



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
"Cuautitlán"



**DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE BRUCELOSIS EN EL  
HATO DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE DE LA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN,  
(MUNICIPIO DE CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

CASTRO ZEPEDA GUSTAVO MIGUEL

ASESORES: M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ

M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA

COASESOR: M.V.Z. JOSE JUAN VILLA SANDOVAL

CUAUTITLAN IZCALLI EDO. DE MEX.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN 1994



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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
 INSTITUTO NACIONAL  
 DE ESTUDIOS SUPERIORES  
 CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIMÉ KELLER TORRES  
 DIRECTOR DE LA F.E.S.-CUAUTITLÁN  
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
 "Diagnóstico serológico de brucelosis en el hato de bovinos -  
 productores de leche de la Facultad de Estudios Superiores --  
 Cuautitlán, Municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México".

que presenta el pasante: Gustavo Miguel Castro Zepeda  
 con número de cuenta: 8242739-7 para obtener el TÍTULO de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlán Izcalli, Edu. de Méx., a 7 de ABRIL de 1994.

PRESIDENTE	M.V.Z. Luz. Ma. Ortega de Ochoa	<i>[Firma]</i>
VOCAL	M.V.Z. Tonatiuh Cruz Sánchez	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	M.V.Z. Rafael Pérez González	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	M.V.Z. José Antonio Licea Vega	<i>[Firma]</i>
SEGUNDO SUPLENTE	M.V.Z. Carlos Castillo Guerrero	<i>[Firma]</i>

## DEDICATORIAS

A mi madre : Luisa Zepeda Gómez

Que durante mi vida me ha dado todo su amor, cariño y dedicación. Gracias.

A la memoria de mi padre : Gustavo Castro Reyna.

A mis hermanos : Lina, Lilia y Magnolia. que durante el convivir diario de la vida me han ayudado a seguir adelante.

A mi tío : Ing. Miguel Castro Reyna.

Con todo mi respeto y admiración.

A mis sobrinos :

Presentes y futuros; con todo mi amor y cariño a esas lindas y hermosas caritas que me siguen dando la alegría por vivir.

A todos mis amigos :

Javier B., Jorge T., Francisco M., Octavio A., Enrique S., Rosaura C. y Antonio C. Y a todos aquellos que en el transcurso de mi vida me han brindado su verdadera amistad y que por falta de espacio y no por olvido omito.

## AGRADECIMIENTOS

Al M.V.Z. Rafael Pérez González que tuvo la paciencia y comprensión de brindarme su apoyo incondicional no sólo como asesor sino también como amigo.

Al M.V.Z. Juan José Villa Sandoval por darme la oportunidad de colaborar y aprender a su lado, así como a todo el personal del Centro Nacional de Salud Animal que contribuyó a la realización de esta tesis.

Al M.V.Z. José Antonio Licea, que junto con todos los integrantes del laboratorio de Microbiología de la F.E.S.C. me brindaron la oportunidad y cariño para concluir este trabajo.

## I N D I C E

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCION.....	3
	2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA ENFERMEDAD.....	5
	2.2 HISTORIA NATURAL DE LA BRUCELOSIS BOVINA.....	8
	2.2.1 PERIODO PREPATOGENICO.....	8
	2.2.1.1. FACTORES DEL AGENTE.....	8
	2.2.1.2. FACTORES DEL HOSPEDADOR.....	14
	2.2.1.3. FACTORES DEL MEDIO AMBIENTE.....	19
	2.2.2. PERIODO PATOGENICO.....	21
	2.2.2.1. FASE SUBCLINICA.....	21
	2.2.2.2. FASE CLINICA.....	22
	2.2.3. PREVENCIÓN PRIMARIA.....	26
	2.2.3.1. PROMOCION DE LA SALUD.....	26
	2.2.3.2. PROTECCION ESPECIFICA.....	27
	2.2.4. PREVENCIÓN SECUNDARIA.....	29
	2.2.4.1. DIAGNOSTICO TEMPRANO.....	29
	2.2.4.2. TRATAMIENTO OPORTUNO.....	32
	2.2.5. PREVENCIÓN TERCIARIA.....	33
	2.2.5.1. LIMITACION DE LA INVALIDEZ.....	33
	2.2.5.2. REHABILITACION.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAL Y METODOS.....	36
5	RESULTADOS.....	68
6	DISCUSION.....	75
7	CONCLUSIONES.....	79
8	RECOMENDACIONES.....	80
9	BIBLIOGRAFIA.....	82

## INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	
Diferenciación clásica de especies de <u>Bruceella</u> .....	10
CUADRO 2.	
Interpretación de la prueba de placa y lenta en tubo en los bovinos.....	46
CUADRO 3.	
Titulación del complemento.....	55
CUADRO 4.	
Cálculo de la expresión $y/(100 - y)$ .....	56
CUADRO 5.	
Lectura de la prueba de anillo en leche.....	66

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	
Prueba de tarjeta.....	68
FIGURA 2.	
Prueba de placa.....	69
FIGURA 3.	
Prueba de fijación de complemento.....	70
FIGURA 4.	
Prueba lenta en tubo.....	71
FIGURA 5.	
Prueba de mercaptoetanol.....	72
FIGURA 6.	
Prueba de sivanol.....	73
FIGURA 7.	
Resumen de la incidencia de vacas positivas a <u>Bruceella</u> .....	74

## **1 R E S U M E N**

**Diagnóstico serológico de brucelosis en el hato de bovinos productores de leche de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.**

La brucelosis bovina, es una enfermedad infectocontagiosa causada por microorganismos del género Brucella, que afecta a la mayoría de las especies domésticas y que está caracterizada en los bovinos principalmente, por producir aborto en el último tercio de la gestación con cifras elevadas subsiguientes de infertilidad.

Su importancia, no sólo radica en las grandes pérdidas económicas que causa a la ganadería, sino también debido a que puede transmitirse al hombre en determinadas circunstancias, constituyendo una zoonosis.

Es difícil llevar a cabo un diagnóstico temprano y eficaz para determinar la existencia de la brucelosis, es por ello que debido a su complejidad debe recurrirse a los métodos de laboratorio, siendo las pruebas serológicas las más comúnmente empleadas.

El estudio del presente trabajo se basa en un diagnóstico de laboratorio de tipo serológico, utilizando diferentes técnicas tomando como base la prueba de tarjeta para descartar los reacciones positivas, utilizándose posteriormente pruebas tales

como rápida en placa, fijación de complemento, rivanol, mercaptoetanol, lenta en tubo y finalmente anillo en leche.

La incidencia obtenida en el presente hato; de un total de 93 muestras, comparando los resultados de las diferentes pruebas entre sí es de 23 vacas positivas serológicamente lo que equivale a un 24.7 % ; con una vaca sospechosa que equivale a 1.07% y el resto del hato: 69 vacas serológicamente negativas, lo que equivale a un 74.2%.

En base a este estudio y debido a la alta incidencia de brucelosis en este hato, se recomienda llevar a cabo el control y erradicación de la brucelosis de acuerdo a la Campaña Nacional contra la Brucelosis, que aparte de sugerir medidas sanitarias, con opción de sacrificio de reactores positivos, pretende la vacunación total del hato con la vacuna contra Brucella abortus cepa 19 dosis reducida en todas las hembras mayores de 4 meses, incluyendo gestantes, todas ellas serológicamente negativas.

## 2 I N T R O D U C C I O N

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa generalmente de curso crónico, causada por microorganismos del género Bruceella, que afecta a casi todas las especies domésticas y esta caracterizada (en los bovinos principalmente), por producir aborto en el último tercio de la gestación con retención placentaria; cifras elevadas subsiguientes de infertilidad y baja mortalidad (2,3,10,11). En determinadas circunstancias puede transmitirse al hombre, siendo el contagio un accidente individual, no habiendo medios naturales para que la infección se establezca; constituyendo así una amenaza a la salud pública (32,10).

Las principales especies que afectan a los bovinos son: en primer término Bruceella abortus y ocasionalmente B. melitensis y B. suis (10). También han sido descritas en otras especies no domésticas, no habiéndose encontrado pruebas directas, en el sentido de que éstas sean fuentes de contaminación directa o infección para los bovinos (3,16,34).

La brucelosis en los animales domésticos, constituye un factor de pérdidas muy importante, además de ser una epizootia, en la mayor parte de los países a nivel mundial (2,3). En México se calculó en el año de 1987 (según datos de la S.A.R.H) que las pérdidas por esta enfermedad ascendieron a 1,015.8 millones de pesos (1015.8 miles de nuevos pesos), considerando pérdidas

directas por leche no producida, disminución en la producción de crías y pérdidas por eliminación prematura de animales productivos (8).

La brucelosis bovina se encuentra extendida por todo el país, siendo las zonas más afectadas el sureste, el centro y zonas costeras disminuyendo en la parte norte (20), observandose con mayor frecuencia en zonas donde las explotaciones son de forma intensiva (9).

El estudio de esta enfermedad, radica principalmente, en dos aspectos; la transmisión como enfermedad al hombre (zoonosis) y las pérdidas económicas: ello debido principalmente al descenso de la producción de leche a causa de los abortos de las vacas, y a la infertilidad muchas veces como secuela: la cual aumenta frecuentemente el período de interparto. Además de la pérdida de la producción de leche, existen también pérdidas de becerros y obstáculos en los planes de crianza (3,10,13,16).

Debido a que desde el punto de vista zootécnico, sanitario y médico, la brucelosis presenta un problema de primer orden, actualmente a pesar de que existen numerosas técnicas para su diagnóstico; la importancia que reviste esta enfermedad, sigue creando la necesidad de desarrollar investigaciones con el propósito de incrementar la eficiencia en las técnicas de laboratorio. (15)

Es por ello que en el caso particular de el hato de bovinos productores de leche de la F.E.S.C. es importante determinar la

incidencia de brucelosis, ya que a pesar de los esfuerzos realizados en años anteriores, no se ha logrado controlar esta enfermedad.

## 2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA ENFERMEDAD

Algunos autores consideran que la brucelosis como enfermedad era conocida desde Hipócrates (400 años A.C). Sin embargo en las primeras descripciones en las cuales se presenta con claridad, son las de Cleghorn en el año de 1751 (34).

Durante la guerra de Crimea, en los años de 1854-1856, aparece la enfermedad en humanos en forma epidémica particularmente en la Isla de Malta. Entre 1859 y 1863 Maxton, realiza estudios clínicos cuidadosos y autopsias de casos de "fiebre Mediterránea remitente", presentando posteriormente, una descripción detallada de la enfermedad, considerándose desde entonces como padecimiento endémico, característico de los países bañados por el mar Mediterráneo (32,33,39).

En el año de 1886, David Bruce, descubre que la etiología de la fiebre de Malta en el hombre y la cabra es la Bruceella melitensis, y es en honor a él que la enfermedad recibe el nombre de brucelosis (8). Sin embargo, no es sino hasta el año de 1897, cuando Frederick Bang en Dinamarca, realiza el aislamiento e identificación de Bruceella abortus a partir de fetos de bovinos

afectados y membranas fetales, mencionada en el ganado bovino como "enfermedad de Bang" (8,10,16,22,32,34,40).

En América es difícil establecer dónde, cómo y cuándo hizo su aparición la brucelosis. La mayor parte de los investigadores opinan que la brucelosis es de origen europeo y que su presencia en algunos países de América podría remontarse a la época de la conquista. Hay suficientes datos para admitir que permaneció localizada en las zonas de mayor desarrollo ganadero hasta muy avanzado el siglo XX cuando se fue difundiendo por todo el continente y ya algunos países tuvieron la necesidad de combatirla (3,15).

Existe un reporte, según Hudson, en el año de 1864, de un brote epidémico de abortos en ganado vacuno en los estados de Luisiana y Mississippi en los U.S.A. Frank, en el año de 1876 demostró la naturaleza contagiosa de los bovinos (15).

Según Gutierrez y colaboradores, la brucelosis, en América fue diagnosticada clínicamente en Venezuela en el año de 1898, y en repetidas ocasiones durante los primeros años del siglo XX (15).

En el año de 1907 y 1908 aparece en el Perú, una enfermedad humana definida como "fiebre de larga duración, de marcha irregular y baja mortalidad" (15).

En la reseña histórica de cada país cabe destacar que se observan grandes discrepancias entre los hallazgos de diferentes

investigadores, la razón de las diferencias fue, casi siempre, la falta de estandarización en técnicas y reactivos [15].

En el caso particular de México Carbajal, en el año de 1906 reporta la existencia, sobre un caso en humano de "fiebre remitente", no siendo sino hasta el año de 1912 en el que el Dr. Resendiz, relaciona esta enfermedad extraña, con la importación de cabras murcianas en 1910 [34].

Posteriormente en el año de 1937 se inician los estudios en ganado ovino y caprino sobre esta enfermedad que se encuentra difundida en todo el territorio nacional [10].

A partir del año de 1971 se lleva a cabo la "Campaña Nacional contra la Brucelosis", planificada en 4 etapas: Etapa 1 o de Preevaluación; Etapa 2 o de Control; Etapa 3 o de Vacunación Masiva y finalmente la Etapa 4 o de Erradicación [14,15,31]. Contando además en esa época con una red de más de 105 laboratorios de diagnóstico veterinario en todo el país, y un Centro Nacional de Salud Animal (CENASA), que actuó y se sigue utilizando como referencia. Además de algunas casas comerciales, actualmente continúa un laboratorio oficial denominado Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), que produce antígenos y vacunas a nivel nacional [14,15].

Posteriormente en el año de 1981, la S.A.R.H. reglamenta el control de la brucelosis a nivel nacional, dándosele el carácter de obligatorio, general y permanente, reestructurándose el

programa de certificación de hatos libres, dándose énfasis en la vacunación, incluyendo la de animales adultos con dosis reducida (32,33).

## 2.2 HISTORIA NATURAL DE LA BRUCELOSIS BOVINA

### 2.2.1 PERIODO PREPATOGENICO

#### 2.2.1.1. FACTORES DEL AGENTE.

##### Nombre y características del Agente.

Según el manual Bergey ésta enfermedad está clasificada dentro de la familia Brucellaceae, siendo su género Brucella existiendo diferentes especies y son: Brucella abortus, Brucella melitensis, Brucella ovis, Brucella suis, Brucella canis y Brucella neotomae (3,7,8,10,29).

Los sinónimos más comunes son en bovinos: enfermedad de Bang, aborto infeccioso, o aborto contagioso. En el hombre: fiebre de Malta, fiebre ondulante, fiebre Mediterránea (bunnet), fiebre sudoral (Callasi), fiebre de Gibraltar, fiebre de Cartagena, fiebre caprichosa, fiebre sudoral gástrica, fiebre continúa, enfermedad de las 100 formas clínicas, etc. (3,10,11,22,27).

Son bacterias cocobacilares gram [-] de localización intracelular y de aproximadamente 0.5 a 0.7 por 0.5 a 1.5

micrómetros; inmóvil, sin cápsula, dispuestas en pares y cadenas cortas, no forma esporas; tienen tendencia a la tinción irregular (pueden observarse por tinción especial de Hansen para Baurella o Koster) y suelen cultivarse sólo en medios enriquecidos como gelosa sangre, Baurella agar, tripticasa agar, tripticaseína soya, infusión papa agar y agar sangre, agregándose de preferencia 5% de suero bovino, libre de anticuerpos contra Baurella pudiéndose también utilizar, suero equino (7,8,16,18,20,24). Así mismo Baurella abortus requiere de un medio con atmósfera que contenga un 10% de Co<sub>2</sub> (7,16,18,20,23).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 grados centígrados y su p.H. óptimo es de 6.6 a 7.4. Para muestras contaminadas se debe utilizar medios selectivos con la adición de antibióticos tales como Bacitracina, Polimixina B, Cicloheximida o bien Vancomicina, Acido Nalidixico y Nistatina (31,34).

En agar las colonias, son pequeñas, circulares, enteras, convexas, lisas, amorfas, brillantes grises y traslúcidas (3,7,10,16,18,29,34).

El tipo más característico de cada especie ha sido designado como biotipo 1. Y además del biotipo 1 en cada especie hay otros 8 biotipos en B. abortus; otros 3 en B. suis, y otros 2 en B. melitensis. (3,15,16,17,34). En México se han aislado los biotipos 1,2,4,7, y 9 de B. abortus y 1 de B. melitensis (14,15). Son positivos a la prueba de ureasa y oxidasa (excepto B. suis y

B. neptomae), ureasa variable que reducen nitrato a nitrito. Son citrato y rojo de metilo (-), no producen acetilmetilcarbinol ni gelatinasa y no liberan o-nitrofenol de o-nitrofenol-b-d-galactosido. El metabolismo es principalmente oxidativo con escasa fermentación de hidratos de carbono en medios convencionales. La producción de H<sub>2</sub>S, resistencia a la tionina y fucsina básica y la hidrólisis de urea ayuda a diferenciar las baucelas (2,10,14,21,29).

Para diferenciar las especies se utilizan medios característicos tales como se observan en el cuadro 1°, siendo las muestras ideales para el aislamiento en bovinos: leche, ganglios linfáticos (ganglios retrofaríngeos, supraamario e ilíaco interno), glándula mamaria, bazo, testículos y material abortado tal como cotiledones placentarios y feto abortado (pulmón y tejido abomasal) (3,14,24).

CUADRO 1 °

DIFERENCIACION CLASICA DE ESPECIES DE Baucella (10,24,29)

	<u>B. mellitensis</u>	<u>B. abortus</u>	<u>B. ovis</u>
Requerimiento de CO <sub>2</sub>	(-)	(+)	(-)
Producción de H <sub>2</sub> S	(-)	(+)	(+)
Urea	(+) Débil	(+) Débil	(+)Fuerte
Crecimiento en medio teñido			
Fucsina básica 1:100000	(+)	(+)	(-)
Tionina 1:100000	(+)	(-)	(+)

### Patogenicidad

No se han encontrado alejados del huésped y todos son patógenos, ya que son parásitos intracelulares facultativos con predilección hacia el sistema retículo endotelial y órganos del aparato reproductor y aunque, cada uno de ellos tiene predilección por una especie, puede ser en algunos casos infectado por otro (7). En el hombre preferentemente es afectado por B. melitensis; aunque también se han encontrado en forma significativa B. abortus y B. suis y en menor grado B. canis, no habiéndose reportado casos en B. ovis o B. neotomae (8,10,18,34,40).

La principal especie que afecta a los bovinos es B. abortus y ocasionalmente B. melitensis y B. suis (10,11).

En cabras y ovejas son huéspedes comunes de B. melitensis y B. ovis, pero B. abortus produce la enfermedad con menor frecuencia; en cerdos, la infección es casi exclusiva de B. suis aunque también puede ser susceptible B. abortus; en perros B. canis y no se descarta la posibilidad de que pueda ser infectada por B. abortus, B. melitensis y B. suis (10,20).

En el caballo también se ha encontrado cualquier tipo de Brucella, pero en especial, B. abortus y B. suis (10).

Específicamente Brucella neotomae afecta a la rata de la madera del desierto (Neotoma lepida) (7,8,16).

También la brucelosis ha sido registrada en el bisonte,

ante, mink, ciervo, coyote, zarigüella, mapache, alce, camello, aves de corral, conejos, búfalos, renos, yacks, antilopes, etcetera (3,7,10,16). No habiéndose encontrado pruebas directas en el sentido de que estas especies sean fuentes de infección para los bovinos (3,16).

### Virulencia

Los estudios de los componentes de la pared celular de las cepas virulentas de especies de brucelas, sugieren, que algunas fracciones interfieren con la fusión fagosoma-lisosoma y con ciertas actividades oxidantes subcelulares de leucocitos polimorfonucleares (11).

En las distintas especies de Brucella no se han detectado factores virulentos específicos de tipo clásico como son las exotoxinas o los constituyentes antibagocíticos de la cápsula de la pared celular. Es posible que exista un factor de virulencia que aumenta la supervivencia intracelular. Así, la B. abortus virulenta, procede de cultivos monocíticos o de placentas infectadas de bovino, sobrevive con mayor facilidad en las células mononucleadas de los microorganismos de la misma cepa cultivada en medios artificiales. Por lo tanto este factor de virulencia solo se produce en vivo (9).

Se ha demostrado la presencia de los antígenos primordiales en la superficie de las brucelas lisas (B. abortus, B. melitensis y B. suis) mismos que fueron identificados como A y M (10,18).

Estos antígenos están compuestos por liposacáridos y cantidades variables de polipéptido, que poseen características endotóxicas similares a las endotoxinas enterobacterianas. La fracción polisacárida de estos antígenos es la que posee mayor capacidad antigénica y es responsable de la especificidad. La proporción es variable según la especie de Brucella lisa que se trate, a diferencia de las colonias rugosas (B. ovis y B. canis) que poseen composición y características antigénicas similares entre sí (9,10).

### Resistencia

La pasteurización destruye a la Brucella, pero estas pueden sobrevivir varias semanas en tejidos fetales infectados y en el suelo (11). En quesos maduros, mueren en términos de pocos días a consecuencia de la acumulación de ácido láctico, sin embargo en los quesos frescos y mantequilla permanecen viables por largos períodos. La Brucella resiste a la salazón y al ahumado (9). La Brucella se elimina por la leche en aproximadamente el 50% de las vacas infectadas, pudiendo sobrevivir más de 6 meses en agua y alimentos en condiciones óptimas (29).

Todas las especies son susceptibles a todos los desinfectantes químicos, obteniéndose resultados satisfactorios con fenol, formal, cuaternarios de amonio, sosa y cal (3,10,34).

Son muy sensibles a las temperaturas superiores a los 55 grados centígrados. Book y cols, encontraron que son suficientes

20 minutos a 60 grados centígrados para destruir las brucelas siendo la más resistente B. suis (34).

La Brucella tiene una alta resistencia, cuando se expone al medio ambiente, particularmente en lugares secos y sombreados, sin embargo, son muy sensibles a la acción de la luz solar; Cameron encontro que bastan de 4 a 5 horas de luz solar para inactivar a este microorganismo (10,34).

#### 2.2.1.2. FACTORES DEL HOSPEDADOR

##### Inmunidad.

Las diversas manifestaciones inmunológicas pueden manifestarse simultáneamente en individuos o animales infectados, pero es común que se observen notables discrepancias, tanto en su aparición y evolución, como en su intensidad. Puede ocurrir que no se observe ninguna manifestación inmunológica y sin embargo, demostrarse la existencia de la infección por el aislamiento de brucelas en sangre (34).

Tanto B. abortus, B. melitensis, y B. suis se encuentran muy relacionadas entre sí y comparten un cierto número de antígenos en común. Las reacciones con sueros monoespecíficos, aunados a otras propiedades diferenciales son valiosas para la identificación. Las especies de B. canis y B. ovis son antigénicamente rugosas y no poseen los antígenos A y M (8).

En la brucelosis juegan un papel muy importante 3 sistemas de defensa, los cuales interactúan entre sí a fin de combatir la

*Infección y son :*

A) El sistema inespecífico no inducido. Quiere decir que son independientes del previo contacto con el antígeno; también es denominado de resistencia y comprende barreras anatómofisiológicas, bioquímicas y celulares (25,28,37).

B) Inmunidad Humoral. Esta es demostrable debida a los elevados títulos de anticuerpos producidos, representados por inmunoglobulinas de tipo IgG e IgM (9,11,37).

C) Inmunidad Celular. Esta centrada en la actividad de los linfocitos T y los macrófagos, siendo en esta enfermedad uno de los fenómenos de mayor importancia (28,37).

La acción de los macrófagos, constituye uno de los primeros intentos de defensa biológica; esto tiene una gran importancia en el caso de la brucelosis ya que, en ocasiones, estas quedan vivas en el interior de las células multiplicándose y excretando sus endotoxinas e inclusive, aparte de servir como vehículo, las destruyen saliendo para así invadir otros tejidos que también son de su predilección después de producir una bacteremia (23,34,37).

Otro tipo de células que juegan un papel importante en la reacción inmunológica y que intervienen en los procesos de base celular, son los denominados fagocitos mononucleares y los linfocitos independientes T. Los primeros pueden proceder de sangre (monocitos) o de tejidos (histiocitos) y adquieren formas de resistencia, transformándose en células epiteloides gigantes,

fibroblastos y varias más (25,28).

Los fagocitos mononucleares y los linfocitos T mantienen correlación de tipo inmunológico. Los primeros al fagocitar las brucelas "procesan" los antígenos que después han de servir para sensibilizar a las células T, y estos a su vez, influyen sobre los macrófagos por intermedio de mediadores. La actividad fagocitaria la llevan en 3 etapas: adhesión de las brucelas a su membrana plasmática, fagocitosis y descarga de enzimas lisosómicas. En algunos casos, las brucelas resisten la acción fagocitaria destruyendo la célula parasitada (28,37).

Dentro del sistema humoral, la base principal esta dada a traves de los anticuerpos (inmunoglobulinas que estan presentes en el suero y secreciones), y en una infección natural de B. abortus. Las inmunoglobulinas producidas son principalmente de la clase IgG e IgM, habiendose encontrado en los bovinos 2 subclases de inmunoglobulinas G denominadas IgG1 e IgG2 (9,34,36).

En vacunos infectados de forma natural por B. abortus la IgM es la primera clase de inmunoglobulina que aparece en el suero, alcanzando normalmente altos titulos en las infecciones aguda. La IgG aparece poco después, siendo la clase predominante cuando declina la respuesta de la IgM. La IgG normalmente persiste mientras el animal permanece infectado. De las dos subclases de la IgG del suero bovino (IgG1 y IgG2), la mas abundante es la IgG1 que es tambien la aglutinina predominante en los anticuerpos

que fijan el complemento (32,36).

La cepa 19 de la vacuna de B. abortus es una cepa viva atenuada de la biovariante 1 de B. abortus; la vacuna puede originar reacciones serológicas persistentes, especialmente cuando los bovinos son vacunados adultos. En terneros vacunados con la cepa 19, la IgM aparece primero, seguida posteriormente a los 10 días por la IgG. Los anticuerpos anti-Brucella IgG disminuyen con el tiempo y las aglutininas ocasionales persistentes se atribuyen a anticuerpos de la clase de las IgM (28,35,36).

Dentro de las aglutininas naturales la IgM es el principal componente natural de las aglutininas de B. abortus y la IgG está implicada con frecuencia en mucha menos extensión (28,36).

#### Factores de Edad y Sexo

El grado de susceptibilidad de todo el ganado está determinado por el número y la virulencia de los microorganismos requeridos para producir la infección. La infección congénita puede también atacar a becerros nacidos de hembras enfermas ya que ocurre en el útero, y puede permanecer latente en la ternera durante toda su vida. El ganado por lo general es más resistente a la brucelosis antes de la madurez sexual y se vuelve más susceptible a medida que se aproxima la edad de procreación (3).

Los terneros que ingieren leche contaminada con B. abortus virulenta excretan los microorganismos en sus materias fecales,

pero rara vez desarrollan una infección persistente. La mayoría de estos animales son susceptibles a la brucelosis cuando alcanzan la edad de reproducción (16). Las terneras nacidas de hembras infectadas suelen dar pruebas serológicas positivas de 4 a 6 meses debido a los anticuerpos colostrales y después dar datos negativos, aún cuando puede haber una infección latente en una proporción pequeña de animales (3).

En vacunos jóvenes antes de la madurez sexual, la brucelosis se desarrolla en un estado casi perfecto de parasitismo, manifestándose como una infección crónica leve en la que las brucelas no se multiplican extensamente ni demuestran particular afinidad por ningún tejido (36).

En hembras sexualmente maduras, la característica clínica cardinal es el aborto durante o después del quinto mes de la primera gestación (36).

Las vacas no preñadas y las vaquillas sexualmente maduras no son tan susceptibles como los animales preñados, pero algunas se infectan después de la exposición natural ó artificial a B. abortus virulento (16).

Muchos animales infectados nunca muestran signos clínicos después de la primera gestación y tienen terneras sanas pero con frecuencia eliminan brucelas después del parto. Son secuelas comunes la retención placentaria y la metritis. En los toros

ocasionalmente se presenta orquitis y epididimitis (36).

### 2.2.1.3. FACTORES DEL MEDIO AMBIENTE.

#### Factor Climatológico.

La brucelosis es una enfermedad que afecta a la mayor parte de los países a nivel mundial (15,16,34), teniendo una notable resistencia cuando se expone al medio ambiente particularmente en lugares secos y sombreados, disminuyendo la resistencia cuando aumenta la temperatura y la humedad. En materias fecales y orina a pesar de que ocurran fermentaciones o putrefacción, las brucelas pueden sobrevivir algún tiempo (34).

En la República Mexicana la brucelosis bovina se encuentra extendida por todo el país, pasando por climas húmedos tropicales (Sureste), templados (Centro), en donde la capacidad infecciosa puede persistir durante 100 días en invierno y 30 en Verano (13), disminuyendo en la zona Norte del país (15,32).

#### Fuentes de Infección

La forma más común en que se transmite la brucelosis bovina dentro de un hato no infectado, es mediante la introducción de ganado infectado (3,7,8,16). Se ha reportado también la transmisión mecánica de exudados de una granja a otra por carnívoros, existiendo otras posibles fuentes tales como ropas, vehículos y calzado contaminado (3,10,16).

Las vías más comunes de infección en el hombre y los animales es a través de las mucosas del aparato digestivo, ya sea por medio de la ingestión de material infectado o por aspersión

(la Brucella atraviesa fácilmente las membranas mucosas intactas de la faringe oral y tracto alimenticio ), piel indemne (3,10,11) conjuntiva (12), por vía sexual (genital), ya sea por semen contaminado ó por exudados del tracto reproductor; placentas, fetos abortados y terneros vivos procedentes de vacas infectadas; la transmisión congénita es rara pero ha sido descrita (3,32,36).

La Brucella bajo circunstancias poco comunes puede ser transmitida por picadura de moscos, mosquitos y garrapatas. Se han aislado bruceelas de estos artrópodos, y experimentalmente se ha demostrado que sobreviven y permanecen virulentas entre ellos (16).

#### Factores Socioculturales y Socioeconómicos.

En el hombre es muy común la infección através de productos lácteos, no pasteurizados (leche bronca), así, como la manipulación de tejidos infecciosos. La brucelosis es particularmente frecuente en rancheros, empleados de mataderos (rastros), y veterinarios (3,7).

Así mismo en nuestro país gran parte de la población mantiene vivas sus costumbres y creencias tradicionales de como se deben criar sus animales; preparando, consumiendo y vendiendo productos derivados de estos con mala calidad y nula inspección sanitaria, por lo que la brucelosis continúa siendo un factor limitante para el desarrollo pecuario en México (7,9,18).

## 2.2.2. PERIODO PATOGENICO

### 2.2.2.1.- FASE SUBCLINICA

#### Implantación.

En el periodo de Implantación, (ya sea cutáneo, mucoso, ó por otras vías) en la primera línea de defensa se encuentran los neutrófilos, (los cuales con frecuencia matan a la bacteria), o macrófagos donde la bacteria sobrevive y/o se multiplica intracelularmente. De ahí, las brucelas son transportadas primariamente por macrófagos vía sistema linfático, hasta los ganglios linfáticos regionales, donde los vacunos pueden mantener estos focos de infección durante toda su vida (8,16,18,22).

#### Reacción Tisular.

Al llegar al sistema retículo endotelial, las bacterias se multiplican en el interior de éstas células y llegan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales provocando 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 sanguíneo causando así una bacteremia, la cual puede persistir durante mucho tiempo. La diseminación hemática de las brucelas le permite llegar a los órganos y tejidos de su predilección como son el aparato reproductor y placenta, tejido linfático, hígado, bazo, médula ósea y otras partes del sistema retículo endotelial

en donde aparecen nódulos granulomatosos que pueden evolucionar hasta convertirse en abscesos. En estas lesiones, las brucelas son principalmente intracelulares; ocurren también en ocasiones osteomielitis, meningitis y colecistitis (3,7,8,10,18).

#### Período de Incubación

El período de incubación en bovinos es de 30 a 60 días, sin embargo en las vacas gestantes este período es inversamente proporcional a la etapa del desarrollo del feto en el momento de la infección (3,8).

En el hombre el período de incubación es de una semana a 4 meses (7,26,34).

#### 2.2.2.2.- FASE CLINICA.

##### Signos y síntomas inespecíficos.

En el ganado bovino, el primer signo es la linfadenitis difusa, serosa ó supurativa; la mayoría de las vacas presentan mastitis intersticial, focal, crónica, presentando raras veces cambios macroscópicos; siendo los signos mas evidentes en el útero gravido. Inmediatamente antes de abortar, la vaca puede presentar signos asociados con un parto normal; hinchazón e hiperemia de la vulva, relajación de los tejidos pélvicos, flujo de moco o exudado de la vulva, retención placentaria, metritis leve o moderada así como un rápido aumento del volumen de la ubre (3,10,16).

En los toros se puede observar orquítis y epididimítis, que puede ser uni ó bilateral con tumefacción aguda y dolorosa que aumenta hasta 2 veces su tamaño normal (10), así como el engrosamiento del escroto. En ocasiones, los animales desarrollan, artetis o abscesos en las articulaciones (16).

#### Signos y Síntomas Inespecíficos.

El signo clínico más común de la brucelosis en el ganado es el aborto en el último tercio de la gestación. El tiempo de la exposición y el aborto, es inversamente proporcional a la etapa de la gestación; mientras menor sea el feto en el momento de la exposición, mas prolongado será el período de la incubación (3,36).

El extracto producido por la gestación y capaz de estimular el crecimiento de B. abortus existe naturalmente en sus máximas concentraciones en la placenta y los líquidos fetales, siendo probablemente responsable de que la infección se localice en esos tejidos (3,7,8,10,16).

#### Lesiones.

En las vacas la apariencia macroscópica del útero gestante y del útero posparto es normal. Después del parto hay con frecuencia una endometritis leve ó moderada acompañada casi siempre con retención placentaria (3,16,36).

La reacción histológica principal consiste en la proliferación de células mononucleares, exudación de fibrina,

necrosis por coagulación y fibrinosis. Los granulomas consisten en células epiteloides y gigantes, con necrosis central y fibrinosis periférica (18).

Las brucelas se localizan en forma intracelular en los macrófagos y se desarrollan focos granulomatosos en varios tejidos; en los toros, la Brucella provoca hemorragia y focos necróticos en las vesículas seminales, en los testículos se encuentran focos de pus o toda su masa se transforma en tejido amarillo-pálido. El escroto se encuentra engrosado y endurecido existiendo alteraciones en ambos sexos ocasionalmente, tales como tendovaginitis, abscesos, artritis, bursitis (hígromas) (16) y linfadenitis difusa, serosa o supurativa. Es frecuente que se encuentren cambios similares en el bazo, pero pueden ser menos graves y de menor duración. Rara vez hay lesiones en hígado, y en ocasiones se presentan nefrosis tubular que puede ser causada por una reacción tóxica (16).

Los fetos que abortan entre el 5o. mes de la gestación y el término de la misma, están con frecuencia edematosos y con excesivo líquido subcutáneo, pero con pocas lesiones distintivas. En el abomaso, se encuentran masas de moco color blanco-amarillento; en las paredes del estómago, intestinos y vejiga, se pueden encontrar puntos hemorrágicos. En la cavidad torácica y abdominal suele encontrarse cantidad variable de un líquido sanguinolento con coágulos de fibrina, este mismo líquido suele

encontrarse también en tejido subcutáneo. Otra lesión frecuente es la neumonía y el infiltrado seroso en el cordón umbilical (10.19).

### Secuelas

En la siguiente gestación posterior al aborto, éste tiene lugar mas tardamente, para terminar el proceso clínico, con un parto prematuro, ó bien con un parto aparentemente normal, pero con un producto poco viable siendo muy rara la presentación de 3 abortos consecutivos (10).

La retención placentaria es comunmente prolongada persistiendo una endometritis crónica, ya que además de ser una fuente potencial de infección hacia otros animales, altera la posterior fertilidad y la capacidad reproductiva de la vaca (ya que aumenta el periodo entre la lactancia y por ende el promedio entre partos, el cual puede prolongarse por varios meses). Además de la pérdida de la producción de leche (que es hasta de un 20%), existen pérdidas de becerros y obstáculos para los planes de crianza. Posee esto gran importancia en las vacadas destinadas a la producción de carne, donde los becerros representan la única fuente de ingresos (3,11,19).

Asi mismo, en los machos, cuando la orquitis es severa y aguda, produce infertilidad, pero pueden recuperar su fecundidad normal sobretodo 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 o monta natural, pues el semen contiene exudado inflamatorio y bacterias viables (11,16).

Existen lesiones de sinovitis no supuradas en bovinos, sobretudo de rodillas, así como artritis no supurada erosiva progresiva en la articulación de la babilla (22).

#### Resolución

Muerte.- La mortalidad en el ganado vacuno es baja, siendo evidente y muy alta la muerte embrionaria pudiendo llegar en hembras primerizas a un 65%, 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 (15).

### 2.2.3. PREVENCIÓN PRIMARIA

#### 2.2.3.1. PROMOCION DE LA SALUD

A través de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis:

Trazar un plan específico que se adecúe a las necesidades particulares del rancho, con la necesidad de llevar a cabo el diagnóstico, control y erradicación de la enfermedad, através de medidas tales como:

- Llevar un registro o identificación de cada animal. (32)
- La adquisición o compra de animales libres de Brucelosis (3).
- Vacunar oportunamente a las hembras jóvenes y adultas con

vacuna contra Bruceella abortus cepa 19 dosis reducida (3,10,22,32,36).

-No mezclar animales sanos con enfermos o reactivos (16,22,32).

-Utilizar desinfectantes y antisépticos en salas de ordeño así como con el personal (9).

-Utilizar los métodos de esterilización de los productos lácteos tales como la pasteurización, así como las medidas que van encaminadas a reducir y evitar los riesgos de infección y diseminación de la enfermedad (16,22).

#### 2.2.3.2. PROTECCION ESPECIFICA.

La protección específica está basada principalmente en los métodos de inmunización particular de la enfermedad, siendo en la actualidad los métodos de inmunización más utilizados y recomendados: La vacuna cepa 19 y la bacterina 45/20 de B. abortus (3).

En las hembras, los animales vacunados con la cepa 19 a nivel de campo, tienen un alto grado de inmunidad contra el aborto, y del 65 al 75% de ellos son resistentes a la mayoría de las clases de exposición. Del 25 al 35% de los animales restantes vacunados pueden adquirir la infección, pero por lo general no abortan. Con la vacuna K 45/ 20 el 70% de los animales del grupo experimental y el 83% de los animales testigos resultan infectados después de la inoculación. Los animales infectados

expuestos continuamente al microorganismo en estudio, pueden infectarse al final, y actuar como portadores asintomáticos (7).

La vacuna de B. abortus cepa 19 se aplica únicamente a becerros entre 3 y 6 meses de edad, utilizando títulos de 6 x 10 a la 9 a 8 x 10 a la 9 gérmenes viables en dosis de 5 ml, confiriendo resistencia a la infección con cepas patógenas de B. abortus por lo menos durante 7 años, por lo que no es necesaria la revacunación. Esta medida de protección no se recomienda en las vacas adultas (10,32).

En los machos adultos, si bien la vacunación puede tener cierto valor, no existe prueba alguna en el sentido de que la vacunación de los toros proteja a éstos animales contra la infección, pero sí produce orquítis y la presencia de B. abortus en el semen (3).

En los últimos años se ha aceptado la vacunación de las vacas adultas con cepa 19, en dosis reducida vía subcutánea, declinando los títulos vacunales hasta el estado negativo después de 4 a 6 meses, sin embargo la vacuna puede originar infecciones persistentes en el 1 ó 2% de los animales (10,36).

Las ventajas que ofrece la utilización de la vacuna cepa 19 con dosis reducida, son las siguientes:

A) Se puede vacunar simultáneamente con la misma vacuna, becerros de 4 meses en adelante, vacas de cualquier edad inclusive

gestantes.

B) Se logra una rápida inmunidad del hato.

C) Los anticuerpos posvacunales tienden a desaparecer a los 8 meses posteriores a la aplicación de la vacuna.

D) El riesgo de que se produzcan abortos en hembras gestantes es mínimo.

E) Si se emplea la vacuna en un programa en el que se incluya el sacrificio de reproductores, el control de esta enfermedad se logra a corto plazo.

F) Las becerras vacunadas con dosis reducida logran una inmunidad celular a la que le confiere la vacunación normal [15,32].

Se han realizado diversos estudios con la dosis reducida de la cepa 19, encontrándose el máximo nivel de anticuerpos entre los 10 y 15 días post-vacunación, observándose a partir del 29 mes una reducción de títulos de anticuerpos, los cuales tienden a desaparecer, sin que esto interfiera en las subsiguientes pruebas serológicas como resultado de la persistencia de la cepa 19 o infección [17,22].

#### 2.2.4. PREVENCION SECUNDARIA

##### 2.2.4.1. -DIAGNOSTICO TEMPRANO.

Es difícil llevar a cabo un diagnóstico temprano de la enfermedad, ya que el aborto de un animal aislado o en un grupo de bovinos es debido a la multiplicidad de causas que pueden

intervenir [3,10]. Cuando se investiga un problema de aborto se recomienda el siguiente proceso: Asegurar la edad del feto, mediante la inspección y registro de apareamientos; tomar muestras de sangre para pruebas serológicas en busca de brucelosis, listeriosis y leptospinosis; examinar los líquidos uterinos y el contenido de abomaso fetal a la primera oportunidad en busca de tricomonas y subsiguientemente por métodos de cultivo para intentar aislar Bruceella abortus, Compylobacter fetus, tricomonas, listerias y hongos, especialmente si no se dispone del feto. Se procede también a examinar la placenta fijada para formular en su caso el diagnóstico de placentitis (3).

Es por eso que debido a su complejidad debe recurrirse a los métodos de laboratorio, siendo en este caso los mas comunmente empleados:

#### A: Diagnóstico Bacteriológico

Este tiene un 100% de exactitud, ya que se aísla y se cultiva la Bruceella a partir de secreciones uterinas, tejidos abortados, estómago y pulmón del feto, así como de leche. En algunas ocasiones se pueden utilizar biopsias y a nivel de rastro en el ganado tejidos linfáticos (bazo y gl. linfáticos). La desventaja de este método radica en la dificultad de aislar el microorganismo y lo costoso de determinar en cada uno de los animales (11,16,18,36).

#### B.-Diagnóstico Serológico

Existen gran cantidad de pruebas diagnósticas para detectar los anticuerpos de Brucella en el suero y plasma sanguíneo, como lo son la prueba de tarjeta, placa y fijación de complemento usadas ampliamente en programas de control de brucelosis, sin embargo en algunos casos, existe la posibilidad de obtener resultados falsos, tanto en el sentido positivo como en el negativo, siendo algunas de las causas, la posibilidad de una reacción cruzada con otros microorganismos, tales como: Vibrio cholerae, Pasteurella spp., Francisella tularensis, E.coli., Salmonella spp.; Bordetella bronchiseptica, Proteus Ox 19 así como Yersinia enterocolitica tipo IX ( así como otros con diferentes cepas y serotipos) (9), y diferentes cepas de Compylobacter los cuales dan resultados falsos positivos. Se han reportado resultados falsos negativos en los primeros 21 días posteriores al aborto (35) así como otros factores que pueden influir en las características de los antígenos como son: la disociación, pureza, esterilidad, concentración de electrolitos, p.H., concentración celular y fenómenos de zona principalmente (36,40). Es por ello que es aconsejable emplear siempre varios métodos serológicos con la finalidad de tratar de llegar a un resultado que nos pueda ser útil, ya que cabe destacar la dificultad diagnóstica de la brucelosis (11).

#### C. Pruebas de reciente creación.

1) Pruebas de intradermoreacción. Recientemente se han realizado

estudios en nuestro país, principalmente a nivel de humanos.

2) Prueba de Elisa-Ela. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas. Usualmente se conjuga una enzima (peroxidasa) con el anticuerpo dirigido contra el antígeno (22,32).

3) Prueba de hemólisis indirecta. Consiste en un antígeno soluble (lipopolisacárido), se fija a eritrocitos, de manera que cuando se añade el complemento este libera los gl. rojos si hay anticuerpos específicos contra el antígeno soluble (25).

4) Pruebas de inmunodifusión radial con antígeno polisacárido B. Es una prueba de inmunodifusión en gel, basada en el uso del agar impregnado de antígeno en el cual, cortando dos o mas pozos redondos de un diámetro de 3 ó 4 mm. nos permitirá la medición de anticuerpos (22,25).

#### 2.2.4.2.- TRATAMIENTO OPORTUNO

En los bovinos en términos generales, no se emplea terapéutica alguna en esta enfermedad. Han fracasado en el intento de eliminar la infección con ensayos realizados con plasma bovino, sulfadiazina, estreptomycin y clortetraciclina, administradas por vía parenteral y las dos últimas en infusiones en la ubre. Para eliminar a los bovinos portadores en hatos infectados, en algunos informes, se ha recomendado el tratamiento único con oxtetraciclina (10g), o bien con tetraciclina micronizada, pero estos informes no han sido confirmados (2,3,7). La razón de las diferencias en vivo e in vitro es debido fundamentalmente a la capacidad de las brucelas

de sobrevivir en el interior de las células en donde la concentración del antibiótico suele ser muy bajo (10,18).

En humanos se han estudiado gran cantidad de posibles tratamientos, tales como la combinación de estreptomina (1 gramo), mas trimetropin-sulfametoxazol 1600 mg. diarios de 3 a 4 semanas (20); (contraindicado la oxitetraciclina en el caso de mujeres embarazadas y niños) o sulfametoxazol 320 a 1600 mg. diarios de 3 a 4 semanas, elevándose la efectividad del tratamiento en forma periódica durante 1 o 2 años. Además del control clínico, se deberá llevar un control serológico y bacteriológico a manera de asegurar la desaparición de las brucelas del paciente (8).

#### 2.2.5. PREVENCION TERCARIA

##### 2.2.5.1. LIMITACION DE LA INVALIDEZ

Debe de llevarse a cabo un adecuado control y registro del ganado, aplicando la estrategia, de acuerdo al programa vigente de la Campaña Nacional contra la Brucelosis, para limitar la incapacidad y prevenir la muerte (32,33).

##### 2.2.5.2. REHABILITACION

La rehabilitación en el ganado, una vez contraída la enfermedad es difícil, debido a que en el caso de los machos la lesión es irreversible, ya que son lesiones degenerativas, por lo cual se recomienda el sacrificio. En las vaquillas de primer parto que llegan a abortar, posterior a la siguiente gestación puede llegar a la finalización del parto, o bien el aborto puede

tener lugar mas tardamente, para terminar el proceso clínico con un parto prematuro, o bien con un parto aparentemente normal, pero con un producto poco viable, siendo rara la presentación de 3 abortos consecutivos (10).

### 3 O B J E T I V O S

#### TERMINAL:

Determinar la incidencia de animales seropositivos a brucelosis en el hato de bovinos productores de leche de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ( Municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México).

#### INTERMEDIOS:

Determinar la incidencia de Brucella en el hato de bovinos productores de leche de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, para llegar a un diagnóstico serológico, aplicando las diferentes técnicas serológicas de rutina, como son:

- A) Prueba de Tarjeta.
- B) Prueba Rapida en Placa.
- C) Prueba de Fijación de Complemento.
- D) Prueba de Rivanol.
- E) Prueba de Mercaptoetanol.
- F) Prueba de Lenta en Tubo.
- G) Prueba de Anillo en Leche.

#### 4 MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Producción Agropecuaria, así como en el laboratorio de Microbiología L-513 del campo No. 4 de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán; debido a la especificidad del material requerido, así como a la complejidad de una de las técnicas, se recurrió al laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Salud Animal (CENASA) ubicado en Santa Ana Tecamac, Edo. de México.

##### 1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

A) Suero bovino de las vacas del módulo de bovinos productores de leche del hato de la F.E.S.C.

B) Antígeno en suspensión coloreado con Rosa de Bengala de B. abortus cepa 1119-3 concentrada al 8% en p.H. de 3.6. inactivada por calor para la prueba de tarjeta (2,31).

C) Antígeno en suspensión coloreado de B. abortus cepa 1119-3 con un p.H. entre 6.4. y 7.0, inactivada por calor y concentrada al 12% para la prueba rápida en placa (4,9,31).

D) Antígeno en suspensión de B. abortus cepa 1119-3 en solución salina fenolada a concentración del 4 % con un p.H. de 6 + - .02 para la prueba rápida en placa con rivanol (8,31).

E) Antígeno en suspensión de B. abortus cepa 1119-3 inactivada por calor y concentrada al 4.5% con un p.H. neutro sin colorante para ser utilizada en la prueba de lenta en tubo y fijación de

complemento (2,9,31,32).

F) Antígeno para la prueba de anillo en leche cepa B. abortus 1119-3 a una concentración de 4.5% teñida con hematoxilina (8,31).

Otras sustancias para la prueba de fijación de complemento:

- Glóbulos rojos (Hematies de carnero)
- Sueros de bovino. (Patrón control estandarizado >80 y +5)
- Sueros de cobayo (Fuente de complemento)
- Hemolisina

## 2.- MATERIAL QUIMICO.

-Alcohol.

Para prueba de Tubo:

NaCl 25.5 gr.

Fenol 15 ml.

Agua destilada c.b.p. 3000 ml.

Para prueba de mercaptoetanol:

Na Cl 8.5gr.

Mercaptoetanol (C H OS) 7.14 ml.

Agua destilada c.s.p. 1000 ml.

Para la prueba de rivanol :

Solución de rivanol al 1% (lactato-2-etoxi-6,9 diaminocridina)

Para la prueba de fijación de complemento:

Fórmula 1: Solución Limpiadora: Acido fórmico diluido.

Bicromato de potasio... 20 g.

Acido Sulfúrico..... 76.6 ml.

Agua destilada c.s.p....1000 ml.

Fórmula 2 : Solución 0.85% Cloruro Sódico

Cloruro de Magnesio al 0,416 mol./lt ... 1.2 ml.

Cloruro Cálcico al 0,125 mol/ lt..... 1.2 ml

Azida Zódica (como conservador) ..... 0.8 g.

Fórmula 3: Solución Alsever.

Glucosa..... 18.66 g.

Cloruro de Sodio.....4.18 g

Citrato Sódico.....8.0

Acido Cítrico.....0.55 g.

Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Para la hemolisina:

Glicerina.

Fórmula 4 : Soluciones madre para conservar el complemento.

Solución A:

Acido Bórico ( $H_2BO_3$ ) ...0.93 g.

Bórax ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) ... 2.29 g.

Sorbitol ( $C_6H_{12}O_6 \cdot 1/2 H_2O$ )... 11.74 g.

Solución saturada de Cloruro de Sodio hasta 100 ml.

**Solución B:**

Bórax ..... 0.57 g.

Azida Sódica (NaN<sub>3</sub>)...0.81 g.

Solución saturada de Cloruro Sódico hasta 100 ml.

**3.-MATERIAL DE VIDRIERIA.**

Para obtener muestras :

-Tubos de ensaye de 10 ml. con tapón de rosca.

-Agujas del No.16 X 2 ".

-Rejillas para tubos de ensaye.

Para pruebas serológicas:

-Placa cuadrículada de cristal, de 3 cm. por cada lado.

-Fuente luminosa indirecta y reflejada en fondo negro.

-Pipetas serológicas de Bang graduadas en 0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 ml.

-Pipeta de 2ml. graduadas en décimas.

-Pipeta de 1 ml graduada en décimas.

-Tubos de ensaye de 13 x 100 ml.

-Aplicadores de madera (palillos)

-Gotero para antígeno estandarizado para entregar 0.03 ml. sobre dilución en suero..

-Reloj marcador

-Pipeta Pasteur.

-Probeta de 500 ml., 250 ml. y 10 ml. graduadas.

-Matraz Erlen Meyer graduado de 500 ml. y 250 ml.

#### 4.-EQUIPO

Para la toma de muestras:

- Cuerdas.
- Naviguero.
- Botas.
- Overol.

Para el Laboratorio:

- Bata.
- Centrífuga.
- Centrífuga a - 70 grados centígrados.
- Balanza Hidrostática y Analítica.
- Estufa bacteriológica.
- Estufa para secar.
- Autoclave.
- Refrigerador.
- Congelador de - 70 grados centígrados.
- Espectofotómetro.
- Autoclave.
- Reloj.
- Baño María a 2 temperaturas. ( 37 y 60 grados centígrados.)
- Potenciómetro.

**OTROS:**

- *Maskin tape.*
- *Mascador.*
- *Torundas de algodón.*

### METODO DE RECOLECCION DE MUESTRAS Y PRUEBAS EFECTUADAS

Se recolectaron 93 muestras de sangre de las vacas del módulo de bovinos productores de leche del hato de la F.E.S.C. através de la vena yugular, previa antisepsia, de las cuales se procedió a obtener el suero, mediante el reposo de muestras por 24 horas en refrigeración y otras (las cuales no pudieron separarse por este método) por medio de centrifugación a 1500 r.p.m. durante 10 minutos.

Una vez obtenidos los sueros y ennumerados consecutivamente, se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

Nota: Cabe destacar que antes de iniciar cualquiera de las pruebas que a continuación se describen, (exceptuando la de fijación de complemento que lleva una metodología especial) se debe retirar el suero y el antígeno del refrigerador, exponiéndose a temperatura ambiente de 30 a 60 minutos (2,4).

#### A. - PRUEBA DE TARJETA.

También llamada card-Test, Rosa de Bengala, Antígeno Braucelar Amortiguado (2,9,32), Buffered Braucella Antigen (BBA), Rose Bengal Plate Test (R.B.P.T.), Prueba del Antígeno Acidificado Tamponado, L'E preuve AL' Antigene Tampone (E.A.T.)(2,25,32).

Es una prueba de tipo cualitativo (2,28) simple y rápida (ya que tiene la ventaja de poderse realizar en el campo sin requerir equipo especializado y no es necesaria mucha experiencia

para su interpretación) (2); descubre así mismo, la infección temprana y puede usarse como prueba inicial de selección ya que detecta más rápido la infección, que las pruebas de aglutinación en tubo, alvanol o mercaptoetanol, y es un método excelente para la selección de sueros a gran escala (2,32,35). Las reacciones positivas falsas se estiman entre el 1 y 3%, dependiendo del nivel de infección y de los antecedentes de vacunación del rebaño. Las reacciones falsas negativas se estima que oscilan entre el 1 y 2% (36).

Esta prueba tuvo su origen en la prueba de placa con antígeno acidificado, introducida por Rose y Roepke (1957), la cual consistía en una mezcla del antígeno de placa con tres ácidos: el glacial, láctico y tartárico. Estos autores observaron que con el p.H. de su prueba se destruye la actividad de las aglutininas no "específicas" sin afectar a las "específicas" (32).

Experimentos de Corbel (1972), confirman por medio de filtración en gel y ultracentrifugación de densidad, que las IgM (19s) no es activa en la prueba de tarjeta, mientras que la IgG (7s) clase I es activa en pruebas de fijación de complemento y tarjeta (9,25). Esta prueba parece poco sensible, pero es más específica que las demás, por lo que se puede utilizar para separar los animales positivos de un hato (2,4,9,11,25,32).

#### DESARROLLO DE LA PRUEBA

Se depositan por gotas cantidades iguales de suero y

antígeno (0.03 ml) sobre la placa o tarjeta destinada a tal efecto, se mezcla con un palillo en forma circular y se mueve posteriormente de adelante hacia atrás (cuidando que no se mezclen entre si las pruebas) recomendándose que sean de 15 a 20 movimientos por minuto. Los resultados se leen inmediatamente después de 4 minutos (2,9).

#### INTERPRETACION DE RESULTADOS

Esta es una prueba de tipo cualitativo, por lo que los resultados se interpretan como positivos (aglutinación en cualquier grado) o negativo (ausencia de aglutinación) (2,9).

A partir de este resultado a las muestras que resulten reactores positivos, se les realizarán las siguientes pruebas:

#### B.- PRUEBA EN PLACA

También se le conoce como reacción de Huddleson o reacción rápida de aglutinación en placa (2,4) y es una prueba de tipo cuantitativo, ya que determina el título de anticuerpos que contiene el suero.

#### DESARROLLO DE LA PRUEBA

Con la pipeta de Bang de 0.2 ml.; se extrae el suero problema del tubo de manera que el suero rebasa la marca superior de 0.08 ml. Posteriormente con una toalla de papel absorbente se seca el residuo del suero adherido en las paredes externas de la pipeta. Inmediatamente después se iguala la cantidad de suero a la marca superior de 0.08 ml; haciéndolo que

la punta de la pipeta toque la pared superior del tubo original del suero. Para efectuar esta operación la pipeta deberá tener una inclinación de 45 grados, y se depositará colocando la placa de aglutinación, depositando en el primer cuadro de la placa, la cantidad de 0.08 ml. Utilizando el mismo método se depositan en el centro de los cuadros siguientes, las cantidades de 0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 (2,4,25).

Posteriormente el frasco que contiene el antígeno de placa se homogeniza por agitación manual durante un minuto y se deposita una gota de 0.03 ml. de antígeno sobre cada una de las cantidades del suero; se agitan las mezclas con el removedor ó aplicador de madera, empezando con la mezcla de mayor a la de menor concentración obteniéndose diluciones de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 respectivamente.

Posteriormente se mueven en forma rotatoria durante 3 a 5 veces a los 4 minutos y después de 8 minutos se leen los resultados.

Interpretación de la prueba:

Reacción 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 gruesos (9,25,32).

Reacción Intermedia o Incompleta. (I)

Incluye todos los grados intermedios de reacción, abarcando

desde pequeñas cantidades de células bacterianas aglutinadas, hasta casi la totalidad de las mismas (9,25,32).

Reacción Negativa (-)

Se manifiesta como una mezcla homogénea de suero-antígeno, sin evidencia alguna de aglutinación (9,25,32).

CUADRO 2

INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE PLACA Y LENTA EN TUBO EN BOVINOS  
(1,4,9,25,32)

1:25	1:50	1:100	1:200	GANADO NO VACUNADO	*GANADO VACUNADO
-	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
I	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
+	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
+	I	-	-	SOSPECHOSO	NEGATIVO
+	+	-	-	SOSPECHOSO	NEGATIVO
+	+	I	-	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
+	+	+	-	POSITIVO	SOSPECHOSO
+	+	+	I	POSITIVO	SOSPECHOSO
+	+	+	+	POSITIVO	POSITIVO

\* Hembras vacunadas a la edad de 4 a 6 meses de edad con cepa 19 (1).

(+) Aglutinación Completa.

(-) Aglutinación Negativa.

(I) Aglutinación Incompleta.

PRECAUCIONES DE LA PRUEBA:

Con el objeto de que los resultados de las pruebas de aglutinación en placa y en tubo sean comparables, deberán considerarse los siguientes puntos:

A) Al efectuarse la distribución del suero en sus diferentes

diluciones, deberá manejarse la pipeta convenientemente sostenida casi horizontalmente, permite que el suero se adhiera a las paredes laterales de la pipeta, reduciendo la exactitud de la reacción (25).

B) No deberá utilizarse pipetas de boca ancha o rotas (25).  
C) Los goteros deberán manejarse en posición vertical, con el objeto de facilitar la salida de la gota en su volumen exacto. Si el gotero es sostenido en ángulo o se hace un movimiento para tirar la gota, el volumen del antígeno variará sensiblemente (25).

D) Al mezclarse el suero con el antígeno, deberá tomarse la precaución de iniciarse con la dilución más alta (25).

E) La superficie de mezcla debe ser de forma circular y nunca menor de 2 cm. ni mayor de 3 cm. de diámetro.

F) La mezcla deberá de ser homogénea y completa ya que, cuando no se realiza en forma adecuada, pueden ocurrir aglutinaciones parciales debido a una alta concentración de aglutinas.

G) Aglutinación Falsa.

En algunas ocasiones podrán encontrarse sueros de bovinos que presentan una aglutinación aparente en las diluciones de 1:25 ó 1:50 antes de que se realice la rotación de la placa. Al realizar la lectura, los grumos tienden a dispersarse, sin embargo después de uno o dos minutos vuelven a presentarse. Este fenómeno se conoce como falsa aglutinación debiéndose interpretar

como negativa (4).

#### H) Reacciones anormales de aglutinación.

Estas observaciones son necesarias cuando se investiga en forma masiva la brucelosis en los animales domésticos.

1.- Fenómeno de Prozona. Es aquel que se presenta en algunos sueros que aglutinan en las diluciones altas (1:100 y 1:200) y no se detecta aglutinación en las diluciones bajas. (1:25 y 1:50)

Esto se debe a la presencia de anticuerpos incompletos, los cuales se estan produciendo en el transcurso del proceso infeccioso, que bloquea a los anticuerpos completos cuando se fijan al antígeno (9).

2.- Existencia de anticuerpos no específicos.

Reaccionan en las distintas diluciones dándose como sospechosos ó positivo. Se debe a la presencia de anticuerpos contra otros microorganismos (32).

3.- Presencia de hemólisis en las muestras de suero.

Interfiere en la presencia de la prueba de aglutinación, no sólo por la coloración que puede enmascarar a la reacción, si no por que se forma un precipitado como resultado de la acción del fenol que contiene el antígeno diluido sobre la hemoglobina libre (9).

#### C) PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

También llamada F.C. o C.F. Existen diferentes técnicas utilizables para esta prueba, por lo que los resultados en

diferentes laboratorios donde se lleva a cabo esta prueba a menudo son distintos y no comparables (36). Esta prueba se realiza en muchos países para el diagnóstico de brucelosis y se ha demostrado ser la más exacta y sensible, ya que el anticuerpo fijador del complemento predominante es IgG de tipo I (25,36). Esta prueba es excelente, sólo que para llevarla a cabo es necesario que el laboratorio cuente con personal capacitado así como material y equipo adecuados (31). Es por ello que esta prueba se realizó en el Centro Nacional de Salud Animal (CENASA) en Santa Ana Tecamac Edo. de México.

Esta prueba detecta anticuerpos producidos por la vacuna cepa 19 de B. abortus hasta 6 meses después de la vacunación, no así las pruebas de seroaglutinación que continúan detectandolas durante más tiempo. En los animales con infección crónica los niveles de anticuerpos tienden a disminuir con las pruebas de seroaglutinación, mientras que con la prueba de fijación de complemento, los niveles diagnósticos persisten durante mucho tiempo (9,23).

En el caso del presente trabajo, el método que se utilizo fue el sistema en caliente de macrofijación de complemento y se funda en el método descrito en la publicación Public health Monograph, No. 74 (1965) del Servicio de Salud Pública de los U.S.A. y utiliza 5 Unidades hemolíticas al 50% de complemento (1).

Antes de utilizar la cristalería se lavaran con solución detergente para eliminar todos los reactivos y se mantendrán después durante 18 horas en un baño de una solución de Ac. Crómico al 10% (fórmula 1). Posteriormente se enjuagará cuidadosamente a continuación dos veces en agua destilada. La cristalería, se secará con calor seco (1,12).

Para llevarse a cabo esta prueba, son necesarios cinco elementos: Antígeno, suero (también denominado problema), complemento, el amboceptor o indicador hemolítico compuesto principalmente por glóbulos rojos y hemolisina (32,39).

#### Diluyente:

Para la preparación de todas las soluciones y suspensiones necesarias para la prueba de fijación de complemento se empleará una solución isotónica, de preferencia amortiguada; siendo la más comúnmente utilizada la solución salina normal con Magnesio y Calcio (fórmula 2). Agregándosele Azida Sódica a razón de 0.8 g. por litro como conservador; el diluyente puede almacenarse a granel a la temperatura ambiente (1).

#### Recolección y almacenamiento de hematies de carnero.

Deben elegirse tres ó más carneros que produzcan hematies con un grado de sensibilidad satisfactorio y constante; sangrar siempre los mismos carneros elegidos. La sangre se recogerá asepticamente en un recipiente que contenga un volumen de solución Alsever análogo al de la sangre que se va a tomar. Los

dos líquidos se mezclarán cuidadosamente. La solución Alsever descrita en la fórmula 3 se esteriliza en autoclave (1).

La sangre de carnero así conservada puede almacenarse asepticamente en refrigerador, en frascos con tapon de rosca; no se utilizará hasta 5 días por lo menos, después de la sangría y sigue siendo utilizable hasta 6 semanas después, siempre que no se contamine (1).

#### Hemolisina (Amboceptor)

Es un suero que contiene un alto título de anticuerpos contra los hematies de carnero. Como se combina este anticuerpo con hematies en suspensión se dice que estos están sensibilizados, esto es, que en presencia de complemento libre, sufren lisis. Por lo general la hemolisina suele prepararse a partir de conejos, también se encuentra de venta en el mercado (comercio, generalmente en forma líquida, conservada en volumen igual de glicerina). La hemolisina en el caso de la prueba de fijación de complemento, se trabaja en diluciones de 1: 2000. (1).

#### Preparación y conservación del complemento.

Sangrar por lo menos tres cobayos, separar lo antes posible el suero del coágulo, y mezclar para preparar el complemento. Los cobayos adultos y bien nutridos con verduras frescas dan un complemento de buena calidad. Los animales habrán de estar en ayunas, durante las doce horas anteriores a la sangría, no se utilizaran hembras preñadas y recién paridas. El complemento debe almacenarse congelado a -40 grados centígrados o a

temperaturas mas bajas, donde se cuente con medios adecuados. El almacenamiento en nitrógeno líquido es un procedimiento eficaz y práctico. Cuando no se dispone de medios para desecar ó congelar el complemento, éste puede conservarse por el método de Richardson, con lo que mantendrá su título durante unos 6 meses si se almacena de 0-4 grados centígrados. Aun a la temperatura ambiente, la pérdida del título no es rápida (1).

Se emplean dos soluciones madre que se conservan por tiempo indefinido (fórmula 4):

Para mezclar el complemento mezclar 8 partes de suero de cobayo con una parte de solución B seguida de una parte de solución A. Al ir a emplearlo, cada ml. de complemento conservado se añade a 7 ml. de agua destilada para restaurar la tonicidad, así se obtiene una solución de 1:10 del complemento, las diluciones ulteriores se hacen en diluyente de fijación de complemento (1).

#### Antígeno.

El antígeno que se utiliza en la prueba de fijación de complemento es el utilizado en la prueba de lenta en tubo de B. abortus cepa 1119-3 inactivada por calor y concentrada al 5% con un p.H. neutro el cual ya viene titulado, utilizandose (o agregandose) el diluyente (fórmula 2) en proporción 1: 200 (1,9,31,32).

### La técnica compuesta de Fijación de Complemento.

En el sistema que se describe a continuación se utiliza la técnica de meseta, empleada para la titulación de hemolisina con el fin de determinar la cantidad de hemolisina necesaria para obtener una suspensión de hematies con una sensibilización óptima y 5 unidades hemolíticas del complemento al 50%, en caliente utilizándose macrovolúmenes para su medición (tubos) (1,32).

### Separación de la suspensión de hematies de carnero

En un tubo para centrifugación de 15 ml., se pone una cantidad adecuada (hasta de 10 ml.) de hematies de carnero conservados en solución Alsever, se llena con diluyente y se mezcla bien su contenido. Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 minutos para sedimentar los hematies, y el líquido sobrenadante se desecha por decantación (así como la fina capa de leucocitos que recubre el sedimento). Los hematies se vuelven a suspender en nuevo diluyente y se repite la centrifugación. Para la tercera y última centrifugación los hematies se vuelven a suspender en 15 ml. de diluyente (1).

Se lee después el volumen del depósito y una vez desechado el sobrenadante se suspende cada mililitro del depósito en 32.33 ml. de diluyente para obtener así una suspensión al 3%. Para calcular la cantidad exacta de hematies necesitados se multiplica .25 ml. que es la cantidad necesaria por cada tubo

por 5 ( que es el número de tubos necesarios de dilución por cada suero problema) por el total de sueros problema a utilizar.

Para una exacta dilución al 3% se utiliza el espectrofotómetro, estandarizando la densidad óptica (D.O.), y después midiendo a 0.39 que es el 100% de hemólisis, de la prueba utilizando el 3% de glóbulos rojos siendo la diferencia variable para el espectrofotómetro (1).

Posteriormente se prepara en dos partes iguales quedando en un total: el 50% del diluyente con los gl. rojos y una parte igual (50%) de hemolisina (1,39).

La suspensión de hemáties, si se conserva a unos 3 grados centígrados, puede emplearse hasta 24 horas después de su preparación (1).

#### Titulación del Complemento

El procedimiento para la titulación es el siguiente:

- 1.- Preparar eritrocitos sensibilizados mezclando volúmenes iguales de hemolisina y eritrocitos al 3% diluidos de la forma que se indicó anteriormente. Dejar la mezcla en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente y mezclar de cuando en cuando.
- 2.- Preparar dilución madre de fijación de complemento 1:40.
- 3.- La prueba se realiza en 2 veces el volumen normal para reducir al mínimo los errores de utilización de las pipetas y conseguir un volumen total suficientemente grande para permitir la lectura en el espectrofotómetro.

Disponer 4 tubos adecuados en una gradilla y agregar los reactivos en las cinco cantidades y en el orden indicados en el cuadro 3

CUADRO 3  
TITULACION DEL COMPLEMENTO. (1)

	T U B O			
	1	2	3	4
Complemento al 1:400 (ml)	0.3	0.4	0.5	0.6
Diluyente (ml)	1.2	1.1	1.0	0.9
Eritrocitos sensibilizados (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5

4.- Posteriormente el contenido de cada tubo se mezcla agitando suavemente y se incuba a continuación en baño maría a 37 grados centígrados durante 30 minutos; en ese periodo se agita una sola vez a los 15 minutos. Una vez concluida la incubación, sacar los tubos del baño maría, agregar 2.0 ml. de diluyente frío en cada tubo y centrifugar los tubos para que queden las células intactas; verter a continuación los sobrenadantes de los tubos y determinar sus densidades ópticas respectivas en el espectrofotómetro (1).

5.- Calcular ahora los valores de expresión  $Y$  y  $/(100-Y)$  para cada cantidad de complemento siendo  $Y$  el porcentaje de hemólisis (sólo se toman en consideración los tubos que presenten una hemólisis del 10 % al 90 %)(1).

El cálculo se efectúa como en el ejemplo del cuadro 4.

**CUADRO 4**

**CALCULO DE LA EXPRESION  $Y/(100-Y)$  (1)**

Cantidad de Complemento	Densidad Óptica	Porcentaje de Hemólisis (Y)	$Y/(100-Y)$
0.3	0.065	13	0.15
0.4	0.235	47	0.89
0.5	0.360	72	2.60
0.6	0.445	89	8.10

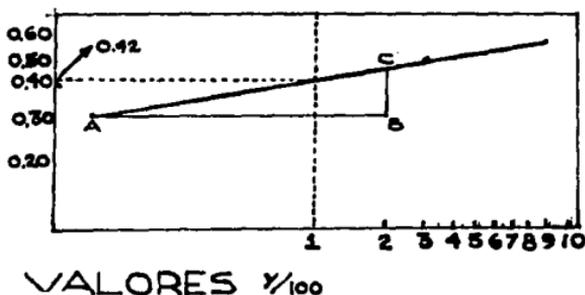
Para reducir la cantidad de cálculos necesaria, conviene hacer un cuadro en el que se indique A) el % de hemólisis y B) la expresión  $Y/(100-Y)$  para cada lectura fotométrica comprendida entre el 10% y 90 % de hemólisis (1).

Marcar los valores de la expresión  $Y/(100-Y)$  correspondientes a cada cantidad de complemento en papel de abscisas y ordenadas logarítmicas (véase en forma simplificada en la figura I) y obtener la tendencia uniendo los puntos con una línea recta lo mas precisa posible. El punto donde la línea inclinada cruza la línea "1" indica el 50 % de hemólisis y CH 50 puede leerse en ordenadas de papel. (vease la línea intermitente.)

7.- Un simple cálculo basta para averiguar el factor de dilución necesario en la prueba de diagnóstico. En este ejemplo 0.42 ml., osea, 2.1 ml. de esta dilución contendrá 5 CH50 y para calcular la dilución que tendrá esta cantidad de complemento en 0.5 ml. (se estan utilizando volúmenes dobles) se emplea la siguiente

ecuación en que X es el factor de dilución necesario.  $400/2.1 = X/05$  es decir,  $X = 95$ . El empleo de volúmenes menores en la prueba de diagnóstico no afecta ese factor de dilución, pues las diluciones de cada reactivo siguen siendo iguales.

GRAFICA  
TITULACION DEL COMPLEMENTO (1)



INACTIVACION DEL SUERO

Ciertas condiciones, en particular la contaminación bacteriana, pueden aumentar la actividad anticomplementaria natural del suero. La hemólisis en el suero tiene un efecto anticomplementario escaso o nulo. La actividad anticomplementaria natural del suero se suprime calentando a baño maría durante 30 minutos. En el caso de sueros de ganado ovino, bovino y caprino, la temperatura de inactivación si están vacunados a 60 grados centígrados y si no están vacunados a 56 grados centígrados.

### La Prueba de Diagnóstico (Macroiniciación)

1.- Una vez obtenidos los sueros positivos a la prueba de tarjeta, se separan y en un tubo de ensaye se agrega .15 ml del suero problema agregándose .6ml. de diluyente.

2.- Posteriormente se introducen al baño maría por un período de 30 minutos. Se preparan los sueros controles ( los cuales se obtienen a partir de un patrón de reacción ante la prueba: NS y >80 ) agregándose .15 ml. de suero patrón mas .6 ml. de diluyente.

3.- Por cada suero problema , en una gradilla aparte, se ponen otros 5 tubos (marcándose el primero, es decir el suero problema con el número consecutivo del caso, colocándose en el extremo derecho) agregándosele .25ml. de diluyente a todos exceptuando el último (es decir el del extremo izquierdo).

En el caso de ser sueros no vacunados, se utilizan 6 tubos en total, teniendo una dilución de 1:5 1:10, 1:20, 1:40 y 1: 80.

4.- Una vez realizado esto, se toman .50 ml. del tubo No.1 ó del extremo derecho (suero problema), y se pasa hacia el tubo 6 del extremo izquierdo (tubo vacío). Del tubo 6, se toman .25ml. y se pasa al tubo 5, quedando ahora en este .50 ml., se mezcla bien y ahora, de éste (tubo 5) se toma .25 ml. y se pasa al tubo 4, se mezcla bien, y se toman .25 ml. del tubo 4, agregándosele al tubo 3, se mezcla bien y por último se pasa al tubo 2, mezclándose en este último y desechándose de éste .25 ml, quedando las

diluciones del tubo 2 al tubo 6 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, y 1:80 con un total de .25 ml. en cada tubo.

5.- Se pone ahora .25 ml. de antígeno a todos los tubos excepto al tubo 1 (identificado que se va a tomar como control del suero).

6.- El complemento ya titulado y mantenido a una temperatura entre 4 y 6 grados centígrados se le agrega a todos los tubos .25 ml.

7.- Se pone a baño maría a 37 grados centígrados por 30 minutos.

8.-Y se agrega .25ml. de gl. rojos dentro del baño maría a 37 grados centígrados, 30 minutos mas.

9.- Se introducen en refrigeración y a las 24 horas se lleva a cabo la lectura.

#### Preparación de los controles del complemento

Se ponen 6 tubos con .25ml. de antígeno, .25ml. de complemento y se agregan .25ml. de gl. rojos, aforándose .25ml. de diluyente para que también tengan la misma cantidad de ml. que los sueros.

La metodología llevada a cabo en los controles es la misma que en los sueros problemas.

#### Lectura de resultados.

El Comité Mixto FAO/ OMS de expertos en Brucelosis recomienda que se use el PISAb (Patrón Internacional de sueros Anti-brucella abortus) para la normalización de antígenos y la

comparación de resultados y que los títulos de los sueros se expresen en unidades internacionales (U.I.) El PISAb consiste en el suero de una vaca infectada con B. abortus, cepa 544 y contiene casi exclusivamente la IgG. La unidad internacional se definió como la actividad contenida en 0.09552 mg. del PISAb actual. Cada ampollita del PISAb, luego de reconstituirla en 1 ml. de agua destilada contiene 1000 U.I.

**Interpretación:**

El punto final de la reacción es tomado como la última dilución que muestra una apreciable fijación (las trazas de hemólisis son ignoradas); esta dilución se toma como el título del suero.

Con el sistema de macro fijación de complemento en tubos:

Cuando la fijación se realiza en caliente 1:5 sospechoso y 1:10 o más se considera positivo (39).

**D.-PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO.**

También llamada prueba lenta en tubo y S.A.T.; siendo una prueba de tipo cuantitativo, proporciona en algunas ocasiones resultados mas claros que los obtenidos en la prueba de placa. Esta prueba puede realizarse utilizando 3 procedimientos distintos, llevándose a cabo para este experimento el método de dilución decimal. Tiene la desventaja de no poder diferenciar anticuerpos vacunales de infecciosos o estados de cronicidad (4,25).

#### **PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.**

Para llevar a cabo esta prueba se necesita diluir el antígeno 1:100 en solución salina fenolada; la preparación de la solución salina fenolada es la siguiente:

NaCl 25.5 grs.

Fenol 15 ml.

Agua destilada c.b.p. 3000 ml.

Preparación del antígeno de tubo diluido:

Antígeno de tubo (concentrado) 30 ml.

Solución Salina Fenolada 2970 ml.

Volumen final 3000 ml.(1)

Posteriormente se colocan los tubos de ensaye en hileras de 4 en las gradillas, marcandose, el primer tubo de cada hilera con el número del suero que se va a probar. Con la pipeta de Bang, se depositan las mismas cantidades de suero, que las descritas en la prueba de placa (0.08., .0.04, 0.02., y 0.01 ml.) dentro de cada tubo de la hilera, deslizando la pipeta a lo largo de la superficie interna del tubo. Posteriormente con una pipeta de 2 ml. se introducen en cada tubo 2 ml. del antígeno debidamente diluido para obtener diluciones de 1:25, 1:50, 1:100, y 1:200. Se agitan suavemente las gradillas con tubo durante 30 segundos y se incuban a 37 grados centígrados durante 48 horas (2,25).

**INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:**

*Reacción Positiva: Cuando la mezcla de suero y antígeno es clara y una leve agitación no disgrega los flocúlos.*

*Reacción Incompleta: Cuando la mezcla de suero y antígeno, es parcialmente clara, y una agitación leve disgrega los flocúlos.*

*Reacción Negativa: Cuando la mezcla del suero y antígeno, no muestra claridad y al agitar no se observan flocúlos.*

*Existe en algunos casos el fenómeno denominado PROZONA, que se presenta por una ausencia o ligera aglutinación en las diluciones mas bajas, debido a la presencia de una gran cantidad de anticuerpos que interfieren con la aglutinación (25).*

*La interpretación es similar a la que se realiza en la prueba de placa (como se observa en el cuadro 2) (2,4).*

#### **E.-PRUEBA DE MERCAPTOETANOL.**

*El antígeno, es el mismo que el utilizado en la prueba de tubo pero a diferente concentración; es una prueba de tipo cuantitativo y cualitativo, ya que nos proporciona el tipo y cantidad de inmunoglobulina en el suero; es conveniente comparar los resultados obtenidos en las pruebas de Mercaptoetanol y de tubo, ya que la de tubo nos indica el total de aglutininas presentes en el suero, y la de Mercaptoetanol nos indica la cantidad de IgG, por lo que la diferencia entre ambos títulos es la proporción de aglutinina IgM presente en la aglutinación, indicándonos de esta manera la posible infección de los animales muestreados, con el fin de diferenciar niveles de anticuerpos*

vacunales, (IgM) de los procesos infecciosos activos (IgG), tomando en cuenta el tiempo en que fueron vacunados.

El antígeno es el mismo que el utilizado en la prueba de tubo, la diferencia es que debe de estar diluido 1:50 y la solución diluyente no debe contener fenol. (21)

Se necesita además, una solución al 0.1 molar/litro de 2 mercaptoetanol. La fórmula de la solución es la siguiente:

NaCl 8.5 gr.

2- Mercaptoetanol (  $\begin{matrix} C & H & OS \\ & 2 & 6 \end{matrix}$  ) 7.14 ml

Agua destilada c.s.p. 1 lts.

La solución se conserva a 4 grados centígrados y se prepara una nueva cada 2 semanas. El producto es cancerígeno y de exportación.

#### DESARROLLO DE LA PRUEBA,

Se coloca el suero en tubos en la forma y cantidades descritas en la prueba de tubo (0.08, 0.04, 0.02, 0.01, ml.), se agrega a cada tubo 1 ml. de solución 0.1 molar de Mercaptoetanol y 1 ml. de antígeno diluido (1:50). Se agitan ligeramente las gradillas con tubo dejando que el Mercaptoetanol actúe para romper los enlaces de las inmunoglobulinas Ig M y se incuba a 37 grados centígrados, durante 48 horas. La lectura se hace de la misma forma que la prueba de tubo (25).

#### F.-PRUEBA DE RIVANOL.

Esta prueba fue desarrollada en 1964, y se basa en que el Rivanol (que es un colorante de Acridina) tiene la habilidad de precipitar las proteínas del suero bovino, entre ellas "las aglutinas no específicas" (5,9,25,32). Mediante el uso de cantidades iguales de suero y una solución al 1% de rivanol, queda un precipitado y un sobrenadante; de este sobrenadante se detectan exclusivamente las IgG. Sin embargo, para que la prueba pueda ser efectiva, se emplea un antígeno altamente sensible y específico con el fin de compensar el efecto de la dilución de anticuerpos (2,9,25).

#### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Se colocan los tubos de ensayo marcándose cada tubo de cada hilera con el número de tubo que se va a probar. Con la pipeta serológica colocar 0.4 ml de rivanol y a continuación se agrega 0.4 ml. de suero. Mezclar inmediatamente, agitando el tubo. Se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 5 minutos y posteriormente con una pipeta de Bang, se toma el sobrenadante y se coloca en los cuadros de la placa de vidrio las cantidades de 0.08, 0.04, 0.02, y 0.01. Se agrega una gota de 0.03 ml. de antígeno a cada dilución y se mezcla con el removedor múltiple o aplicadores de madera y se incuba por 12 minutos, al momento, a los 6 minutos y posteriormente a los 12 minutos se mueve la placa en forma

rotatoria y se realiza la lectura (9,25).

Lectura de resultados:

Se lee igual que la prueba de placa (32).

Las mezclas de sobrenadante y rivanol se denominan diluciones 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, sólo que no son verdaderas diluciones, pero reciben este nombre para simplificar la comparación de las reacciones de estas pruebas con los resultados de las otras. En la interpretación es de gran valor cualquier grado de aglutinación, incluso a títulos bajos para considerar a un animal como reactor positivo (9,25,32).

#### G.-PRUEBA DE ANILLO EN LECHE O BANG.

Se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en la forma correcta, tiene mucha sensibilidad, ya que se puede utilizar en leches hasta de 60 vacas (25). De esta manera, utilizando esta prueba de diagnóstico en forma colectiva, se podrá determinar en un momento, dado que explotaciones de una región están afectadas por la brucelosis, intensificando la acción sobre las mismas (32).

Esta prueba se realiza en muestras obtenidas de botes receptores o bien de leches procedentes, durante el vaciado de los botes de pocas vacas ordeñadas. La prueba del anillo deberá realizarse en un lapso no mayor de 72 horas después de ser tomada la muestra y conservada en refrigeración por lo menos a 5 grados centígrados

durante 12 horas (4,25,32).

#### PROCEDIMIENTO

Colocar los tubos de ensaye en una gradilla, previamente identificados para diferenciar las distintas muestras. Posteriormente se depositan en tubos de 1 ml. de la leche problema utilizando para ello las pipetas serológicas de 1.0 ó de 5.0 ml. Una vez colocado 1ml. de leche en cada uno de los tubos, depositar con un gotero una gota de 0.03 ml. de antígeno a todos los tubos. Mezclar la leche y el antígeno mediante la inversión del tubo por 3 ocasiones oprimiendo la boca del tubo con el dedo índice sin violencia, repitiendo la misma operación con cada tubo, no sin antes enjuagarse los dedos con agua destilada y secarlos con una toalla. Incubar en una estufa bacteriológica a 37 grados centígrados durante 30 a 60 minutos (lo mismo se hace si se cuenta unicamente a baño maria) (22)

#### LECTURA DE RESULTADOS.

#### CUADRO 5

#### LECTURA DE LA PRUEBA DE ANILLO DE LECHE (25,32)

Anillo de Crema	Anillo de Leche	Resultado
Muy coloreado (azul)	Blanco	+++
Francamente coloreado	Ligeramente coloreado	+++
Medianamente coloreado	Ligeramente coloreado	++
Mismo color	Mismo color	+
Blanco, lig. coloreado	Francamente coloreado	

**INTERPRETACION.**

*Cualquier lectura de 1+ a 4+ se considera positiva (8).*

## 5 RESULTADOS

**TABLA 1**  
**PRUEBA DE TARJETA**

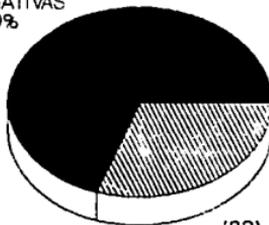
Total de muestras utilizadas : 93 (100%)

Interpretación : Aglutinación en cualquier grado : Positiva.

No. PROCESADAS	POSITIVAS	NEGATIVAS
93	28	65

**FIGURA 1**  
**PRUEBA DE TARJETA**  
**MUESTRAS UTILIZADAS: 93 (100%)**

(65) NEGATIVAS  
69.9%



(28) POSITIVAS  
30.1%

G.C.Z. 1983.

**TABLA 2**

**PRUEBA DE PLACA**

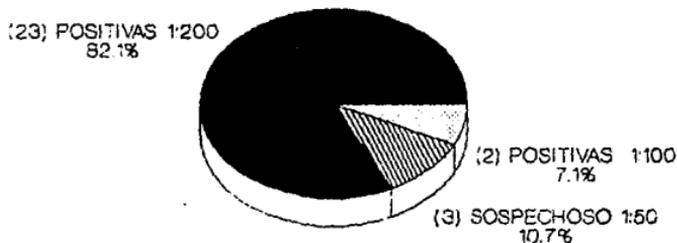
Total de muestras utilizadas : 23 (100%)

Se tomaron en cuenta Titulos con reaccion incompleta en veinticinco (I25) hasta positiva en concentraciones de uno en doscientos (1:200).

Interpretación : de acuerdo al cuadro 2 de interpretación rápida de la prueba rápida en placa y lenta en tubo para bovinos.

No. Muestras y su reacción	DILUCIONES				DIAGNOSTICO
	1:25	1:50	1:100	1:200	
					NEGATIVO
		3+			SOSPECHOSO
			2+	23+	POSITIVO

**FIGURA 2**  
**PRUEBA DE PLACA**  
**% DE DIFERENTES TITULOS**



G.C.Z. 1993

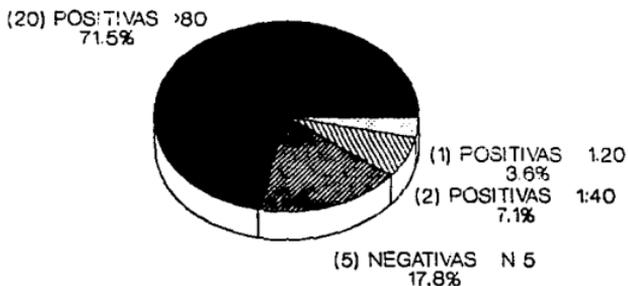
**TABLA 3**  
**PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO.**  
 Total de Muestras Utilizadas : 28 (100%)  
 se tomaron en cuenta titulos de 1:5 hasta > 80.  
 Interpretación : Técnica en Falo de Macrofijación. (PLSAb)

No. Muestras y su reacción	DILUCIONES					
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	
					DIAGNOSTICO	
					NEGATIVO	
					SOSPECHOSO	
			1+	2+	20+	POSITIVO

### FIGURA 3

#### FIJACION DE COMPLEMENTO

#### % DE DIFERENTES TITULOS



G.C.Z. 1993.

**TABLA 4**

**PRUEBA DE LENTA EN TUBO**

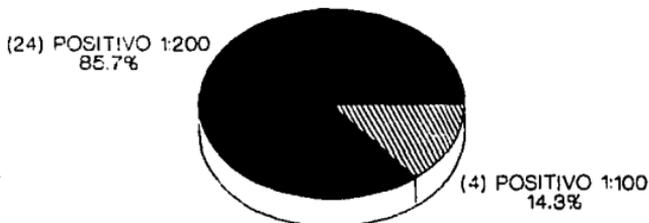
Total de muestras utilizadas : 28 (100%)

Se tomaron en cuenta títulos desde una reacción incompleta de uno en veinticinco (1:25), hasta positiva en concentraciones de uno en doscientos (1:200).

Interpretación : De acuerdo al cuadro 2 de la interpretación de la prueba de rápida en placa y de lenta en tubo para bovinos.

		DILUCIONES				
		1:25	1:50	1:100	1:200	DIAGNOSTICO
No. Muestras y su reacción						NEGATIVO
						SOSPECHOSO
				4+	24+	POSITIVO

**FIGURA 4**  
**PRUEBA DE LENTA EN TUBO**  
**% DE DIFERENTES TITULOS**



G.O.Z 1993.

**TABLA 5**

**PRUEBA DE MERCAPTOETANOL**

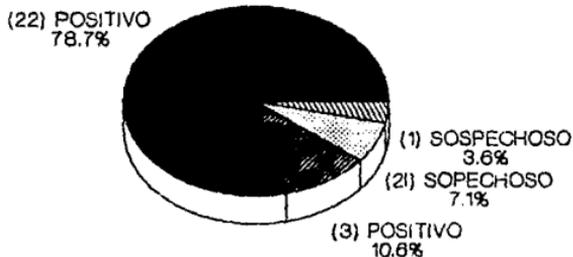
Total de muestras utilizadas : 28 (100%)

Se tomaron en cuenta títulos desde una reacción incompleta en veinticinco (1:25) hasta positiva en concentraciones de uno en doscientos (1:200)

Interpretación : De acuerdo al cuadro 2 de Interpretación de la prueba rápida en placa y lenta en tubo.

No. Muestras y su reacción	DILUIONES				DIAGNOSTICO
	1:25	1:50	1:100	1:200	NEGATIVO
		1+	2(I)		SOSPECHOSO
			3+	22+	POSITIVO

**FIGURA 5**  
**PRUEBA DE MERCAPTOETANOL**  
**% DE DIFERENTES TITULOS**



G.C.Z. 1993.

**TABLA 6**

**PRUEBA DE RIVANOL**

Total de muestras utilizadas : 28 (100%)

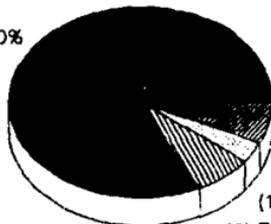
Se tomaron en cuenta títulos desde una reacción incompleta en veinticinco (1:25), hasta positiva en concentraciones de uno en doscientos (1:200)

Interpretación : De acuerdo al cuadro No. 2 de Interpretación de la prueba de rápida en placa y lenta en tubo para bovinos.

		DILUCIONES					
		Sin título	1:25	1:50	1:100	1:200	DIAGNOSTICO
No. Muestras y su reacción	2						NEGATIVO
				1+			SOSPECHOSO
					2+	23+	POSITIVO

**FIGURA 6**  
**PRUEBA DE RIVANOL**  
**% DE DIFERENTES TITULOS**

(23)POSITIVO 82.0%



(2) NEGATIVO 7.2%

(1) SOSPECHOSO 3.6%

(2) POSITIVO 7.2%

G.O.Z. 1993

#### PRUEBA DE ANILLO EN LECHE

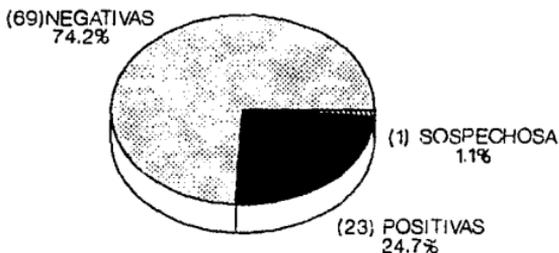
Se interpretó de acuerdo al cuadro 5 de interpretación de la prueba de anillo en leche, obteniéndose un color ligeramente coloreado y positivo en tres cruces (+++).

#### INCIDENCIA TOTAL DE BRUCELA

Total de Muestras utilizadas : 93 (100%)

Se correlacionó el resultado de cada una de las pruebas comparandose entre sí obteniéndose como resultado total :

### FIGURA 7 RESUMEN DE LA INCIDENCIA DE VACAS POSITIVAS A BRUCELOSIS



G.C.Z. 1993.

## 6 DISCUSION

En el presente trabajo, se trató de tomar el mayor número de muestras posibles, asignándose un número consecutivo a cada animal (independientemente del número de arete), descartándose aquellas vacas que no tuvieran arete o que el número de identificación no fuera claro.

De las pruebas serológicas empleadas, la prueba de tarjeta fue la que se consideró como base para identificar a los animales reactivos positivos, ya que además de poderse utilizar como prueba inicial de selección, detecta más rápido la infección que otras pruebas y es un método excelente para la selección de sueros a gran escala ( 2, 3, 4, 9, 11, 25, 36 ).

Los resultados obtenidos variaron en cada una de las pruebas serológicas. En la prueba de tarjeta, del total de muestras empleadas (93 que equivale al 100% del hato) un 30.1% (28 muestras) resultaron reactivos positivos, tomándose estas como base para realizar las demás técnicas (figura 1).

En la prueba de placa, del total de las muestras seropositivas es decir 28, se obtuvieron 25 muestras positivas; 23 en concentraciones máximas de 1:200 y 2 positivas en concentraciones de 1:100. Existiendo 3 muestras positivas en concentraciones de 1:50 como sospechosas (figura 2). La muestra

número 72 coincidió con las demás pruebas en su reacción seropositiva, sin embargo, fue demasiado alta en su concentración (1:200) comparada con los resultados de las demás pruebas.

En la prueba de fijación de complemento resultaron seropositivas con esta técnica 23 de las 28 muestras (como se observa en la figura 3) de las cuales 20 alcanzaron títulos máximos en concentraciones > 80.

La diferencia en el número de este resultado comparado con las demás pruebas se debe principalmente a la alta especificidad de esta técnica (1,9,26,32).

Al comparar esta prueba con las otras se observó que la muestra número 2 resultó en esta prueba con concentraciones mínimas dando un resultado negativo, no siendo igual con las otras pruebas en donde se obtuvieron resultados en concentraciones muy altas (1:200): Ello tal vez se deba a que la muestra no estaba en buenas condiciones o existió un error en la lectura (35,39), por lo que se reportó finalmente como sugerente a sospechosa debiéndose tomar la muestra nuevamente para determinar si es o no seropositiva.

En la prueba de lenta en tubo se utilizó el método decimal por considerarse el más práctico resultando todas las

muestras positivas con esta técnica : 24 con títulos de 1:200 y 4 con títulos positivos 1:100 (ver figura 4). Esto tal vez se deba a la alta concentración de anticuerpos presentes y a que la prueba detecta también IgM.

Respecto a la prueba de Mercaptoetanol se obtuvo una correlación estrecha con la prueba de lenta en tubo (como se esperaba) obteniéndose una menor concentración ya que la diferencia entre ambos títulos es la proporción de aglutinas IgM presentes en la muestra, pudiéndose así diferenciar la proporción de aglutinas vacunales (IgM) de procesos infecciosos (IgG); siendo 22 muestras positivas en concentraciones de 1:200, 3 positivas en concentraciones de 1:100; 2 sospechosas incompletas en concentraciones de (I) 1:100 y finalmente una positiva en concentraciones de 1:50 que se interpretó como sospechosa (ver figura 5).

En la prueba de Rivanol esta coincidió en su totalidad con la mayor parte de las pruebas (comparándose con las muestras) obteniéndose 23 positivas en concentraciones de 1:200, 2 positivas en concentraciones de 1:100, 1 positiva en 1:50 y 2 sin título (figura 6).

El resultado total se llevo a cabo relacionando el resultado parcial de cada prueba con las muestras en forma

Individual; tanto en la prueba de placa, lenta en tubo, mercaptoetanol y xivanol se utilizo el cuadro 2 de Interpretación de la prueba de placa y lenta en tubo en bovinos, coincidiendo las pruebas de concentración positiva 1:200 con las fijación de complemento dando un total de 23 seropositivas (figura 7).

El resto de las muestras que coincidieron con resultados N5 en fijación de complemento y que se dieron como sospechosos o positivos en las demás pruebas se descartaron dándose como negativos ya que la prueba de fijación de complemento ha demostrado ser más exacta que las demás (ya que detecta la IgG de tipo 1) y no detecta posibles anticuerpos vacunales (25,36).

Esta mala Interpretación en los resultados parciales de estas pruebas, se debe al desconocimiento en los registros de si los animales estaban o no vacunados; tomándose estos como si no lo estuvieran dando una Interpretación Incorrecta.

Finalmente la prueba de anillo en leche se realizó dos veces con la finalidad de evitar errores de interpretación no encontrándose variaciones de los resultados entre sí.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 7 CONCLUSIONES

En base a las diferentes pruebas realizadas en cada una de las muestras tomadas del hato de bovinos productores de leche de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, podemos concluir que de las 93 muestras que conforman el 100% del hato: 69 muestras (74.2%) resultaron negativas, una sospechosa (1.07%) y 23 (24.7%) serológicamente positivas. (figura 7)

Es por ello que debido a la elevada incidencia de animales seropositivos a brucelosis, así como a su alta concentración en títulos, es necesario seguir muestreando el hato para así llevar una secuencia objetiva del desarrollo de la enfermedad; no siendo necesario llevar a cabo todas las técnicas, para poder llegar a un acertado diagnóstico serológico.

Se sugiere utilizar la combinación de una técnica cualitativa con una cuantitativa (utilizando las técnicas más sensibles como la de fijación de complemento y tarjeta), así como la integración al programa de la Campaña Nacional de Brucelosis de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

## 8 RECOMENDACIONES

- 1.- Tener una identificación correcta y ordenada de los animales.
- 2.- Implementar el Programa Nacional contra la Brucelosis, con médicos acreditados dentro del mismo programa.
- 3.- Muestrear el hato cada 6 meses por lo menos y separar animales positivos de negativos, tratando de eliminar a estos últimos al término de la producción.
- 4.- Vacunar a todo el hato (excepto machos) con resultados seronegativos, así como becerras a partir de 4 meses de edad con dosis reducida cepa 19.
- 5.- Antes de iniciar la vacunación contar con un lote de vacuna bien constatada y seguir cuidadosamente la preservación de la cadena fría.
- 6.- Llevar a cabo la ejecución de un programa permanente de higiene, que puede contener entre otros puntos:
  - Utilización de vados sanitarios.
  - Control adecuado y estricto del personal, tanto como del que labora, así como del que se encuentra en contacto directo con estos animales.
  - Eliminación de roedores y otros vectores (ratas, perros, etc.)
  - Desinfección de instalaciones en general por lo menos cada 30 días y posterior al muestreo con soluciones como:  
Cloruro de Cal en concentraciones del 2 al 2.5% a una temperatura de 20 grados centígrados durante 1 hora. También se puede ocupar

La cal apagada al 10% a temperatura ambiente durante 3 horas (8).

-Mejoramiento en el manejo de la vaca parturienta y sobre todo en vacas abortadas o seropositivas, evitar el manejo a personal no autorizado.

-Utilizar métodos de esterilización de los productos lácteos (como pasteurización), así como todas las medidas que van encaminadas a evitar y reducir los riesgos de infección y diseminación de la enfermedad.

7.-Se sugiere así mismo la eliminación de animales seropositivos así como los que se vayan detectando, ya que la literatura menciona que si se emplea la vacuna en un programa donde se incluya el sacrificio de reactivos, el control de la enfermedad se logra a corto plazo. Es factible la aplicación de la vacunación en los hatos que existen animales reactivos y que no sean eliminados, sin embargo la erradicación en el hato ocurrirá más lentamente. En áreas de elevada prevalencia como en este caso se recomienda la revacunación anual (32).

## 9 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alton, G.G. y Jones, L.M.: *Las técnicas de laboratorio en la brucelosis*. Ed. Organización Mundial de la Salud. Serie de Monografías No. 55, 1969.
- 2.- Ayala, B.C.: y Estrada, C.A.: y Garrido, P.M.: *Manual de laboratorio. Curso de actualización de Inmunología veterinaria*. Ed. S.A.R.H. México, 1979.
- 3.- Blood, D.C.: y Henderson, J.A.: y Rodostits, O.M.: *Medicina veterinaria*. 5a. edición. Ed. Interamericana, México, 1985.
- 4.- Cabello, F.E.: y Cortes, N.A.: *Pruebas serológicas de rutina para el diagnóstico de brucelosis*. Dis. Grad. S.A. 1:1-26 (1970).
- 5.- Campero, C.M.: y Odeón, A.C.: *Respuesta serológica en terneras vacunadas con dosis reducida de Brucella abortus cepa 19* Veterinaria Argentina 3: 850-858 (1986).
- 6.- Campo, M.R. del: y Tamayo, R.: y Campo, C.H. del: *A serologic study of the progeny of a Brucella abortus seropositive cow*. Faculty of Veterinary Sciences Austral. Chile. 31. 1249-1251 (1989).

7.-Carpenter, L.P.: *Microbiología*. 4a. Edición. Ed. Interamericana. México, 1984.

8.- Carter, G.R.: *Bacteriología y micología veterinarias*. Ed. El Manual Moderno, México, 1985.

9.- Ciprian, C.A.: y Rodríguez, V.M.: *Diagnóstico Serológico de brucelosis y su Interpretación*. Brucelosis. 2o. Foro Nacional, México, 46 págs. Ed. S.A.R.H. (1988).

10.- Claro, M.A.: *Determinación de la incidencia de brucelosis en el ganado bovino lechero, en la región de Ixmiquilpan, Edo. de Hidalgo (Valle del Mezquital)*. Tesis de Licenciatura. F.E.S.C. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1988.

11.- *El Manual Merck de Veterinaria*, publicado por Merck & Co., Inc. 3a. Edición en español. Ed. Centaur. N.J. U.S.A., 1988.

12.-Esteban, V.E.: *Comentarios a los métodos de diagnóstico de las brucelosis animales*. Centro Nacional de Referencia de Brucelosis, Murcia, España. 1:157-182, (1982)

13.- Galton, G.: y Jones, L.M.: *laboratory techniques in*

brucellosis. Ed. World Health Organisation, F.A.O., Switzerland.  
1967.

14.- García, C.: y Carrillo.: Brucellosis in cattle sheep and goats. O.I.E. Technical Series. 6: 114-120. (1987).

15.- García, C.: La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Ed. O.I.E. France, 1990.

16.- Gibbons, W.J.: y Cattcot, E.J.. y Smithcors, J.M.: Medicina y cirugía de los bovinos. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1984.

17.- González, J.S.: y Palacio, E.: y Samartino, L.E: Brucelosis bovina: revacunación de hembras adultas serológicamente negativas con dosis reducida de Brucella abortus cepa 19 Veterinaria Argentina 4:342- 347. (1987).

18.- Jawetz, E.: y Melnick, L.J.: y Adelberg, E.: Manual de microbiología médica.. 12a. edición. Ed. Manual Moderno. México, 1987.

19.- Jubb, K.V.F.: and Kenedy, P.C.: Pathology of domestic animals. 2a. edition. Ed. Academic Press, U.S.A. 1970.

- 20.- Lennette, E.H.: y Balows, A.: y Hausler, W.J.: Manual de microbiología clínica. 4a. edición. Ed. México Panamericana. México, 1991.
- 21.- Lugo, F.C. de la : Manual de laboratorio de bacteriología médica. 4a. Edición. Ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México, 1983.
- 22.- Marmolejo, S.M.: Estudio serológico comparativo entre becerros de más de 6 meses de edad, vacunados con Brucella abortus cepa 19 con dosis reducida y becerros entre edades de 3 a 6 meses con dosis normal. Tesis de Licenciatura. F.E.S.C. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1985.
- 23.- Hedway, W.: y Prier, J.E.: y Wilkinson, J.: Patología clínica veterinaria Ed. U.T.H.E.A. México, 1986.
- 24.- Mercado, M.: Apuntes y aportaciones. México, 1992.
- 25.- Morilla, G.A.: y Bautista, R.C.: Manual de inmunología. Ed. Diana México, 1986.
- 26.- Nicoletti, P.: Diagnóstico de brucelosis, algunos problemas

y nuevos descubrimientos. Memorias del Foro nacional sobre Brucelosis. Ed. I.N.I.P. y E.N.E.P.-C. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1978.

27.- Manual of recommended diagnostic and requirements for biological products. Ed. Office International Des Epizooties. 2: 1-17. (1990).

28.- Olsen, R.G.: Inmunología e Inmunopatología de los animales domésticos. Ed. Manual Moderno. México. 1983.

29.- Pérez, J.A.: y Vasquez, M.J.: y Rodríguez, S.C.: Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinaria . 2a. edición, Ed. U.N.A.M. México, 1989.

30.- Pinochet, L.V.: y Avalos, P.P.: y Sánchez, M.L.: Palavicino, H.I.: y Vent, C.M.: Preparación y evaluación de un antígeno para descartar respuesta postvacunal a Brucella abortus cepa 19. Ed. Avances en Ciencias Veterinarias. U.N.A.M. 4:43-48. (1989).

31.- Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. Ed. B.I.V.E. México, 1992.

- 32.- Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. Material para actualización; técnica en brucelosis y tuberculosis bovina. Ed. S.A.R.H. México, 1990.
- 33.- Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. Ordenamientos legales en materia de sanidad animal. Ed. S.A.R.H. México, 1990.
- 34.- Ruiz, C.M.: Brucelosis. 3a. edición. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, 1986.
- 35.- Santamaría, O.G.: Diagnósticos falsos y vacunación en brucelosis. Avances en Medicina Veterinaria. U.N.A.M. 1:143:146. (1986).
- 36.- Scanlan, Ch.M.: Introducción a la bacteriología veterinaria. Ed. Acriba. Madrid, 1991.
- 37.- Tizard, I.: Inmunología veterinaria. 3a edición. Ed. Interamericana. México, 1990.
- 38.- Vega, F. L.: y García, H.M.: Bases esenciales de la salud pública. Ed. La Prensa Médica. México, 1986.

39.- Villa, S.J.: *Apuntes y aportaciones*, México, 1992.

40.- Villamil, G.P.: *Estudio comparativo de varios antígenos para el diagnóstico de brucelosis humana y diagnóstico de prevalencia de brucelosis humana en grupos de población general y población de alto riesgo. Tesis de Licenciatura. F.E.S.C. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1984.*