



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



56
2y

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN OVINOS Y SU
COMPORTAMIENTO CON DIFERENTES TECNICAS DIAGNOSTICAS,
EN SUEROS PAREADOS DE 200 OVEJAS CRIOLLAS DE LA REGION DE
APASCO, ESTADO DE MEXICO; BAJO UN SISTEMA DE EXPLOTACION
EXTENSIVA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
JUAN ANTONIO ROMERO MENA

ASESORES: DRA. AHIDE LOPEZ MERINO
DR. JORGE TORTORA PEREZ
MVZ. BLANCA MORENO CARDENTII

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
U. N. A. M.
DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLE TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

AT'NI 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:

"Seroprevalencia de tuberculosis en ovinos y en conejatos con diferentes técnicas diagnósticas, en sueros procedentes de 250 ovinos crías de la raza de Texaco, Estado de México, bajo un sistema de explotación extensiva."

que presenta el pasante: Juan Antonio Rosano Mora
con número de cuenta: 6758769-5 para obtener el TITULO de:
Médico veterinario zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN 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, Edo. de Méx., a 25 de Mayo de 1992.

PRESIDENTE M.C. Guillermo Criedo Hernández. *G. Criedo*
VOCAL Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez. *J. Tórtora*
SECRETARIO M.V. Blanca Novero Verdell. *B. Novero*
PRIMER SUPLENTE M.V. Raúl Guillillo Rodríguez. *R. Guillillo*
SEGUNDO SUPLENTE M.V. Rocio Silva Mendoza. *R. Silva*

A G R A D E C I M I E N T O

LE DOY GRACIAS A LA EVOLUCION POR SITUARME EN ESTE TIEMPO Y CAMINO, Y DARME LA OPORTUNIDAD DE PONER UN PEQUEÑO GRANO DE ARENA EN TRATAR DE COMPRENDER MAS EL MUNDO QUE NOS RODEA.

AGRADEZCO A LA COMUNIDAD DE APASCO EDO. DE MÉX. EN PRESTAR SUS ANIMALES PARA ESTE ESTUDIO ASÍ COMO LA EXPERIENCIA PROFESIONAL QUE ADQUIRÍ.

AGRADEZCO A TODAS LAS PERSONAS QUE ME APOYARON EN EL LABORATORIO DE BRUCELOSIS DEL INDRE, AL QBP ROBERTO MIGRANA POR SU APOYO INCONDICIONAL Y A LA DRA AHIDE LÓPEZ MERINO POR ASESORARME UN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

LE AGRADEZCO A LA FES-C, UNAM SU FORMACION PROFESIONAL Y EL APOYO DE LA MC. BLANCA MORENO CARDENTÍ, MVZ. MA.ANTONIA , MVZ. ARTURO TREJO, Y EN ESPECIAL AL DR. JORGE TÓRORA PERÉZ POR SU APOYO EN LA RECTA FINAL DE ESTE TRABAJO.

QUIERO AGRADECER EL APOYO QUE RECIBÍ DE LA FAMILIA MONDRAGÓN EN LA TERMINACION DE MIS ESTUDIOS PROFESIONALES.

QUIERO AGRADECER EL APOYO INCONDICIONAL QUE HE RECIBIDO DE MVZ. MARGARITA FIERRO SOLANO .

INDICE

RESUMEN	5
OBJETIVOS	6
INTRODUCCIÓN	7
A) Antecedentes Historicos de la Brucelosis en México.	
B) Historia de la Brucelosis en México.	9
C) Distribución y Frecuencia en México.	
1.- Situación de la brucelosis animal.	
a) Cuadro Clínico en animales.	13
1.- Vía de entrada.	
2.- Cuadro Sistémico.	
3.- Cuadro Reproductivo.	14
2.- Situación de la brucelosis humana.	15
a) Cuadro en el hombre	16
1.- Vía de entrada.	
2.- Cuadro clínico	17
D) Características del Género <i>Brucella</i> .	18
1) Metabolismo.	19
2) Morfología celular y epidemiología.	
3) Identificación y tipificación.	20
4) Tipificación de especies y variedades.	21
5) Patogénia.	23
6) Anatomía patológica.	24
7) Aspectos inmunológicos.	25
a.- Generalidades.	
b.- Estructura Antigenica.	26

c.-Reacciones Cruzadas.	27
d.-Factores de Virulencia.	28
E) Susceptibilidad por especie a brucellas lisas.	
1.- <u>Brucella abortus.</u>	
2.- <u>Brucella melitensis.</u>	29
3.- <u>Brucella suis.</u>	
F) Susceptibilidad por especie a brucella rugosas.	30
1.- <u>Brucella canis.</u>	
2.- <u>Brucella ovis.</u>	31
G) Diagnóstico.	
1.-Diagnóstico Bacteriológico.	32
2.-Diagnóstico Serológico.	
3.-Prueba de Coombs.	33
H) OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.	34
MATERIAL Y MÉTODOS.	36
1.-Características de los rebaños.	37
2.-Técnicas Utilizadas.	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
A.- RESULTADO DEL DIAGNOSTICO A CEPAS LISAS.	
1.-Cuadro No. 1.	
B.- RESULTADO DEL DIAGNOSTICO DE CEPAS RUGOSAS.	50
1.-Cuadro No. 2.	
2.-Cuadro No. 3. Resultados del diagnóstico de las cabras.	53
3.-Cuadro No. 4. Respuesta por rebaño y tipo de prueba.	55
INTRODUCCIÓN A LA CONCLUSIÓN GENERAL.	57
COMENTARIO Y RECOMENDACIÓN.	59
CONCLUSIONES.	62

ANEXOS.	64
Anexo No. 1	
1.-Descripción de las Técnicas Utilizadas.	
a)Pruebas cualitativas.	
1.- Prueba de Rosa de Bengala.	
2.- Prueba de Inmunodifusión en Gel.	65
b)Pruebas cuantitativas.	68
1.- Pruebas de aglutinación en tubo.	
2.- Pruebas de Aglutinación en Microplaca.	
Anexo No. 2	
a) Tablas del muestreo de Cabras rebaños 2 y 6.	72
Anexo No. 3	
a) Materiales.	74
BIBLIOGRAFÍA.	78
TABLAS DE RESULTADOS.	81

RESUMEN.

Se evaluó con diferentes técnicas serológicas, de aglutinación y precipitación, con diferentes antígenos del género *Brucella*, probando la cepa RB-51, la prevalencia de anticuerpos en siete rebaños de ovinos criollos de la población de Apasco Edo. de México.

De un total de 200 muestras pareadas con intervalos de 30 días, en los meses de marzo a julio de 1992.

En 4 de los 7 rebaños se detectaron anticuerpos contra brúcelas lisas, también en 4 se detectaron anticuerpos contra cepas rugosas y en 2 de estos rebaños, se detectó que fueron positivos los dos antígenos. Del total de las pruebas realizadas el 36.3% fue positivo a una prueba, el 24.2% fue positivo a dos pruebas, el 21.5% fue positivo en tres pruebas, el 6.3% fue positivo a cuatro pruebas y el 0.5% fue positivo a cinco pruebas, de un total de 191 muestras (Fred 1985, Daniels 1987).

OBJETIVOS

Evaluar con diferentes antígenos la respuesta a la enfermedad bacteriana causada por el género *Bruceella* en ovinos criollos bajo un sistema extensivo de explotación en la región de Apasco, Edo. de México.

INTRODUCCIÓN.

A) ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA BRUCELOSIS.

La brucelosis se conoce desde Hipócrates en el año 400 AC.

En los años de 1854-1856, durante la Guerra de Crimea, se observaron varios casos de fiebres prolongadas que no podían compararse con las enfermedades conocidas hasta la fecha. (Spink 1956, Acha 1986, Blood 1988, Ruiz 1986).

Marston (1861) hizo estudios clínicos y autopsias de pacientes con fiebre mediterránea remitente, presentando más tarde una descripción detallada de la enfermedad, la cual era similar a la que se estaba presentando en la Isla de Malta y la denominó "Fiebre gástrica remitente"(Spink 1956).

David Bruce (1887) aisló por primera vez al agente etiológico de la brucelosis a partir de bazo de soldados británicos que habitaban en Malta.

Más tarde aisló la bacteria de personas enfermas y demostró la virulencia del germen para el mono, le llamó *Micrococcus melitensis*,(Spink 1956).

En Dinamarca, Bang hacía estudios sobre la infección bovina "aborto contagioso", logrando aislar al agente etiológico, al cual se le llamó bacilo de Bang en 1897 (Spink 1956, Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

En 1897 la *Brucella abortus* fue aislada por Bang a partir de abortos en ganado vacuno (Spink 1956, Acha 1986, Blood 1988).

En 1897 Hughton presentó una monografía considerada como una de las contribuciones más importantes y completas sobre la materia.

En ese mismo año, Wright y Semple desarrollaron un método diagnóstico basado en la propiedad aglutinante del suero de los pacientes enfermos de brucelosis, sobre los cultivos de *Micrococcus melitensis*. (Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986, Spink 1956).

En 1905 Zammit descubrió aglutininas en el suero de las cabras; es seguido por el descubrimiento de Horrocks el cual aisló al mismo agente de la leche y orina de las cabras determinando que las cabras eran la fuente de infección y que ésta se llevaba a cabo a través de los variados productos lácteos que se expendían y consumían sin pasteurizar ni hervir y lo llamó *Micrococcus melitensis* (Spink 1956, Alton 1976, Acha 1986, Blood 1988).

En 1914, Traum aisló a la *Brucella suis*, cultivando órganos de fetos abortados por puercas. En 1917, Alice Evans establece que los tres microorganismos guardaban relación bacteriológica y serológica entre sí, por lo que se reconoce al género denominado *Brucella* (Spink 1956, Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

Fue hasta 1924 cuando Keffler demostró el primer caso de brucelosis humana producido por un germen del mismo género, pero diferente en sus características a *B. melitensis* (Spink 1956, Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

Después de veinte años en Estados Unidos, Schroeder y Cotton (1927), aislaron el bacilo de Bang de la leche de vacas aparentemente sanas y Mohler y Traum de las amígdalas de niños que se alimentaban con la leche de dichas vacas (Spink 1956, Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

En 1962, se incluye a *Brucella ovis* y en 1970 las especies *Brucella neotomae* y *Brucella canis* (Ferguson 1982).

B) HISTORIA DE LA BRUCELOSIS EN MÉXICO.

Las revisiones hechas por Villela y Silva demuestran que la brucelosis en México existe desde principios de siglo, se piensa que la enfermedad fue introducida al país a través de ganado infectado (Spink 1956, Ruiz 1986).

Desde principios del siglo, Carbajal (1906) había intentado aislar al germen de la sangre de los enfermos; sin embargo, fue Placeres (1921) quien aporta con pruebas serológicas y bacteriológicas la existencia de la *Brucella melitensis*, por lo que se le considera el primero en haber aislado el agente (Ruiz 1986).

Los primeros reportes formales de la incidencia de la infección humana aparecieron a finales de la década de los años treinta, como consecuencia de la inclusión de la Brucelosis en la lista de padecimientos transmisibles de aviso obligatorio (Ruiz 1986).

El resultado observado a corto plazo fue la intensificación de los estudios de Brucelosis en todo el territorio nacional; lo cual generó mucho material para análisis y discusión que se planteó en varias reuniones nacionales e internacionales (Primer Congreso Nacional de Fiebre de Malta 1939, Primera Reunión Interamericana de Brucelosis 1946).

Ruiz Castañeda, aportó elementos primordiales para el aislamiento, diagnóstico y tratamiento de la brucelosis humana. Además fundó el primer laboratorio de estudio e investigación en este padecimiento, el cual fue considerado por la Organización Mundial de la Salud por muchos años como Laboratorio Regional de Referencia. (Ruiz 1986).

En materia del control del padecimiento, son contadas las zonas donde se ha logrado algún avance tendiente al control y/o erradicación de la enfermedad en los animales, en otras, ni siquiera se conoce su magnitud. En cuanto al problema humano se nota un estancamiento e incluso en algunos casos, un retroceso en las acciones de profilaxis y control que resultan en el

surgimiento de nuevas áreas endémicas o en el mantenimiento de otras que datan desde principios del siglo (Coahuila, Chihuahua), Ruiz 1986).

Indiscutiblemente para poder avanzar en el control de esta zoonosis, se requiere del esfuerzo y participación coordinada y continua de todas aquellas instituciones involucradas con este padecimiento, siendo de vital importancia la herramienta diagnóstica para diferenciar los tipos de *Brucella* en los animales domésticos, para controlar a los posibles huéspedes (Ruiz 1986).

C) DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA EN MÉXICO.

1) Situación de la brucelosis animal.

México posee una ganadería variada, que se localiza en todo el territorio nacional (bovinos, caprinos, ovinos y porcinos, entre otras), que se distribuyen bajo diferentes tipos de sistemas de explotación (extensivo, semintensivo e intensivo (Pijoán 1986).

En el caso de los bovinos, la brucelosis sigue siendo un problema sanitario no resuelto, ya que es precisamente en el ganado estabulado donde se ha

registrado la mayor incidencia; en el año de 1987, la mayor frecuencia de brucelosis bovina se registró en los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y otras entidades del país donde es importante la concentración de ganado (Luna 1992).

En los estados como Nuevo León y Tamaulipas, se ha demostrado que la morbilidad de la infección fluctúa entre 10% a un 20% del potencial ganadero de estas entidades (bovinos y caprinos principalmente) (Díaz 1989).

Según informes de la Dirección de Salud Animal, la positividad registrada entre 1981 y 1987, fluctuó entre 4.4% y 11% para el ganado lechero (Luna 1992).

En el caso de las cabras, es considerada la enfermedad más relevante en el país por el gran número de casos humanos que genera; ya que el ganado caprino, principalmente está en manos de gente con bajos recursos económicos, por lo que la atención sanitaria en estos animales es escasa o nula. La explotación de estos animales se da en algunos casos dentro de sistemas controlados, que son las menos frecuentes (intensivas), como rebaños que se mueven en áreas amplias, o como parte integral de actividades pecuarias de traspato (extensivas), estas son más del 95% del hato del país (Pijoán 1986). Entre las entidades que poseen una concentración considerable de cabras, se tiene a Chihuahua, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y

Michoacán, que reportan la mayor frecuencia de brucelosis en humanos (Luna 1992).

En cuanto a la brucelosis en otras especies, no se cuenta con suficiente información para tener un análisis de la situación nacional.

A.- Cuadro Clínico en Animales:

1).- Vía de entrada:

La infección se adquiere por la ingestión de leche o productos lácteos contaminados, debido al contacto con fetos o animales infectados o vísceras de éstos, algunos autores sugieren que los insectos hematófagos pueden estar involucrados en la transmisión.

2).- Cuadro sistémico:

En los animales la infección se manifiesta por alteración en los nodos linfáticos, bazo, articulaciones, médula ósea, aparato genital y mamario. Los animales que llegan a parir y han sido infectados se pueden caracterizar por partos prematuros, con animales de bajo peso al nacimiento y, por lo tanto poco viables, lo que genera un aumento en los índices de mortalidad posparto (Acha 1986, Beer 1985, Blood 1988, Barron 1992, Quinn 1994).

En el cuadro agudo puede existir malestar general en el animal, inapetencia, fiebre y aborto. *Brucella ovis*, generalmente no produce aborto,

sin embargo, en Nueva Zelanda, si se ha reportado aborto por este agente, además puede generar cuadros de artritis, espondilitis, epididimitis y hasta un cuadro nervioso (Acha 1986, Pijoan 1986, Beer 1985, Blood 1988, Barron 1992, Quinn 1994).

3).- Cuadro Reproductivo:

Se caracteriza básicamente por la aparición de abortos que pueden ocurrir de manera explosiva, sobre todo en animales de primer parto; después puede generar una aparente inmunidad en ovinos y caprinos, los cuales no manifiestan ningún signo evidente después del aborto. (Hungles 1971, Beer 1985, Blood 1988, Barron 1992, Quinn 1994).

En hembras provoca abortos, en machos epididimitis pudiendo transmitir la infección por semen. (Alton 1976, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoan 1986, Blood 1988).

Los animales infectados presentan lesiones en tejido placentario, donde existe un carbohidrato llamado eritritol, que al parecer, capacita a la bacteria para crecer sin ser perjudicada, dentro de las células epiteliales del útero y otros órganos del aparato reproductor tanto de machos como de hembras, que forma parte de una molécula con aparente actividad de receptor para Brucella. (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoan 1986, Blood 1988).

2) Situación de la brucelosis humana.

Sin duda la repercusión de la enfermedad en el humano, se explica con facilidad si se considera que gran parte de la población vive en estrecho contacto con las especies domésticas transmisoras de la *Brucella*, ya que de éstas obtienen algún ingreso; generalmente se venden tanto leche como quesos elaborados con leche contaminada, lo cual contribuye a la infección de un considerable número de individuos (Ruiz 1986).

Al comparar los reportes para el período de 1950-1959 (6,991 casos) con el período 1977-1986 (23,983 casos) y con promedio anual de 2,398 se nota un incremento importante; cabe mencionar que el análisis de los años siguientes, 1987 y 1988, también presenta la misma tendencia ascendente (Ruiz 1986).

Algunas entidades federativas como Sonora, Durango, Sinaloa, Tamaulipas y Puebla que históricamente ocuparon lugares intermedios o finales, últimamente se encuentran en los primeros lugares. Sonora es un buen ejemplo de ellos en donde para 1980 se reportaron 93 casos y para 1986, 708 casos (Ruiz 1986).

Las muertes por esta causa se registraron en 29 entidades, los estados que no reportaron defunciones fueron: Baja California Sur, Quintana Roo y Campeche, que también son las que reportan menor morbilidad (Ruiz 1986).

Se da por hecho que hay un subregistro de casos de brucelosis, se calcula en proporción de 1 reportado por 8 sin reportar (Ruiz 1986).

A.- Cuadro Clínico en Humanos.

1).- Vía de entrada:

El modo de infección más eficiente tanto en hombres como en animales, es el contacto directo con las descargas del aborto que contienen grandes cantidades de brucelas vivas (alrededor de 1×10^{13} brucelas/g), las que fácilmente pueden entrar por vía conjuntiva, a través de piel maltratada o por pequeñas cortaduras o lesiones de éstas, por esta vía la dosis de brucelas requerida es menor que por la digestiva (Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986), siendo ésta la forma de infección más común en veterinarios, ordeñadores y trabajadores de rastro. También son fuentes de infección: vísceras, sangre y secreciones de animales enfermos. (Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

La vía digestiva es el modo de infección más frecuente debido al consumo de leche y sus derivados no pasteurizados, esto se debe a que en el campo no hay un control sanitario y la leche se bebe cruda. En las zonas urbanas ha disminuido el problema debido a que ya es poca la leche que se vende cruda o bronca directa de los establos, ya que estos tienden a

desaparecer. En este caso la bacteria penetra a través de la mucosa intestinal (Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

Otra de las formas de infección es la inhalación de productos de desecho provenientes de animales infectados, el polvo que se encuentra en los corrales, en la lana, etc. Las bacterias penetran por la mucosa del tracto respiratorio superior o pulmón (Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

En los laboratorios la infección se transmite por aerosoles cuando se trabaja con estas bacterias o bien por la inoculación accidental con jeringas contaminadas vivas o con algún otro material de laboratorio contaminado. Estas son las vías más comunes de infección en brucelosis (Acha 1986, Blood 1986, Ruiz 1986).

2).- Cuadro Clínico:

La brucelosis puede manifestarse por sensaciones de anorexia, astenia, malestar general, escalofríos, mialgias y artralgias difusas, estos síntomas aumentan gradualmente en intensidad hasta continuar en un cuadro francamente febril (Acha 1986, Blood 1988).

La intensidad, forma y duración de la fiebre es lo más importante de la infección brucelosa. En humanos se han identificado cinco formas clínicas de la brucelosis: aguda, crónica, intermitente, variable y continua; sin embargo cabe

mencionar que este cuadro es más frecuente y característico en la infección por Brucella melitensis. Existen casos con síntomas gastrointestinales o respiratorios que predominan desde el principio (Alton 1976, Acha 1986, Blood 1989, López 1991).

D) CARACTERÍSTICAS DEL GENERO BRUCELLA

Las bacterias del género *Brucella* son bacilos o cocobacilos pequeños, que miden de 0.5 a 0.7u de ancho y 0.6 a 1.5u de largo; son gram negativos, se presentan en forma aislada y raramente en pares, cadenas cortas o pequeños grupos; son bacterias inmóviles que no producen esporas ni poseen cápsula. (Alton 1976, Blood 1988, López 1992, Moreno 1991).

Las bacterias del género *Brucella* son microorganismos aeróbicos estrictos, crecen lentamente y requieren de medios complejos para el primo aislamiento; dentro de los que se recomiendan están: medio bifásico de Ruiz Castañeda al que se debe adicionar polianetol, sulfonato de sodio, agar soya triplicase, agar *Brucella* que contiene peptona o cualquier medio enriquecido con peptonas, triptonas o extractos de levadura (Alton 1976, Acha 1986, Blood 1988, Mac Faddin 1990, Moreno 1991, Barron 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

La temperatura óptima de desarrollo es de 37° C., con un intervalo de 16 a 40° C., el pH óptimo es de 6.6 - 7.4. Su cultivo puede ser positivo desde el tercer

día hasta la quinta semana, las colonias que aparecen en la superficie alcanzan a medir de 2 a 3 mm. (Allon 1976, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Cottral 1986, Blood 1988, Mac Faddin 1990, Barron 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

1) METABOLISMO

Las bacterias del género *Brucella* obtienen su energía a partir de procesos oxidativos, sus requerimientos nutricionales vitales para su crecimiento son: amino ácidos, biotina, nicotinamida, iones magnesio.

Los cultivos de la bacteria *Brucella* tienen poca capacidad para fermentar los carbohidratos, algunas especies son productoras de ácido sulfhídrico, no utilizan substrato como fuente de carbono, son catalasa y oxidasa positivas, la mayoría hidrolizan la urea; generalmente reducen los nitratos a nitritos (Allon 1976, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Blood 1988, Mac Faddin 1990, Barron 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

2) MORFOLOGÍA COLONIAL Y EPIDEMIOLOGÍA.

En agar TSA, las cepas lisas (S) (*Brucella abortus*, *B. mellitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*) producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidas y color ámbar, son brillantes, opalescentes y de color gris azulado (Mac Faddin 1990, Barron 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

Las cepas rugosas (R) (*Brucella canis* y *Brucella ovis*) producen colonias de mayor tamaño, consistencia y textura son menos opacas con superficie granular y color del blanco mate al amarillo café (Mac Faddin 1990, Barron 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

Las cepas mucoides (M) (variantes de ambos tipos), son similares a las (R) en color y opacidad con textura mucoide (Mac Faddin 1990, Barron 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

En gelosa sangre el crecimiento es semejante al observado en agar soya triplicase con ausencia de hemólisis, las cepas que crecen en Mc.Conkey no fermentan la lactosa. (Alton 1976, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Blood 1988, Mac Faddin 1990, Moreno 1991, Barron 1992, Warren 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

3) IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACION

A partir del aislamiento obtenido en los medios de cultivo enriquecidos, se procede a la siembra en tubos inclinados de agar brucella o TSA (Triptosa soya agar), para abasto de las cepas y posteriormente se siembra en: Medio de Triazúcar, para la determinación de ausencia de fermentación de azúcares, en ureasa de Christensen, para observar la producción de ureasa,

en medio de SIM, con ésta se observa la ausencia de movilidad y la ausencia de producción de indol.

En Citrato de Simons, para determinar la no utilización del citrato como fuente de carbono. Agar soya tripticase inclinado o agar brucella. Para explorar la producción de H₂S utilizando acetato de plomo como indicador (Alton 1976, Delgado 1987, Mac.Fadim 1990, López 1991, 1992).

4) TIPIFICACION DE ESPECIES Y VARIEDADES.

Actualmente se reconocen 6 especies y 16 biovares del género *Brucella*, que son: *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.neotomae*, *B. ovis* y *B.canis*.

Existen 16 diferentes biovariedades dentro de las especies, y éstas son:

Tres biovares de *B. melitensis*, nueve de *B. abortus* y cuatro de *B. suis* y sólo una especie de *B. canis*, *B. neotomae* y *B. ovis* (Alton 1976, Blood 1988, Mac.Fadim 1990, Barron 1992, Warren 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

Para la identificación de las especies y biovariedades del género *Brucella*, se toman en consideración las siguientes características:

Pruebas bioquímicas: Requerimiento de CO₂ para crecer, Producción de ácido sulfhídrico, Producción de urea.

Crecimiento en presencia de colorantes: Tionina 1:50 000

Fucsina básica 1:5000, Safranina 1: 10 000.

Aglutinación con suero monoespecífico, Suero monoespecífico A, Suero monoespecífico M, Suero monoespecífico R.

Susceptibilidad a sufrir lisis por diferentes bacteriófagos, Fago Tbilisi (Tb), Fago Weybridge (suis), Fago Berkeley (BK2), Fago Rough (R). (Alton 1976, Acha 1986, Blood 1989, Mac.Faddin 1990, Barron 1992, Warren 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

Los bacteriófagos, son organismos virales de escala biológica primitiva, que fagocitan bacterias como sustrato principal, para su mantenimiento. Existen diferentes bacteriófagos, con capacidad de causar lisis a cepas de *Brucella* y que son de gran utilidad particularmente, para la diferenciación de *B. abortus* (biovariedades 4 a la 9), de *B. melitensis* con la que suele confundirse cuando sólo se emplean pruebas bioquímicas y crecimiento en colorantes (Alton 1976, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Nicolet 1989, Mac. Faddin 1990, Barron 1992, Warren 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

Actualmente existen muchos bacteriófagos perfectamente clasificados y cuya actividad no se restringe a cepas en fase lisa, sino que los hay también para la fase rugosa (Alton 1976, Acha 1986, Nicolet 1989, Mac. Faddin 1990, Barron 1992, Warren 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

5) PATOGENIA.

La brucelosis es una enfermedad infecto contagiosa, generalmente de curso crónico en sujetos susceptibles.

Del sitio de entrada, los microorganismos pasan por vía linfática a los nodos linfáticos regionales, donde son destruidas algunas bacterias, otras alcanzan sangre periférica, en este sitio son fagocitadas, localizándose en órganos ricos en mononucleares(Cotttral 1986, Blood 1988, Mac. Faddin 1990, Barron 1992, Warren 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

En las vacuolas las bacterias se multiplican, luego los leucocitos se rompen liberando material antigénico que activa los mecanismos formadores de anticuerpos (IgG, IgA, IgM, IgE (sólo para el humano, así como sus respectivos isotipos). En el sistema fagocítico mononuclear permanecen por semanas, las células invadidas se agrupan y forman nódulos en donde aparecen células epiteliales rodeándose de linfocitos, formando lesiones granulomatosas con focos de necrosis central, las células pueden liberar muchas bacterias y desarrollar la sintomatología, si las bacterias no son eliminadas totalmente persiste la infección intracelular, donde no hay acción de los mecanismos de defensa, pueden liberar endotoxinas a la circulación, prolongando la sintomatología y pasar a un estado crónico. (Alton 1976, Tizat 1984, Carter 1985,

Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Barron 1992, Warren 1992, Daniel 1994, Quinn 1994).

6) ANATOMÍA PATOLÓGICA

Las especies más importantes en la patología humana son:

B. abortus que produce granulomas, donde pueden existir áreas de necrosis hialina. *B. melitensis* y *B. suis*, producen granulomas y abscesos supurativos que pueden drenar durante años, los granulomas se eliminan en meses dejando pequeñas fibrosis residuales, en brucelosis agudas, los granulomas se encuentran en biopsias de hígado, bazo, nodos linfáticos y médula ósea, en la brucelosis crónica hay formación de abscesos en órganos, en tejido subcutáneo, testículo, ovario, riñón y cerebro en el hombre y en los animales. (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, López 1991).

7) ASPECTOS INMUNOLOGICOS.

a) Generalidades.

La edad del animal, el estado nutricional e inmunológico y hasta la vía de entrada, determinan el desarrollo de la enfermedad. La inmunidad celular es una respuesta contra los patógenos intracelulares, los anticuerpos circulantes ayudan en el diagnóstico serológico pero no tienen importancia en la

protección, la inmunidad la proporcionan los macrófagos activados o sensibilizados por linfocitos "T" específicamente sensibilizados a las liposinas derivadas de ellos. (Alton 1976, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Delgado 1987, Blood 1988, Daniel 1994, Quinn 1994).

La inmunidad se adquiere después de la infección con *Brucella* o con la vacunación (Alton 1976, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Delgado 1987, Blood 1988, Daniel 1994, Quinn 1994).

La respuesta de anticuerpos a la infección, está caracterizada por la elevación inicial de anticuerpos IgM; conforme progresa la enfermedad, IgG aumenta e IgM disminuye; la presencia de IgG indica la presencia de enfermedad activa y pueden permanecer por mucho tiempo. La respuesta de IgA es más tardía y recientemente se reportó una respuesta de IgE con una cinética intermedia entre IgE e IgM sólo en el caso de los humanos. En la brucelosis experimental en ratones, se demostró que el suero hiperinmune o la fracción purificada de IgG total son protectores (Tizat 1984, Carter 1985, Lara 1985).

El empleo de anticuerpos monoclonales indica que además de la especificidad del anticuerpo protector, es determinante su isotipo, ya que no

todas las subclases de IgG confieren inmunidad. La IgG1 en bovinos e IgG2 en ratones tienen efecto protector; en cambio la IgG2 bovina e IgG1 murina no confieren inmunidad contra *Brucella* (Tizat 1984, Carter 1985, Lara 1985).

El anticuerpo protector es específico para la cadena "O" del LPS, aunque es posible, que también tengan especificidad para proteínas. No se ha establecido plenamente la forma en que funcionan estos anticuerpos, algunos resultados indican que deben de actuar en conjunción con linfocitos T, ya que se ha probado que transfiriendo de manera simultánea linfocitos T y suero de animales inmunes, hay una mejor protección a la infección (Tizat 1984, Carter 1985, Lara 1985, Delgado 1987).

b) Estructura antigénica:

Se encuentran dos antígenos de superficie en las cepas lisas; el A y el M, que son de valor en la diferenciación de biotipos de las diferentes especies. Estos determinantes antigénicos forman parte del complejo proteína-lipopolisacárido, de elevado peso molecular que es el principal aglutinógeno de las cepas lisas de *Brucella*; contiene determinantes antigénicos comunes a la mayoría de las cepas lisas. (Cuauhtecatl 1989, López 1991, Daniel 1994, Quinn 1994).

Es importante mencionar que algunas cepas de *Brucella abortus*, tienen como antígeno dominante, el A (biovariedades 1,2,3 y 6) o el antígeno M (biovariedades 4,5,8 y 9) o ambos (biovariedad 7) y por lo tanto no se puede concluir que una cepa que aglutina con anti-M (*melitensis*), necesariamente sea *Brucella melitensis* o *Brucella suis*; puede tener como antígeno dominante el A (biovariedades 1,2 y 3) o ambos (biovariedad 4)(López 1991).

B. melitensis puede tener como antígeno dominante el M (biovariedad 1), al antígeno A (biovariedad 2) o ambos (biovariedades)(López 1991).

c) Reacciones cruzadas.

Todas las cepas lisas de *Brucella* muestran una gran reactividad cruzada que se pone en manifiesto cuando se realizan pruebas de aglutinación. La razón de este comportamiento se debe al lipopolisacárido (LPS) que es el principal antígeno de superficie.

La presencia de una o varias moléculas de perosaemina en el LPS de cepas lisas de bacterias como: *E. coli* antígeno somático O:157, O:116, y O:117; *Salmonella* del grupo N de Kauffman/White, *Pseudomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* O:9 es la razón por la que se presentan

reacciones cruzadas con *Brucella*, así como algunas serovariedades de *Pasteurella* sp.. (Beer 1987, Nicolet 1989, López 1991, Daniel 1994, Quinn 1994).

d) Factores de virulencia.

El factor de virulencia es el lípido A (parte del LPS somático), la cual posee las mismas propiedades patogénicas que una endotoxina. La endotoxina la presentan únicamente las cepas lisas que son tóxicas probablemente debido a la composición de los ácidos grasos del lípido A y a la acción de una proteína asociada (Tizat 1984, Carter 1985, Nicolet 1989, Jawers 1994).

Otros factores de virulencia localizados en la pared celular desarrollan actividad antileucocitaria y le confieren protección contra el poder bactericida intracelular y hacen posible la supervivencia, así como la multiplicación en macrófagos y linfocitos (Tizat 1984, Carter 1985, Nicolet 1989, Barron 1992).

E) Susceptibilidad por especie a brucelas lisas.

1.- *Brucella abortus*.

En la infección por *Brucella abortus* en las novillas y vacas ésta crece lentamente en vivo, excepto en el primero y segundo mes grávido, después del 5to. mes de gestación, donde se acelera su multiplicación, debido al aumento de un azúcar alcohol llamada eritritol; esto sucede en la placenta, líquidos

fetales y corión. (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Nicolet 1989, Quinn 1994).

El aborto se presenta en el último tercio de gestación, sin embargo, las hembras infectadas pueden tener una cría normal o débil y eliminar la bacteria después del parto; en los machos, solo ocasionalmente se puede observar orquitis o epididimitis (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Nicolet 1989, Daniel 1994, Quinn 1994).

2.- *Brucella melitensis*.

Es la brucelosis clásica de cabras y borregos, se caracteriza por aborto muerte perinatal y nacimiento de corderos débiles, y es además la más patógena para el hombre. En las hembras preñadas, el feto puede sobrevivir a la infección y la principal consecuencia es una placentitis que interfiere con la nutrición, en el caso de aborto se presenta en el último tercio de gestación (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Blood 1988, Nicolet 1989, Quinn 1994).

3.- *Brucella suis*.

Se puede observar aborto desde el segundo tercio, tercer tercio de gestación y al nacimiento, los lechones pueden estar muertos o débiles, puede existir retención de placenta con lesiones granulomatosas y necrosis con la

consecuente infertilidad (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Nicolet 1989, Quinn 1994).

Los animales que abortan, llegan a eliminar bacterias hasta por dos años. En los machos, el cuadro es subclínico y lo único frecuente es la epididimitis (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Blood 1988, Nicolet 1989, Quinn 1994).

F) Susceptibilidad a *Brucellas* rugosas.

1.- *Brucella canis*.

En la infección por *Brucella canis*, los animales se encuentran afebriles, muestran linfadenitis, discospondilitis, uveítis generalizada, así como esplenitis (Acha 1986, Mascaro 1975, Pijoán 1986, Blood 1988, Quinn 1994).

El cuadro clínico en las hembras se caracteriza por aborto en el último tercio de gestación; es común la descarga vaginal prolongada al posparto así como la infertilidad (Tizat I. 1984, Carter G.W. 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Nicolet J. 1989).

En los machos hay orquitis, epididimitis, dermatitis escrotal e inflamación y atrofia unilateral testicular con infertilidad frecuente (Mascaro 1975, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Quinn 1994).

2.- *Brucella ovis*.

En ésta el cuadro es subclínico en hembras y, entre los machos, la infección es de manera horizontal por prácticas homosexuales; las lesiones principales que se observan son: orquitis, epididimitis, infertilidad y esterilidad. En las hembras es subclínica con placentitis y aborto ocasional (Mascaro 1975, Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Suarez 1988, Nicolet 1989, Quinn 1994).

G) DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la brucelosis es por medio del aislamiento del agente etiológico, pero solo se obtiene un 20% de cultivos positivos; por lo que es necesario recurrir a métodos indirectos, los cuales se basan en la demostración y cuantificación de los anticuerpos específicos, frente a los antígenos de *Brucella*, tomando en cuenta el cuadro clínico, los antecedentes ocupacionales, la ingestión de productos lácteos no pasteurizados y el apoyo de pruebas confirmatorias de laboratorio, llevan a un diagnóstico adecuado. (Acha 1986, Alton 1986, Blood 1989, López 1991, Pijoán 1986, Daniel 1994, Quinn 1994).

1.- Diagnóstico bacteriológico.

El aislamiento puede llevarse a cabo apartir de sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o biopsias de órganos como: hígado y bazo. En el caso de los animales el feto abortado se aísla de contenido abomasal, ombligo y la placenta, además de los mencionados (Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Suarez 1988, Nicolet 1989, Quinn 1994).

2.- Diagnóstico serológico:

El estudio del perfil de anticuerpos no sólo se ha usado para el diagnóstico, sino que también se ha propuesto su utilidad para determinar la fase de la enfermedad y para el seguimiento de la misma en humanos, en los animales se utiliza para la identificación de reactores positivos (Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Suarez 1988, Nicolet 1989, Quinn 1994).

En la fase aguda de la enfermedad, se observa un aumento en los niveles de IgM sin cantidades apreciables de IgG, la IgG se eleva a niveles altos y disminuye luego del tratamiento hasta valores no detectables, en tanto que la IgM persiste por años. Por ello se ha considerado a la IgG como un marcador de infección activa. (Allon 1976, Tizart 1984, Acha 1986, Cuahuecatl 1989, López 1991).

La metodología usada actualmente se basa en técnicas de aglutinación como la prueba de Rosa de Bengala, aglutinación estándar en tubo y en presencia de 2-Mercaptoetanol, la prueba de Coombs, método de fijación de complemento e inmunofluorescencia indirecta (Alton 1976, Carter 1985, Acha 1986, Cuauhtecatl 1989, López 1991).

Para el diagnóstico de brucelosis en los animales existe una gran variedad de pruebas serológicas, algunas de ellas son las mismas que se usan para el diagnóstico humano, además la prueba de anillo en leche (PAL), prueba que se aplica como vigilancia para descubrir hatos infectados y proceder al examen serológico y/o bacteriológico; esta prueba es muy confiable en *B. abortus* para vacas, mientras que no es confiable en cabras, por lo que se tiene que buscar más información de las técnicas más específicas para cada especie; (Alton 1976, Carter 1985, Acha 1986, López 1991).

3.- Prueba de Coombs.

Es importante mencionar esta prueba, aunque no se empleó en este ensayo para determinar anticuerpos incompletos no aglutinantes que se consideran importante en ovinos. En ésta los anticuerpos reaccionan pero no aglutinan, la aglutinación se logra por la adición posterior al anticuerpo

incompleto de anticuerpos producidos en otras especies (Allan 1976, Cottral 1986, López 1991, Quinn 1994).

Se ha recomendado para poner en manifiesto anticuerpos no aglutinantes de las clases IgG e IgA (López 1991, 1992).

H) OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

Existe poca información relacionada con la brucelosis de los ovinos, por esto, se considera importante hacer un sondeo serológico. Tomando en consideración que en la región se han reportado algunos casos de abortos y nacimientos de animales con bajo peso al nacimiento, que en la mayoría de los casos se atribuye a otras causas como: mala nutrición, edad de la madre, tipo de parto entre otras; pueden por lo tanto, generar la contaminación de otros animales. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que un animal débil puede ser fácilmente susceptible a la infección (Tizat 1984, Carter 1985, Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988, Nicolet 1989).

Por otra parte la importancia de los ovinos en la epidemiología de la brucelosis en México, en los modelos campesinos de producción animal es desconocida, dada la convivencia de varias especies en estos modelos, los ovinos podrían ser un importante reservorio del microorganismo.

Debe destacarse que las bacterias del género Brucella que son lisas pueden infectar a cualquier animal de sangre caliente, por lo que los ovinos pueden infectarse con brucelas lisas o rugosas. (Acha 1986, Pijoán 1986, Blood 1988).

MATERIAL Y MÉTODO .

En el presente trabajo se utilizaron 200 sueros pareados de ovinos criollos, procedentes de la población de Santa María Apasco el cual se localiza en la parte norte del Estado de México; limita al norte y al poniente con el Estado de Hidalgo, al sur con los Municipios de Huehuetoca y Tequisquiac, al oriente con los Municipios de Hueypoxtra y Tequisquiac y al poniente con Hidalgo.

Altitud.- 2179 m.s.n.m.m.

Latitud.- Se sitúa en 19 grados, 58'm, latitud oeste del meridiano de Greenwich.

Precipitación pluvial.- 600 mm.

Clima.- Templado semiseco.

Temperatura máxima.- 37.5° C, meses calurosos Mayo y Junio.

Temperatura mínima.- 3.60° C.

Temperatura media.- 16.30° C.

Lluvias.- Meses de julio, agosto y septiembre.

Vegetación .- Puede encontrar en la región árboles como; pirul, palma, alcanfor, mezquite, huisache; variedades frutales escasas: durazno, zaramora, uvas y tejocote.

Agricultura.- Los principales cultivos son: alfalfa, maíz, frijol, cebada, trigo, avena; verduras en muy poca escala, haba, col, quelite, rábanos y lechuga.

Ganadería.- Bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves, caballos y asnos.

Sistemas de explotación.- Básicamente extensivo con pastoreo y encierro nocturno.

Alimentación.- Pastizal nativo, esquilmos agrícolas y a veces algún grano (avena).

Alojamiento.- Rústico, con piedra y madera (huizache), con malla ciclónica y alambre.

Tiempo de pastoreo .- En promedio de 8 horas al día.

Vacunación .- No hay en la mayoría.

Desparasitación.- Una o dos veces por año y no en todas las explotaciones.

Trasquila.- Dos veces por año y en la actualidad una vez.

(INEGI, 1980,1989,1990).

1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS REBAÑOS TRABAJADOS:

Rebaño No. 1.

Total de borregos: 55, 39 hembras y 16 machos.

Características:

Orientación: ESTE-OESTE.

Alimentación: Estos animales pastorean de 6 a 8 hrs. diarias en repelos de uso común, predios la mayoría regados con aguas negras. En algunas ocasiones los animales se les proporciona algún esquimo (invierno).

Manejo sanitario: Se realiza una o dos desparasitaciones por año, los corderos son descolados con liga o con emasculador.

Instalaciones: Por la noche son encerrados en un corral de 16 m² de madera sin techo, tiene buena caída de agua y no cuenta con bebedero, ni comedero.

Los animales conviven con un burro, dos cerdos, cuatro perros y dos gatos.

Rebaño No. 2.

Total de borregos: 32, 25 hembras y 7 machos.

Características:

Orientación: ESTE-OESTE.

Alimentación: Estos animales pastorean de 6 a 8 hrs. diarias en repelos de uso común, muy desmontados y erosionados. En algunas ocasiones los animales se les proporciona algún esquimo (invierno).

Manejo sanitario: Se realiza una o dos desparasitaciones por año, los corderos son descolados con liga o con emasculador, en esta explotación había muchos problemas de piojos, sarnas y micosis.

Instalaciones: Por la noche son encerrados en un corral de 144 m² de madera con techo de láminas de cartón y de fierro, así como un área sin techo, no cuenta con bebedero, ni comedero.

Los animales convivían, con 16 cabras (8 machos y 8 hembras), los cuales fueron muestreados también.

Rebaño No. 3.

Total de borregos: 62, 47 hembras y 15 machos.

Características:

Orientación: NOROESTE, SUDOESTE.

Alimentación: Estos animales pastorean de 6 a 8 hrs. diarias en repelos de uso común, muy desmontados y erosionados. En algunas ocasiones los animales se les proporciona algún esquilmo en invierno.

Manejo sanitario: Se realiza una o dos desparasitaciones por año, los corderos son descolados con liga o con emasculador.

Instalaciones: Por la noche son encerrados en un corral de 38 m²

de mampostería con techo de 1.60 m de alto, toda la instalación, tiene mala caída de agua y no cuenta con bebedero, ni comedero, en época de lluvias se acumula demasiado el agua. Los animales conviven con cuatro perros.

Rebaño No. 4.

Total de borregos: 26, 22 hembras y 4 machos.

Características:

Orientación: ESTE-OESTE.

Alimentación: Estos animales pastorean de 4 a 6 hrs. diarias en repelos de uso común, predios la mayoría erosionados. En algunas ocasiones los animales se les proporciona algún esquileo (invierno).

Manejo sanitario: Se realiza una o dos desparasitaciones por año, los corderos son descolados con liga o emasculador, se les proporciona una aplicación vitamínica por año (A,D,E).

Instalaciones: Por la noche son encerrados en un corral de 18 m² de madera con techo parcial, tiene buena caída de agua y no cuenta con bebedero, ni comedero. Estos animales conviven con dos burros, cuatro perros y 46 aves (gallinas, patos y pavos).

Rebaño No. 5.

Total de borregos: 27, 23 hembras y 4 machos.

Características:

Orientación: ESTE-OESTE.

Alimentación: Estos animales pastorean de 4 a 6 hrs. diarias en repelos de uso común, predios la mayoría erosionados. En algunas ocasiones los animales se les proporciona algún esquilmo (invierno).

Manejo sanitario: Se realiza algunos años, una desparasitación por año.

Instalaciones: Por la noche son encerrados en un corral de piedra con ramas de huizache sin techo, de aproximadamente 22 m² tiene mala caída de agua y no cuenta con bebedero, ni comedero, se anega en época de lluvia. Estos animales conviven con dos perros y 16 aves (gallinas, patos y pavos).

Rebaño No. 6.

Total de borregos: 25, 24 hembras y un macho.

Características:

Orientación: NORESTE-SUROESTE.

Alimentación: Estos animales pastorean de 4 a 6 hrs. diarias en

repelos de uso común, predios la mayoría erosionados. En algunas ocasiones los animales se les proporciona algún esquilmo y dos veces por semana alfalfa. (invierno).

Manejo sanitario: Se realiza una o dos desparasitaciones por año.

Instalaciones: Por la noche son encerrados en un corral de 15 m² de madera con techo parcial de fierro, tiene buena caída de agua y no cuenta con bebedero, ni comedero.

Estos animales conviven con diez cabras hembras y dos machos cabríos (los cuales fueron muestreados).

Rebaño No. 7.

Total de borregos: 265, 186 hembras y 79 machos.

Características:

Orientación: NORTE, SUR.

Alimentación: Estos animales pastorean de 6 a 9 hrs. diarias en repelos de uso común, regados con aguas negras o predios la mayoría muy erosionados, de áreas federales. A los animales se les proporcionan esquilmo, rastrojo de maíz molido, alfalfa achicalada, con grano molido de maíz. (principalmente en invierno).

Manejo sanitario: Se realiza dos o tres desparasitaciones por año, los corderos son descolados con emasculador, se les proporciona dos aplicaciones vitamínicas por año (A,D,E). En este rebaño se ha usado toxoide, contra enterotoxemia (Clostridium perfringens, tipo C y D).

Instalaciones: Por la noche son encerrados en un corral de 200 m² de madera, la estructura del techo parcial de lámina de fierro 110 m², tiene buena caída de agua, cuenta con bebedero y comedero.

Estos animales conviven con seis vacas lecheras, cuatro becerros, dos burros, cuatro perros, dos caballos, dos cerdos y 60 aves (gallinas, patos y pavos).

Los animales se seleccionaron al azar y se aretaron, el sangrado se hizo por la mañana (en ayunas), con intervalos de 30 días. La muestra sanguínea se obtuvo de la vena yugular, realizando previa asepsia de la zona, utilizando una jeringa de 10 ml y una aguja del número 18, una vez extraída ésta, se colocó en tubos de ensayo con tapón, previamente esterilizados, se inclinaron de manera que la sangre tocara el borde del tapón y se esperó hasta que se formó el coágulo, el cual se extrajo de inmediato jalando el tapón en el que se quedó pegado el paquete celular, de esta forma se evitó la hemólisis.

Una vez obtenidas las muestras de suero se colocaron en

refrigeración, y posteriormente se almacenaron en congelación, hasta que se usaron.

2.- Las técnicas que se usaron para el diagnóstico de brucelosis fueron:

Técnica de Rosa de bengala (prueba de tarjeta). El antígeno se prepara con *Brucella abortus* cepa 99s., se tiñe con el colorante de rosa de bengala y debe de tener un pH de 3.5.

Técnica de aglutinación en microplaca con 2-Mercapto-etanol empleando antígeno de *B. melitensis* cepa M-16, y de *Brucella canis* RM 666.

Técnica estándar en tubo con concentraciones de 5 y 10% de cloruro de sodio con antígeno blanco de *B. abortus* cepa 99s, antígeno de *B. melitensis* cepa M-16.

Los antígenos anteriormente empleados fueron proporcionados por el laboratorio de Brucelosis del I.N.D.R.E.

Técnica de inmunodifusión en gel (con antígeno somático de *B. abortus* RB-51) (Schuring G.)

Los datos obtenidos se analizaron por bloques de cada uno de los rebaños y se sometieron a las pruebas de: Medidas de tendencia central, análisis de varianza y T de Student. (Daniels 1987)

Las técnicas serológicas se describen en el anexo 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se estudiaron ovinos de raza criolla, hembras en un 97% y un 3% de machos con un rango de edad de 1 a 4 años, en edad reproductiva seleccionados al azar. En el proceso de toma y envío de las muestras se perdió el 4.5% de los sueros. En condiciones de explotación extensiva y encierro nocturno, en pastoreo con áreas comunes de pastoreo en las que conviven con otras especies.

Del total de 191 muestras analizadas el 36.3% fue positivo a una prueba, el 24.2% fue positivo a dos pruebas, el 21.5% fue positivo en tres pruebas, el 6.3% fue positivo a cuatro pruebas y el 0.5% fue positivo a cinco pruebas.

A) RESULTADOS DEL DIAGNOSTICO A CEPAS LISAS DE BRUCELLA.

Al emplear el antígeno preparado con *Brucella abortus* no se obtuvo aglutinación en ninguna de las diluciones del total de las muestras de suero, tampoco con ninguna concentración de cloruro de sodio.

Con el Antígeno preparado con *Brucella mellitensis* se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en el:

Cuadro No. 1.

Títulos obtenidos por el método de aglutinación estándar empleando *Brucella melitensis* a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en dos muestreos sucesivos.

1er. Muestreo		Concentración 0.85% de NaCl.		Concentración 5% de NaCl.		Concentración 10% de NaCl.	
Títulos obtenidos en el primer muestreo.	No.		No.		No.		
	%		%		%		
Negativo.	180	94.24	145	75.92	154	80.63	
1/20	11	5.76	34	17.80	22	11.51	
1/40	0	0.00	7	3.66	13	6.81	
1/80	0	0.00	5	2.62	2	1.05	
1/160	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
Total de muestras positivas.	11		46		37		

2do. Muestreo

Títulos obtenidos en el segundo muestreo.	Concentración 0.85% de NaCl.		Concentración %5 de NaCl.		Concentración 10% de NaCl.	
	No.	%	No.	%	No.	%
Negativo.	175	91.62	121	63.35	136	71.20
1/20	15	7.85	38	19.90	15	7.85
1/40	1	0.52	18	9.42	28	14.66
1/80	0	0.00	14	7.33	12	6.28
1/160	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Total de muestras positivas.	16		70		55	

El cuadro uno, nos muestra que el cloruro de sodio ejerce aparentemente un efecto sobre la unión antígeno-anticuerpo. De tal forma que cuando se emplea a una concentración del 5%, se obtiene un número mayor de sueros positivos que no se incrementa cuando se aumenta la concentración de cloruro de sodio. Por lo que se puede considerar que es la concentración óptima para poner de manifiesto los anticuerpos de ovino anti *Brucella* en la prueba de aglutinación estándar.

Por otro lado se observó entre el primero y segundo muestreo que hay un incremento en el número de muestras positivas al usar cloruro de sodio al 5% de 46 en el primer muestreo a 70 en el segundo. Hubo 4 positivos más en la dilución 1:20, 11 positivos en la dilución 1:40 y 9 en la dilución 1:80; este incremento también se observa en otras concentraciones de cloruro de sodio

Con la técnica de 2-Mercapto-etanol y antígeno de *Brucella melitensis* se observó que sólo dos sueros presentaron títulos de 1:20 en muestreo No.2.

Presuntivamente se concluye que al emplear métodos de aglutinación en cepas lisas, se requiere añadir cloruro de sodio a mayor concentración que la

empleada en las pruebas para humanos. En base a lo anterior se observó que la prevalencia de anticuerpos se incrementó en un 26.12%, entre ambos muestreos.

En 1976, Eshaw examinó serológicamente ovejas que presentaron aborto y demostró que las ovejas presentaban en la prueba de aglutinación lenta, mucha fluctuación. A lo que Myers en 1972, demuestra que las fluctuaciones son debidas a la presencia de determinantes antigénicos que comparten las *Brucellas* lisas y rugosas, con antígenos poco puros (Referida por Suarez 1988)

A su vez, Allsup encontró que de algunos ovinos que habían abortado por causa de *B. abortus*, el 10% de las ovejas presentaron títulos superiores a 1:40, el resto fueron títulos de 1:10 ó 1:20 (Quin 1994).

El aumento de la afinidad de vida a la multivalencia, representa una ventaja considerable para las inmunoglobulinas, pues les confiere una afinidad más alta en la fijación del antígeno.

Esta multivalencia puede tener un significado en la estimulación antigénica de los receptores en células sensibles al antígeno, en particular con las IgM. Estos receptores de IgM de baja afinidad intrínseca, pueden unirse a un antígeno con alta afinidad funcional y estimular a la célula para que produzca

IgM de baja afinidad. Las células receptoras de IgG de alta afinidad intrínseca, pero parecidas funcionalmente, también pueden ser estimuladas antigénicamente, lo que explica la observación de que IgM tiene mas baja afinidad que IgG en el mismo suero. (Suarez 1988).

B) RESULTADO DEL DIAGNOSTICO DE CEPAS RUGOSAS DE BRUCELLA.

Por otro lado, se determinó la presencia de anticuerpos contra cepas rugosas en las muestras de suero con antígeno de *Brucella canis*. Cuadro No. 2.

REBAÑO	PRIMER MUESTREO		SEGUNDO MUESTREO	
	NEGATIVO	= ó >1:200	NEGATIVO	= ó >1:200
1	25	0	15	10
2	20	5	23	2
3	25	0	6	19
4	25	0	18	7
5	21	4	9	14
6	25	0	0	0
7	25	0	0	0

En el primer muestreo, en los rebaños 2 y 5, hubo un total de 9 animales positivos con títulos =>(igual o mayor) a 1:200, los cuales fueron también positivos eventualmente a pruebas con antígeno liso.

En el segundo muestreo, se observó que los rebaños 3, 4 y 5, presentaron animales positivos con títulos de => 1:200, de ellos sólo 27 fueron también positivos a pruebas con antígeno liso.

La seroconversión de estos rebaños se debe probablemente a que ya existían animales positivos en área ya que los animales conviven en pastoreo con otras especies animales, por lo que es común que se mezclen mientras pastorean o que cuando los animales paren contaminan las parcelas, se debe considerar que el primer muestreo se realizó en el inicio de la época de partos para los ovinos, época en la cual las cabras de la región, se encontraban en general ya con cría.

Al emplear la prueba de precipitación en gel, con un antígeno sonicado de la cepa de *B. abortus RB-51*, se encontraron pocos reactivos tanto en el primero como segundo muestreos, a diferencia de lo encontrado en las pruebas de aglutinación tanto con antígeno de *B. canis*, como con antígeno de *Brucella melitensis*.

Siendo positivos 63 casos a B. canis y 52 a RB-51, de los cuales 8 fueron positivos a las dos pruebas (Daniels 1987).

Lo importante a señalar es que estas dos pruebas a pesar de ser efectuadas con cepas rugosas, nos están midiendo diferente tipo de inmunoglobulinas, por un lado las inmunoglobulinas aglutinantes y por el otro Inmunoglobulinas precipitantes en todos sus isotipos.

La inmunodifusión en gel se recomienda para el diagnóstico de *B. ovis*; Myers en 1972, menciona que podrá ser lo suficientemente sensible, pero la presencia de bajos títulos de anticuerpos precipitantes muchas veces nos dan falsos positivos o falsos negativos.

Montoya en 1985, estudió la frecuencia de la Brucelosis caprina en una población abierta utilizando sólo antígenos de *Brucela melitensis*, encontrando que el 60% de los animales presentaba anticuerpos contra este antígeno (liso).

Cuadro No. 3.

Resultados de pruebas serológicas de cabras que convivían con los rebaños de borregos No. 2 y 6.

Pruebas con Antígeno liso.				Antígeno rugoso.	
	5%Nacl	10%Nacl	0.85Nacl	PLT <u>B.conis</u>	RB-51
Rebaño 2 con 14 animales	13	4	5	3	14
Rebaño 6 con 12 animales	8	3	0	2	14
Total de 26 animales	21	7	5	5	28

Rebaño 2.

Como se puede observar, 13 de los 14 sueros resultaron positivos a *B. melitensis* con 5% de cloruro de sodio, cuatro al mismo antígeno pero al 10% de cloruro de sodio, y sólo cinco resultaron positivos a la prueba estándar con el mismo antígeno. Sólo en dos casos resultaron positivos a estas tres pruebas con títulos moderados y cuatro a dos pruebas con títulos de altos a moderados.

En las pruebas de inmunodifusión en gel, todos los sueros resultaron positivos en la Prueba de aglutinación lenta en tubo con *Brucella canis*, sólo las muestras 8, 10 y 14 resultaron positivos.

Rebaño 6.

En este caso, ocho sueros resultaron positivos a *B. melitensis* al 5% de cloruro de sodio, tres sueros positivos al mismo antígeno, pero con 10% de cloruro de sodio y sólo en uno con la prueba estándar con el mismo antígeno.

En las pruebas de inmunodifusión en gel resultaron positivas todas las muestras.

En la prueba de aglutinación lenta en tubo, sólo las muestras cuatro, once y doce, no presentaron signología aparente. Es importante señalar que estos animales, en su mayoría hembras, el 70% del total ya habían parido, entre una y dos semanas anteriores al muestreo. El 14 del rebaño 2 y el 12 del rebaño

6, eran machos, presentaron anticuerpos contra estos antígenos, sin manifestar ningún cuadro aparente.

En general se puede decir que en los dos muestreos, los animales presentaron anticuerpos, observándose un incremento del primero al segundo.

Cuadro No.4.

Respuestas por rebaño y tipo de Prueba.

Rebaño	B.lisas		B. rugosas	
	1er. muestreo	2do. muestreo	1er. muestreo	2do. muestreo
1	-	-	-	+
2	+	+	+	+
3	-	+	+	+
4	+	+	-	+/-
5	-	-	+	+
6	+	+	-	-
7	-	-	-	-

Al examinar el cuadro anterior, se indica que cuatro de siete de los rebaños fueron serológicamente positivos a los antígenos lisos y también cuatro de los siete resultaron positivos a los antígenos rugosos, y dos de los siete resultaron positivos a ambos antígenos.

En el análisis de la Prueba de 'T' de Student, se comparó la confiabilidad entre las pruebas de aglutinación con antígenos lisos, el resultado fue de 4.56, para los antígenos rugosos de 4.02 de confianza. En la pruebas de precipitación con antígeno rugoso fue de 3.76 de confianza, las pruebas fueron mayores a 3.47 en los reactores positivos, por lo que la confiabilidad de las pruebas con antígenos lisos y rugosos es aceptable (Fred 1985, Daniels 1987).

C) INTRODUCCIÓN A LA CONCLUSIÓN GENERAL.

Es importante mencionar que en este estudio a diferencia de otros se incluyó animales que han sido observados por tres años y cuya historia reproductiva sólo reporta nacimiento de corderos débiles y con bajo peso al nacimiento que generan mortalidades del 12.5%.

Que generalmente no se le atribuía a infecciones por el género *Brucella*. Sin embargo, si se tenía el antecedente de que en estos rebaños existía un escaso manejo y en general cohabitaban y pastoreaban con otras especies bovinos, caprinos, cerdos y equinos (Moreno 1992).

De un total de 191 sueros muestreados, que presentaron títulos a los diferentes antígenos, el 70% resultaron con títulos de 1:20 a 1:80 a *B. melitensis*, en pruebas de aglutinación en la que se evidencia un reconocimiento de IgG, IgA e IgM a los antígenos de superficie (Daniels 1987, Fred 1985).

Es importante mencionar que algunos rebaños de borregos (el no.2 y el no.6), eran mixtos, conviviendo con cabras, las cuales fueron muestreadas y se obtuvieron los siguientes resultados:

La variación de los resultados de los muestreos puede principalmente atribuirse a que éstos se realizaron en la época de partos (Pijoán 1986).

En los rebaños muestreados no sólo hubo convivencia entre especies, sino que también debe de considerarse el pastoreo en terrenos comunales con otras especies (otros rumiantes, porcinos, caninos etc.), los resultados nos demuestran la necesidad de considerar a los ovinos, en estos modelos de producción, como una importante posibilidad de reservorio para el agente, en este caso la región debe considerarse como un solo rebaño.

El estudio demostró además una importante distribución de animales reactivos a brucelas rugosas (*B. ovis* y *B. canis*), lo que sugiere su presencia en los rebaños nacionales.

Se menciona que las especies lisas y rugosas de la bacteria, gracias a su gran capacidad de adaptación, esta capacitada para adaptarse a las condiciones adversas de que sea objeto, se ha observado que en pacientes humanos que se les sigue serológicamente, al someterse a tratamiento antibiótico, la bacteria trata de evadir al sistema inmunológico, en este afán comienza a ser positiva contra antígenos diferentes a los que resulto antes del tratamiento, esto nos indica su gran capacidad perpetuar su especie. (Información verbal mencionada por la Dra. Ahide López M.).

Los trabajos que se han realizado en la Facultad en los últimos 20 años, se han caracterizado por realizar las pruebas serológicas con antígenos rugosos o

lisos o algunos con un solo rugoso o con uno solo liso, y en poblaciones de animales en su mayoría machos o en hembras que fueros seleccionados previamente a la prueba.

COMENTARIOS Y RECOMENDACIONES.

Con la entrada de México al Tratado de Libre Comercio para América del Norte, tenemos como compromiso el control y la erradicación de diferentes enfermedades de tipo zoonótico, que repercuten directamente sobre las exportaciones no petroleras y son causa de diferentes disputas en las fronteras del país, por no llenar las características sanitarias que marcan las leyes estadounidenses y canadienses para la entrada de productos de origen animal de exportación.

Con estas expectativas el Gobierno Mexicano ha realizado diferentes tipos de convenios y reglamentación, para las transacciones comerciales que hace nuestro país con los vecinos del Norte, existiendo reglamentaciones zoonitarias al respecto.

Una de las enfermedades que contempla esta reglamentación, es la "BRUCELOSIS", enfermedad ampliamente distribuida en nuestro país, y es causa de condicionamiento para la entrada de productos cárnicos con nuestros socios comerciales.

Por esta razón, se debe idear en México un esquema de diagnóstico, control y erradicación del problema, en todas las especies de explotación comercial (bovinos, ovinos, cerdos y caprinos), con miras a incrementar las exportaciones al extranjero y con esto incrementar la entrada de divisas. Es importante señalar que es una tarea difícil, porque el control y la erradicación no se darán sin el apoyo de un buen diagnóstico, que sea confiable y adecuado para cada especie; además del beneficio económico al tener un costo menor la prueba se considera, que se tendrá que muestrear a grandes núcleos de animales. Además es importante tomar en cuenta a la especie ovina y caprina, en la epizootiología del problema, con la finalidad de que éstos sean integrados al programa de control y erradicación.

El diagnóstico serológico de la brucelosis debe realizarse en una primera fase con un criterio de rebaño, Posteriormente debe ser individual. Los mejores resultados se lograrán al aplicar varias pruebas diagnósticas que se deberán interpretar en conjuntos, estos conceptos son válidos, especialmente si se

considera que especies lisas y rugosas de la bacteria participan en la prevalencia de los cuadros clínicos.

Los trabajos realizados en ovinos con otras pruebas (ELISA, FC), nos evidencian que son muy sensibles, el inconveniente de éstas es que se deben tener controlados muchos parámetros y el costo es alto, por lo que las pruebas de aglutinación y precipitación resultan más fáciles y económicas para la realización masiva de estas pruebas, como tamices para evidenciar reactores positivos e invertir en éstos las pruebas más sensibles.

CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se pudo observar el papel tan importante que juegan los ovinos en el sero-reconocimiento a las brucelas, tanto lisas como rugosas, y su papel posible como reservorios o quizá como amplificadores para otras especies de *Brucella* distintas a las que ellos padecen.

También en el presente trabajo se observó que en el rebaño No. 7, con un grado de tecnificación mayor al de los demás, los animales no presentaron reactores positivos a las pruebas de aglutinación y precipitación, por lo que se puede decir que el aspecto sanitario determina la distribución de la infección.

Puesto que estamos en vísperas de iniciar la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis, en la que los ovinos no habían sido tomados en cuenta, es conveniente que estos sean integrados al diagnóstico y vacunación, y con esto hacer una campaña integral del problema.

**En este trabajo se propone que los rebaños de esta región, en especial los
bovinos están jugando un papel importante en la distribución de la
enfermedad.**

Anexo No. 1

1.- DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS.

a) PRUEBAS CUALITATIVAS:

1.- Prueba de rosa de bengala.

Técnica de Rosa de bengala (aglutinación directa), con antígeno de Bacillus abortus cepa 97s.

Se colocan 0.03 ml. de suero problema en una placa de vidrio, se le agrega una gota (0.03 ml) de antígeno de rosa de bengala se homogeneiza con un agitador de plástico y se lee la reacción en los primeros cuatro minutos de iniciada la prueba, considerando la relación tiempo/aglutinación. Esta prueba evidencia la presencia de anticuerpos aglutinantes de la clase IgM, IgG principalmente

(Baron 1992, Cottral 1986, Quinn 1994).

2.- Prueba de inmunodifusión en gel.

Esta prueba se realiza con la cepa RB-51, de Brucella abortus la cual se comporta inmunológicamente como una bacteria rugosa, la cual fue proporcionada por el Dr. G. Schuring, a través de la Dra. Ahide López Merino.

Características de crecimiento: Esta es una bacteria poco exigente en cuanto a nutrientes y crece muy bien en agar TSA con la presencia de CO² de un 10% a 12% o sin éste, y en un lapso de 24 a 36 hrs. se observa un crecimiento masivo de la bacteria.

Preparación del antígeno somático de *Brucella abortus* RB-51 (Sonicado), para la prueba de inmunodifusión en gel.

Procedimiento para la preparación del antígeno de RB-51 :

Se siembra una sola botella con agar TSA, con la cepa de referencia y se espera el crecimiento teniendo cuidado de que no esté contaminada, esta botella

servirá de semilla para reproducirla de manera masiva. Esto se logra lavando el contenido de la botella con solución salina fisiológica (20 ml) en condiciones de esterilidad.

El total del volúmen obtenido se divide entre el número de botellas a sembrar, tratando que el volúmen se distribuya en toda la superficie del agar. Una vez terminado el paso anterior se incuban en la estufa bacteriológica a 37° de 24 a 36 hrs, observando que el crecimiento sea homogéneo y libre de contaminantes. Para estar seguros de que el cultivo no está contaminado es necesario hacer un frotis y teñir con la tinción de Gram.

Se recoge el crecimiento con 20 ml de solución salina fisiológica procurando que se despegue el mayor número de colonias del agar y se van vaciando todos en una botella de centrifugación. Se hacen tres centrifugaciones a 6000 Rpm. y a temperatura de 7° C, decantando el sobrenadante y restituyendo el volumen por S.S.F. y resuspendiendo la pastilla hasta homogeneizar.

Una vez que se saca de la última centrifugación, se pone en un recipiente con hielo y se procede a sonicar.

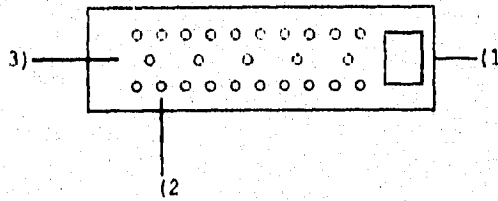
El sonicado se hace a 10 ciclos durante 30 seg, con pausas de un minuto y se centrifuga a 6000 Rpm. durante 30 min. en frío. Se filtra el sobrenadante con membranas de 22 micras de diámetro del poro y se determinan proteínas totales por el método de Pierce (determinación total de proteína). Una vez hecho ésta, se liofiliza, para su posterior uso (Alton 1976, Cottral 1986, Quinn 1994).

Preparación de los geles.

Se preparan los portaojetos lavándolos con etanol, con la finalidad de eliminar los residuos de grasa, se flamean al mechero embebidos en alcohol etílico de 96°. Se prepara una solución de agarosa tipo IV al 0.1% se mojan en ella, posteriormente se meten a la estufa para que se seque y quede adherida la agarosa.

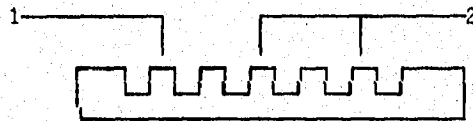
El procedimiento para la preparación del gel en que se correrá la prueba, consiste en hacer una solución de agarosa al 0.8%, con 0.1% de azida de sodio y 5% de una solución de boratos aforando con agua bidestilada, se horadaron de la siguiente manera:

Vista por encima.



- 1) Etiqueta de identificación.
- 2) Pozo para suero problema.
- 3) Pozo para el antígeno.

Vista de lado.



En los pozos se colocó, respectivamente en cada uno, dos aplicaciones de 3.5 microlitros tanto de suero, como de antígeno sonicado; se incubó en una cámara húmeda a 37° C por 24 hrs, la lectura de éstas se hizo con una lámpara de luz de día. Se observó la aparición de bandas de precipitación que son por la presencia de inmunoglobulinas específicas en las muestras.

b) PRUEBAS CUANTITATIVAS:

1.- Pruebas de aglutinación en tubo vs. antígenos rugosos de Brucella.

Los antígenos están suspendidos en soluciones de 2-mercaptoetanol, con antígeno blanco de *Brucella canis* cepa RM 666 (Alton 1976, Barron 1992, Cottral 1986, Quinn 1994).

Se tomaron cuatro tubos de ensayo de 13x100 en los cuales se colocan 20, 40 y 80 microlitros del suero problema y se aforó con solución salina fisiológica (0.85 de Cloruro de Sodio), hasta un mililitro, considerando el volumen de suero problema, posteriormente, se les agregó un mililitro del antígeno suspendido. (Alton 1976, Barron 1992, Cottral 1986, López 1992, Quinn 1994).

Se incubó durante 12 hrs. a 37° C y se observó si existió aglutinación.

2.- Pruebas de aglutinación en microplaca vs. Antígeno lisos de *B. melitensis*
Cepa M-16, y antígeno blanco de *B. abortus* cepa 99s.

Estas pruebas se realizaron en una placa de poliestireno que con fondo de "U". En esta técnica se utilizó solución salina al 5% y 10%, 2-mercaptoetanol, solución salina fenolada al 5% y antígeno de referencia (Bethelheimka 1989, Cuahutecatl 1989).

Se colocaron 20 microlitros de suero problema en el primer pozo y 180 microlitros de la solución de manera que se completaran 200 microlitros de suero-solución en el primer pozo. Con una micropipeta se homogeneizó la solución suero-solución. En los demás pozos sólo se pusieron 100 microlitros de la solución.

Del primer pozo se tomaron 100 microlitros, los cuales se pasaron al segundo pozo y se homogeneizaban, se volvía a tomar de ese pozo 100 microlitros y se pasaban al siguiente, realizando la misma operación y de la misma manera en los demás pozos, los 100 microlitros del último pozo se tiran.

Hecho esto, se le agregaron 100 microlitros del antígeno a cada uno de los pozos. (Bethelheimka 1989, Cuahutecatl 1989).

Se incubaron por 24 hrs. a 37°C y se leyó con una lámpara de luz de día por arriba, con un espejo de aumento por abajo y entre éstas dos se puso un soporte, el cual sustentaba a la placa de poliestireno que tenía las pruebas, observando una fina capa blanquesina en forma de red, en éstas se evidencia la presencia de IgM, IgG e IgA, todas estas aglutinantes (Bethelheimka 1989, Cuahutecatl 1989).

La solución de 2-Mercaptoetanol, es un agente reductor que disocia la cadena "J" del pentámero de la IgM y con esto le quita su capacidad aglutinante. De esta manera le da oportunidad a los anticuerpos de la clase IgG e IgA de aglutinar, puesto que son monómeros (Allon 1976, Barron 1992, Cottral 1986, Quinn 1994).

Anexo 2.
a) Rebaño 2.

	15%	10%	ESTANDAR	PLT/B.c.	RB-51
1	1:20				+
2	1:20				+
3	(-)	1:20	1:20		+
4	1:20				+
5	1:20				+
6	1:20				+
7	1:40	1:80			+
8	1:20		1:20	1:40	+
9	1:20		1:40		+
10	1:40	1:20	1:20	1:40	+
11	1:40				+
12	1:20				+
13	1:20				+
14	1:20	1:20	1:20	1:40	+

Rebaño 6.

	5%	10%	ESTANDAR	PLT/B:c	RB-51
1	1:20				+
2	1:20				+
3	1_40				+
4					+
5	1:40				+
6	1:40				+
7	1:80	1:40		1:80	+
8					+
9	1:20	1:20			+
10	1:20	1:20		1:80	+
11					+
12					+

Anexo No. 3.

MATERIAL

Para las pruebas de aglutinación se utilizaron:

Material:

Micropipeta automáticas (Pipetman) de 20, 200 y 1000 microlitros, de volumen variable con puntas de plástico inter-cambiables. Gilson.

24 Microplacas de poliestireno de fondo en "U", con 96 pozos.

35 Placas de aglutinación.

50 Asas de plástico.

400 Portaobjetos de vidrio.

3 Matraces volumétricos de 500 ml.

6 Matraces volumétricos de 50 ml.

25 Filtros millipore con poro de 0.22 mm.

1 Potenciómetro.

200 Tubos de ensaye transparentes de 8 por 100 mm. Pyrex.

1 Sonicador.

1 Espectrofotómetro.

40 Botellas Roux.

2 Embudo grandes de vidrio.

1 perforador para geles.

1 Balanza analítica.

1 Balanza granataria.

1 Centrifuga

REACTIVOS.

Agar triptosa-soya. Difco.

Agar brucella. Difco.

Agarosa:

Tipo II-A *

Tipo III-A $\overline{\text{A}}$ Difco.

Tipo IV-A *

Cloruro de sodio.

Ácido clorhídrico.

Fenol.

2-Mercapto etanol.

Agua destilada.

Azida de sodio.

Buffer de boratos.

S.S.F. 0.85% NaCl.

Solución salina al 10% y al 5% de concentración.

Glicerol

Biológicos:

- Antígenos de *Brucella abortus* cepa 99s, con el colorante de rosa de bengala
- Antígeno blanco cepa 99s.
- Antígeno de *B. canis* cepa RM-666.
- Antígeno de *B. melitensis* cepa M-16.

- Antígeno de *B. abortus* cepa RB-51.

Suero equino estéril.

Sueros controles positivos contra *B. abortus*, *B. meliensis*, *B. ovis*, *B. canis*, de referencia.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Acha P., Sifres, B.: Zoonosis y Enfermedades Trasmisibles Comunes en el Hombre y en los Animales , Segunda ed., Publicación Científica No. 503, U.S.A., 14-36, 112-120, 646-658, (1986).
- 2.- Allon, G.G., Jones L.M. y Priez, D.E.: Las técnicas de laboratorio en la Brucelosis, Organización Mundial de la Salud, 2a. ed., Ginebra (1976).
- 3.- Barron E. J., Sydney M.F.: Diagnostic Mycrobiology, Mosbi. Eght edifion, USA; 29:410-414, (1992).
- 4.- Beer J., Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos, Acribia, España; 17:142-165,(1990).
- 5.- Bethelheimka, W.J., Pearse J. Comparison of standard tube and microagglutination techniques for determining Brucella antibodies. J Hyg.,England; 90:33-39,(1989).
- 6.- Blood, D.C., Medicina Veterinaria, Infección por Brucellas, Interamericana, México D.F.; 662-680, (1988).
- 7.- Carter, G.W.,Bacteriología y Micología Verinaria, Manual Moderno, México D.F.; 132-234, (1985).
- 8.- Cuauhtecatl H.A., López M. A., Adaptación del método de aglutinación a microplaca para el serodlognóstico de brucelosis. Rev. Lat.Ame. Microbiología, México D.F.; 31: 181-185,(1989).
- 9.- Cottral G.E., Microbiología Veterinaria, Prensa Médica Mexicana, México D.F.; 30: 344-351,(1986).
- 10.- Daniels, W.W., Bioestadística, 3a. edición, Limusa, México D.F.; 202-204, (1987).
- 11.- Daniels P.S.,Abaa I.T., Inmunología Básica Clínica, Manual Moderno, México D.F.; 49: 759-760. (1993).

- 12.- Delgado G.D., Estructura y propiedades biológicas de algunos antígenos de Brucella, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN Tesis Predoctoral, México D.F.(1987).
- 13.- Díaz, A.E., Inmunidad conferida por la vacunación y revacunación con Rev-1 en dosis reducida en cabras adultas y evaluación de pruebas serológicas. Tesis de Maestría, UAEM-FES-C/UNAM, México D.F. (1989).
- 14.- Fred, B.D., Estadística básica, Trillas, México D.F., 2a. edición; 107-117,(1985).
- 15.- Hungles, K. L., Perinatal lamb mortality infection occurring among lamb's dying after parturition, Australian Veterinary Journal, Australia; 47:472-476 (1971).
- 16.- Jawers E., Microbiología Médica, Manual Moderno, México D.F.;19: 256-258. (1992).
- 17.- INEGI X Censo General de Población y Vivienda. Resumen General Abreviado (1984).
- 18.- INEGI. Clasificación Mexicana de Actividades y Productos (CMAP), Censos Económicos. México. pp VIII(1989).
- 19.- INEGI. San Luis Potosí: Resultados Definitivos, Datos por AGEB Urbana. XI Censo General de Población y Vivienda. México. pp VII-IX (1990).
- 20.- Lara S.J., Estudio de la Respuesta Inmunoceular y Humoral en Pacientes con Brucelosis. ENCB. IPN, México D.F.(1985).
- 21.- López,M. A., Epidemiología de la Brucelosis en la República Mexicana. Salud Fronteriza. Volumen VI (4): 5-9,(1991).
- 22.- López M.A., y col. Seroepidemiología de la Brucelosis en México. Salud Pública de México. Vol. 34 (2)(1992).
- 23.- López M.A. Brucelosis. Avances y Perspectivas. Publicación Técnica del INDRE. 6: 1-49,(1991).

- 24.- Luna M.J.E. y col. Estudio de la Brucelosis en Hatos Lecheros en una Zona Conurbada de la Ciudad de México. Vet. México. XXIII: 2 111-116,(1992).
- 25.- Mascaro, L.A.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos, Albatros, Argentina, 190-194 (1975).
- 26.- Mac Faddi, Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, Panamericana, 15,94,130,134,154,161,227,(1990).
- 27.- Moreno, M. A.; Introduccion a la Bacteriología Veterinaria, Acriba, España; 357,358.(1991).
- 28.- Montoya, P.J., Evaluación serologica contra algunas bacterias Gram(-), Tesis de Licenciatura, FES-C/UNAM, (1985).
- 29.- Nicolet, J. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria, Manual Moderno, México D.F.; 345- 367,(1984).
- 30.- Pijoán, P., Tórtora, J.: Principales Enfermedades de Ovinos y Caprinos, Coordinación de Posgrado de la F.E.S. Cuautlilán, U.N.A.M., México; 155-157, 174-177, 183-187, 345 (1986).
- 31.- Quin P.J., Carter M.E., Clinical Veterinary Microbiology, Limusa, USA; 24:261-269, (1994)
- 32.- Ruiz C.M. Brucelosis. Ediciones Científicas la Prensa Médica Mexicana S.A. 3a. edición, México D.F.(1986).
- 33.- Suarez, C., Pacheco G.A.: Caracterización de los Antígenos de Superficie de la Brucella ovis, Microbiología Veterinaria, División de Aplicaciones Pecuarias; 349-356 (1988).
- 34.- Spink, W.W., The Nature of Brucellosis, Univ. of Minesota, USA; 3-27,(1956).
- 35.- Tizart I., Inmunología Veterinaria, 2da. ed. Interamericana, Mexico, D.F.; 125-155 (1984).

36.- Warren E.L., Jowitz E., Microbiología e Inmunología, Manual Moderno, México D.F.; 20: 168-170, 521-522, (1992).

FECHA MUES	MUEST	RB	BM	BM	ME	EST	BR.	BR.	RB-51
	TREO			5%	10%		AB	CAN	SONIC
03/3/92	1	1	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	2	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	3	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	4	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	5	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	6	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	7	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	8	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	9	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	10	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	11	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	12	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	13	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	14	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	15	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	16	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	17	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	18	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	19	0	0	0	0	0	0	0

03/3/92	1	20	0	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	21	0	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	22	0	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	23	0	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	24	0	0	0	0	0	0	0	0
03/3/92	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	2	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	5	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	6	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	8	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	9	0	0	0	0	0.05	0	0.005	0
03/4/92	2	10	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	11	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	12	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	13	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	14	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	15	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	16	0	0	0	0	0	0	0	0

03/4/92	2	17	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	18	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	19	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/92	2	20	0	0	0	0	0	0	0	1
03/4/92	2	21	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	22	0	0	0	0	0	0	0.005	1
03/4/92	2	23	0	0	0	0	0	0	0	0
03/4/09	2	24	0	0	0	0	0	0	0.005	0
03/4/92	2	25	0	0	0	0	0	0	0	1
11/2/92	1	26	0	0.05	0.05	0	0.05	0	0	0
11/2/92	1	27	0	0	0.05	0	0	0	0	0
11/2/92	1	28	0	0.05	0.02	0	0	0	0.005	0
11/2/92	1	29	0	0.05	0.02	0	0.05	0	0.005	0
11/2/92	1	30	0	0.05	0.02	0	0	0	0	0
11/2/92	1	31	0	0.05	0.02	0	0	0	0	0
11/2/92	1	32	0	0.012	0.01	0	0	0	0	0
11/2/92	1	33	0	0.025	0.05	0	0	0	0	0
11/2/92	1	34	0	0.025	0.05	0	0.05	0	0	0
11/2/92	1	35	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/2/92	1	36	0	0.05	0.02	0	0.05	0	0	0
11/2/92	1	37	0	0.025	0.02	0	0	0	0	0
11/2/92	1	38	0	0.05	0.02	0	0	0	0	0

11/2/92	1	39	0	0.05	0.025	0	0	0	0	0
11/2/92	1	40	0	0.05	0.025	0	0	0	0	0
11/2/92	1	41	0	0.05	0.025	0	0	0	0	0
11/2/92	1	42	0	0.025	0.025	0	0	0	0	0
11/2/92	1	43	0	0.05	0.05	0	0	0	0.005	0
11/2/92	1	44	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/2/92	1	45	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/2/92	1	46	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/2/92	1	47	0	0.05	0.05	0.05	0	0	0.005	0
11/2/92	1	48	0	0.05	0.05	0	0	0	0.005	0
11/2/92	1	49	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/2/92	1	50	0	0.05	0.025	0.05	0	0	0	0
12/3/92	2	26	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
12/3/92	2	27	0	0.05	0.05	0	0	0	0	1
12/3/92	2	28	0	0.05	0.05	0	0	0	0.005	0
12/3/92	2	29	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
12/3/92	2	30	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	31	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	32	0	0	0	0	0	0	0	2
12/3/92	2	33	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	34	0	0	0	0	0	0	0.005	0
12/3/92	2	35	0	0	0	0	0	0	0	0

12/3/92	2	36	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	37	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	38	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	39	0	0.05	0	0	0.05	0	0	2
12/3/92	2	40	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	41	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	42	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	43	0	0	0	0	0	0	0	1
12/3/92	2	44	0	0.05	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	45	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	46	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	47	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	48	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	49	0	0	0	0	0	0	0	0
12/3/92	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	51	0	0	0	0	0	0	0	1
14/04/92	1	52	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/9	1	53	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	54	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	55	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	56	0	0	0	0	0	0	0	1
14/04/92	1	57	0	0	0	0	0	0	0	1

14/04/92	1	58	0	0	0	0	0	0	0	2
14/04/92	1	59	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	60	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	61	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	62	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	63	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	64	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	65	0	0	0	0	0	0	0	1
14/04/92	1	66	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	67	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	68	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	69	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	70	0	0	0	0	0	0	0	2
14/04/92	1	71	0	0	0	0	0	0	0	2
14/04/92	1	72	0	0	0	0	0	0	0	1
14/04/92	1	73	0	0	0	0	0	0	0	1
14/04/92	1	74	0	0	0	0	0	0	0	0
14/04/92	1	75	0	0	0	0	0	0	0	0
14/05/92	2	51	0	0.025	0.05	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	52	0	0.025	0.025	0	0.05	0	0.005	1
14/05/92	2	53	0	0.012	0.05	0	0.05	0	0.005	0
14/05/92	2	54	0	0.025	0.05	0	0	0	0.005	0

14/05/92	2	55	0	0	0	0	0	0	0	0
14/05/92	2	56	0	0.025	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	57	0	0	0	0	0.05	0	0.005	0
14/05/92	2	58	0	0.025	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	59	0	0.05	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	60	0	0.05	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	61	0	0.025	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	62	0	0.025	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	63	0	0.025	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	64	0	0.012	0.025	0	0.05	0	0.005	0
14/05/92	2	65	0	0.025	0.025	0	0.05	0	0.005	0
14/05/92	2	66	0	0.012	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	67	0	0.012	0.012	0	0	0	0	0
14/05/92	2	68	0	0.012	0.012	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	69	0	0.012	0.012	0	0	0	0.005	2
14/05/92	2	70	0	0.05	0.012	0	0	0	0.005	2
14/05/92	2	71	0	0.012	0.012	0	0	0	0	2
14/05/92	2	72	0	0.012	0.012	0	0	0	0.005	1
14/05/92	2	73	0	0.012	0.012	0	0	0	0.005	1
14/05/92	2	74	0	0.025	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	75	0	0.05	0.05	0	0	0	0.005	0
11/4/92	1	76	0	0	0.05	0	0	0	0	0

11/4/92	1	77	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/4/92	1	78	0	0.05	0.025	0	0.05	0	0	0
11/4/92	1	79	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	80	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/4/92	1	81	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/09	1	82	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	83	0	0	0.05	0	0	0	0	0
11/4/92	1	84	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/4/92	1	85	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	86	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	87	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	88	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	89	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	90	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	91	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	92	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	93	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	94	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	95	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	96	0	0	0	0	0	0	0	0
11/4/92	1	97	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
11/4/92	1	98	0	0	0	0	0	0	0	0

11/4/92	1	99	0	0.012	0.012	0	0.05	0	0	0
11/4/92	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0
14/05/92	2	76	0	0.05	0.025	0.05	0	0	0	0
14/05/92	2	77	0	0.05	0.025	0	0.05	0	0.005	0
14/05/92	2	78	0	0.05	0.025	0.05	0.05	0	0.005	0
14/05/92	2	79	0	0.05	0.012	0.05	0	0	0.005	0
14/05/92	2	80	0	0.05	0.012	0.05	0	0	0	0
14/05/92	2	81	0	0.05	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	82	0	0.05	0.012	0.05	0	0	0	0
14/05/92	2	83	0	0.05	0.025	0.05	0	0	0	0
14/05/92	2	84	0	0.05	0.025	0.05	0	0	0	0
14/05/92	2	85	0	0	0	0	0	0	0	0
14/05/92	2	86	0	0.05	0.025	0.05	0	0	0	0
14/05/92	2	87	0	0.05	0.025	0.05	0	0	0	0
14/05/92	2	88	0	0.05	0.025	0.05	0	0	0.005	0
14/05/92	2	89	0	0.012	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	90	0	0.012	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	91	0	0.025	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	92	0	0.025	0.025	0	0.05	0	0	0
14/05/92	2	93	0	0.05	0.025	0	0	0	0	0
14/05/92	2	94	0	0.05	0.025	0	0.05	0	0	0
14/05/92	2	95	0	0.025	0.025	0	0	0	0.005	0

14/05/92	2	96	0	0.05	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	97	0	0.05	0.025	0	0	0	0.005	0
14/05/92	2	98	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0
14/05/92	2	99	0	0.025	0.05	0	0	0	0	0
14/05/92	2	100	0	0.025	0.05	0	0	0	0	0
06/4/92	1	101	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	102	0	0	0	0	0	0	0	1
06/4/92	1	103	0	0	0	0	0	0	0.005	1
06/4/92	1	104	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	105	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	106	0	0	0	0	0	0	0	1
06/4/92	1	107	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	108	0	0	0	0	0	0	0	1
06/4/92	1	109	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/4/92	1	110	0	0	0	0	0	0	0.005	1
06/04/9	1	111	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	112	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	113	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	114	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	115	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	116	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	117	0	0	0	0	0	0	0	0

06/4/92	1	118	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	119	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/4/92	1	120	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	121	0	0	0	0	0	0	0	0
06/4/92	1	122	0	0	0	0	0	0	0	1
06/4/92	1	123	0	0	0	0	0	0	0	1
06/4/92	1	124	0	0	0	0	0	0	0	1
06/4/92	1	125	0	0	0	0	0	0	0	1
06/5/92	2	101	0	0	0	0	0	0	0.005	1
06/5/92	2	102	0	0	0	0	0	0	0.005	1
06/5/92	2	103	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	104	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	105	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	106	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	107	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	108	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	109	0	0.05	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	110	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	111	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	112	0	0	0	0	0	0	0.005	1
06/5/92	2	113	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	114	0	0	0	0	0	0	0.005	0

06/5/92	2	115	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	116	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	117	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	118	0	0	0	0	0	0	0.005	0
06/5/92	2	119	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	120	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	121	0	0	0	0	0	0	0.005	2
06/5/92	2	122	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	123	0	0	0	0	0	0	0	0
06/5/92	2	124	0	0	0	0	0	0	0.005	2
06/5/92	2	125	0	0	0	0	0	0	0	2
29/06/92	1	126	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	127	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	128	0	0	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	129	0	0.05	0.05	0	0.05	0	0	0
29/06/92	1	130	0	0	0	0	0.05	0	0	0
29/06/92	1	131	0	0	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	132	0	0	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	133	0	0	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	134	0	0	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	135	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	136	0	0.05	0.05	0	0.05	0	0	0

29/06/92	1	137	0	0.012	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	138	0	0.025	0.05	0	0.05	0	0	0
29/06/92	1	139	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	140	0	0	0.012	0	0	0	0	0
29/06/92	1	141	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	142	0	0.012	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	143	0	0.025	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	144	0	0	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	145	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	146	0	0.05	0.05	0	0	0.05	0	0
29/06/92	1	147	0	0	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	148	0	0.025	0	0	0	0	0	0
29/06/92	1	149	0	0.05	0	0	0.05	0	0	0
29/06/92	1	150	0	0	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	126	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	127	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	128	0	0	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	129	0	0.05	0.05	0	0.05	0	0	0
29/07/92	2	130	0	0	0	0	0.05	0	0	0
29/07/92	2	131	0	0	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	132	0	0	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	133	0	0	0	0	0	0	0	0

29/07/92	2	134	0	0	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	135	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	136	0	0.05	0.05	0	0.05	0	0	0
29/07/92	2	137	0	0.012	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	138	0	0.025	0.05	0	0.05	0	0	0
29/07/92	2	139	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	140	0	0.012	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	141	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	142	0	0.012	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	143	0	0.025	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	144	0	0	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	145	0	0.05	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	146	0	0.05	0.05	0	0	0.05	0	0
29/07/92	2	147	0	0	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	148	0	0.025	0	0	0	0	0	0
29/07/92	2	149	0	0.05	0	0	0.05	0	0	0
29/07/92	2	150	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	151	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	152	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	153	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	154	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	155	0	0	0	0	0	0	0	1

30/07/92	1	156	0	0	0	0	0	0	0	1
30/07/92	1	157	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	158	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	159	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	160	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	161	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	162	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	163	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	164	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	165	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	166	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	167	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	168	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	169	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	170	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	171	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	172	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	173	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	174	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	175	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	176	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	177	0	0	0	0	0	0	0	0

30/07/92	1	178	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	179	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	180	0	0	0	0	0	0	0	1
30/07/92	1	181	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	182	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	183	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	184	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	185	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	186	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	187	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	188	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	189	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	190	0	0	0	0	0	0	0	0
30/07/92	1	191	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	151	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	152	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	153	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	154	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	155	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	156	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	157	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	158	0	0	0	0	0	0	0	0

30/08/92	2	159	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	160	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	161	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	162	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	163	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	164	0	0	0	0	0	0	0	1
30/08/92	2	165	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	166	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	167	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	168	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	169	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	170	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	171	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	172	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	173	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	174	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	175	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	176	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	177	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	178	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	179	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	180	0	0	0	0	0	0	0	0

30/06/92	2	181	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	182	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	183	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	184	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	185	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	186	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	187	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	188	0	0	0	0	0	0	0	0
30/06/92	2	189	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	190	0	0	0	0	0	0	0	0
30/08/92	2	191	0	0	0	0	0	0	0	0

Las equivalencias de los títulos son:

$$1/20 = \alpha 0.05$$

$$1/40 = \alpha 0.025$$

$$1/80 = \alpha 0.012$$

$$1/200 = \alpha 0.005$$