los 42 días. La presencia de positivos en el grupo control sólo se puede explicar por la eliminación de la cepa vacunal y a que las cabras de ambos grupos vivían juntas. Sin embargo la prueba concluyente de dicha eliminación sólo la puede dar el aislamiento de la Rev 1, lo que lamentablemente no se logró a pesar de intentarlo. La prueba de anillo en leche está sometida a la influencia de factores individuales que aumentan las reacciones inespecíficas (Casas, 1978). Tal es el caso de reacciones cruzadas con otro tipo de bacterias presentes en la leche, como menciona Roberts (1985), que muestreó leches de cabra y encontró Yersinia enterocolitica bacteria que cruza con Brucella (Díaz, 1984). También se tiene que considerar a los animales que se encuentren enfermos de mastitis, ya que estos darán reacciones falsas positivas (Dawson, 1984).

CONCLUSIONES.

- Se logró adaptar la Prueba de anillo en leche para su uso en el diagnóstico de la brucelosis caprina, aplicando modificaciones a la técnica original.

- La prueba de anillo en leche modificada presenta una especificidad en cabras vacunadas con dosis reducida de Rev 1 del 77% a los 126 días posvacunación.

-A pesar de que la Prueba de anillo en leche se recomienda usar a nivel de hato, en este trabajo se adaptó de manera individual tratando de conocer los factores que influirían en ella. Es necesario realizar más investigación con el fin de determinar su sensibilidad y especificidad e intentar que funcione igual que en bovinos, como una herramienta dentro de la campaña de control de la brucelosis.

-En las cabras no vacunadas que convivían con los animales vacunados se observó respuesta posvacunal en la Prueba de Anillo en Leche, pero no en la prueba de Tarjeta, estos resultados nos sugieren la posible eliminación de la cepa vacunal Rev 1 por parte de las cabras vacunadas, sin embargo no se tiene la evidencia concluyente que sería el aislamiento e identificación de la cepa vacunal.

BIBLIOGRAFIA.

1.-Alton G.G., 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Inst. Nal. de la Recherche Agronomique, Paris.

2.-Alton G.G., 1981, La lucha contra la brucelosis bovina; Acontecimientos recientes. Revista Mundial de Zootecnia, No. 39.

3.-Casas O.R., 1978. Diagnóstico serológico de la brucelosis. CPS/OMS., Buenos Aires Argentina. p.107-141.

4.-Casillas M.A. y J. Garza. 1990. Datos no publicados y recopilados de las siguientes fuentes: Dirección Gral. Epidemiología, Dirección de Estadística e Información Pecuaria, Dirección Gral. de Fomento y Protección Pecuaria .

5.-Ciprian D.A.; Rodriguez V. y Mendoza E., 1990. Programa de acreditación y de diagnóstico serológico de brucelosis y su interpretación p. 50-75.

6.-Cortés M.L.M.; Díaz. A.E.; Vazquez N.J. y Ontiveros C.M.L., 1987. Comparación de los polisacáridos en el diagnóstico B de 3 cepas diferentes de Br. melitensis utilizados en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Técnica Pecuaria en México 25: 165-172.

7.-Díaz A.E., 1989. Inmunidad conferida por la vacunación y revacunación con Rev 1 en dosis reducida en cabras adultas y evaluadas en pruebas serológicas de brucelosis y su interpretación. Tesis de Maestría F.M.V.Z.-U.N.A.M. México.

8.-Díaz R.; J. Toyos; M. Salvo; L. Fenandez; B. Alonso e I. Moriyon, 1984. Studies on polysacharides B and native haptens of Brucella and Yersinia enterocolitica. Develop Biol. Standard 56: 213-220.

9.-Díaz A.E. y Mancera M.A., 1990. Situación actual de la brucelosis caprina en México. Memorias de la VII Reunion de la Asociación Mexicana de Producción Caprina, S.L.P., p. 194-198.

10.-Dawson F.L.M., 1984. Vlaams-Diergeneeskunding-Tijdschrift, 53:2, p. 94-98.

11.-Elberg S.S., 1981. Rev 1 Brucella melitensis Vaccine. Veterinary bulletin 51:67-72.

12.- FAO/OMS, 1986. Comité expertos de brucelosis, 6^o informe Ginebra. Serie de informes técnicos No.464.

13.-Flores C.R., 1986. Brucelosis, Ed. Tortora. México. p.173-177.

14.-Flores C.R., 1990. Infección por Brucella melitensis en ovinos y caprinos. Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios en Tuberculosis y Brucelosis Bovina. S.A.R.H./C.N.M.V.Z.M.

15.-Frappe M.R., 1981. Manual de infectología veterinaria, Editor F. Mendez, México D.F.

16.-García C.C., 1987. La Brucelosis de los animales en America Latina y su relación con la infección humana. Office International des Epizooties, Paris. p. 207-218.

17.-Gurría T.F., 1993. Campaña Nacional Contra la tuberculosis bovina y la brucelosis en México, Memoria de la Primera Reunion Anual del Consejo Nacional de Sanidad Animal.

18.-Gurría T.F., 1994. Situación actual de la brucelosis en México. Simposium Internacional de Brucelosis. Secretaría de Salud, México, D.F.10-11 marzo.

19.-Koneman W.E., 1984. Diagnostico microbiologico. Texto y

Atlas Color. Ed. Medica Panamericana, S.A. Buenos Aires Argentina.
p.200-255.

20.-Lehninger L.A., 1982. Bioquímica. 2a. edición. Omega,
Barcelona España.

21.-López M.A.; Cuauhtecatl H. y Migranas O.,1991. La
trascendencia de las zoonosis: La Brucelosis en México. En la
Epidemiología en México V.1 Dir. Gral. de Epidemiología.
Publicación Técnica del INDRE. p.51-58.

22.-Mancera M.A., 1990. Respuesta serológica de cabras jóvenes
inoculadas con diferentes dosis de la cepa Rev 1 de Brucella
melitensis. Comparación de pruebas y hallazgos al desafío
controlado. Tesis de Maestría, F.M.V.Z.-U.N.A.M.

23.-Morilla G.A., 1989. Inmunología veterinaria Ed. Diana,
México, 509p.

24.-Moyer N.P. y W.J. Hausler, 1991. The Genus Brucella, En
The Prokaryotes, V.3, 2a ed., Editor Albert Balows y Col., N.Y.
p.2384-2400.

25.-OIE., 1987. Brucellosis in cattle, sheep and goats,
Technical Series No.6. p.114-117.

26.-OMS/FAO., 1982. Zoonosis bacterianas y víricas Informe de
un Comité de Expertos de la OMS con Participación de la FAO, Series
de Informes Técnicos 682, Impreso en España.

27.-Pérez, D.E.; Preciado G.E. y Zepeda M. de O., 1991.
Respuesta serológica de anticuerpos de Brucella melitensis en
cabras vacunadas con dosis completa y diferentes dosis reducidas.
Memorias VII Reunion Nacional sobre Caprinocultura 23-29 de

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

octubre, Monterrey N.L.

28.-Pijoan C.A. y Montaraz J.A., 1978. Inmunidad contra Brucella, En Memorias del Foro Nacional Sobre Brucelosis, INIFAP-SARH y Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlan. Diciembre de 1978. México.

29.-Reyes C.P., 1983. Bioestadística aplicada. Ed. Trillas, México D.F. 216 pp.

30.-Roberts D., 1985. Microbiological aspects of goats'milk a public health laboratory service survey. Goat-Veterinary-Society-Journal, 6:1, 10-13.

31.-Ruíz C., 1986. Brucelosis, 3a. Ed. La prensa médica Mexicana, S.A., México D.F.

32.-Sanchez H.E., 1989. VI Congreso Nacional de Azteca Memorias del Curso: Transformación de la leche de cabra. Guadalajara Jal., Oct. 14-17.

33.-Secretaría de Salud. 1992. Boletín epidemiológico, informe semanal. Año 9, 2: 33.

34.-Secretaría de Salud, Dirección General de Medicina Preventiva, 1993. La historia de la brucelosis con referencia a los factores que determinan su ocurrencia situación en 1992.

35.-Sutra L.; Caggin D. y Dubray G., 1985. Role of milk immunoglobulins in the brucella milkring test. Veterinary microbiology, 12:4, 365-366.

36.-Valdespino O.J.R. y Batalla C.D., 1991. Análisis del daño económico producido por la brucelosis bovina a un hato lechero con un programa de control, IV Congreso Panamericano de la Leche, Resumen de trabajos, Guadalajara. Jal. 2-24 de Abril