



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EVALUACION SEROLOGICA Y BACTERIOLOGICA
DE UN HATO BOVINO CON PROBLEMAS DE
BRUCELOSIS REVACUNADO CON DOSIS
REDUCIDA DE CEPA 19 DE Brucella abortus.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

ABRAHAM APARICIO BAHENA

**ASESORES: DR. EFREN DIAZ APARICIO
O.F.B. LAURA HERNANDEZ ANDRADE
M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI

1997

**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

UNIDAD DE EXAMENES
PROFESIONALES
SECRETARIA DE EDUCACION
PUBLICA

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

SECRETARIA DE
EDUCACION PROFESIONALES

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con
brucelosis, resucitado con dosis reducidas de la cepa 19 de Brucella
abortus"

que presenta el pasante: Abraham Aparicio Salgado
con número de cuenta: 8808773-0 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"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 19 de Octubre de 1996

PRESIDENTE	<u>MVZ. Javier Hernández Belderrain</u>	
VOCAI.	<u>MVZ. Gilberto Ochoa Uribe</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Efraín Díaz Aparicio</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Susana García Vázquez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Raúl Rodillo Rodríguez</u>	

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

**POR SU AMOR Y SU APOYO PARA QUE YO PUDIERA LLEGAR HASTA
AQUÍ**

A MI FAMILIA

POR TODO LO QUE ME AYUDARON DE UNA U OTRA FORMA

A MIS AMIGOS

POR ESTAR CONMIGO EN LOS BUENOS Y MALOS RATOS

A LA FES-C

**POR SER LA INSTITUCION QUE ME FORMO COMO PROFECIONISTA
Y POR SER MI SEGUNDA CASA**

A DIOS

**POR DARME LA OPORTUNIDAD DE VIVIR ESTA VIDA, HACERLA
INTERESANTE Y DIVERTIRME EN ELLA**

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES

**ABRAHAM APARICIO
MARIA DE LOURDES BAHENA
POR SER SENCILLAMENTE MIS PADRES**

A MI HERMANA

**MARYSOL APARICIO BAHENA
POR ALEGRARME LA VIDA**

A LA FAMILIA APARICIO

POR EL APOYO QUE ME HAN BRINDADO EN TODO MOMENTO

A MIS ASESORES

**EFREN DÍAZ APARICIO
POR SUS CONOCIMIENTOS, SU AMISTAD Y LA AYUDA QUE ME HA DADO**

**LAURA HERNÁNDEZ ANDRADE
POR SU TIEMPO SU DEDICACIÓN, SU AYUDA Y POR SUPUESTO SU AMISTA**

**RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ
POR SU APOYO, SU AMISTAD Y POR HABERME INVITADO A TRABAJAR EN ESTE
PROYECTO**

A LOS TRES MUCHAS GRACIAS

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**POR ESTOS AÑOS EN LOS QUE PASE EN ELLA Y POR TODO LO QUE ME HA
ENSEÑADO.**

A EL CENID-MICROBIOLOGÍA

**Y A TODOS LOS QUE TRABAJAN EN EL POR HABERME RECIBIDO DURANTE EL
TIEMPO QUE DURO EL TRABAJO.**

**A TODAS QUELLAS PERSONAS QUE HICIERON POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTE
TRABAJO**

A TODOS GRACIAS

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	43
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La revacunación es una práctica reconocida por la Norma Oficial Mexicana Contra la Brucelosis, sin embargo no se conoce cual es la especificidad de las pruebas serodiagnósticas para poder llegar a diferenciar bovinos vacunados de infectados. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio serológico y bacteriológico de un hato bovino con problemas de brucelosis y que fue revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19, para conocer la especificidad de diversas pruebas serológicas. Se utilizó un hato con 72 vacas Holstein vacunadas con dosis normal de cepa 19 de *Brucella abortus* cuando tenían entre 3 y 6 meses de edad, y fueron revacunados en este trabajo con dosis reducida (3×10^9 U.F.C./ml) por vía subcutánea de la misma cepa, en edad adulta. Las vacas se muestrearon a los 0, 30, 60, 90, 180 y 270 días pos revacunación para realizares las siguientes pruebas serológicas: Tarjeta, Rivanol; Fijación del Complemento (F.C), Inmunodifusión Radial, ELISA Indirecto y ELISA Competitivo. Para el estudio bacteriológico se utilizaron muestras de leche y exudado vaginal cuando fue posible, obtenidas de los animales positivos a las pruebas serológicas, se sembraron en medio Farrel y se les realizaron las pruebas de identificación rutinaria así como dependencia de colorantes, aglutinación con antisueros monoespecificos y fagotipificación (Fagos Iz. Re. Wb y Tb) Durante los muestreos de los días 30, 60, 90 y 180 las pruebas de inmunodifusión radial y ELISA Competitivo presentaron valores altos en especificidad (100%) a diferencia de las demás pruebas que tienen especificidad muy baja. Las pruebas serológicas presentan los siguientes valores de especificidad a los 270 días. Tarjeta 77% F.C. 83% ELISA Indirecto y la Prueba de Rivanol 93%. De los 6 animales que dieron positivo a las pruebas de Inmunodifusión Radial y ELISA Competitivo durante los 270 días del muestreo se consiguió aislar *Brucella abortus* que se tipifico como biotipo 1. Se puede concluir que la revacunación es una herramienta útil en el control de la brucelosis bovina y que las pruebas de ELISA Competitivo e inmunodifusión radial son las mejores opciones para diferenciar animales vacunados de infectados en el caso de una revacunación.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa, ampliamente distribuida en el mundo. Este es uno de los padecimientos que con frecuencia son adquiridos por los humanos a través del contacto con animales o bien debido al consumo de alimentos procedentes de animales infectados

En México la infección por *Brucella abortus* está ampliamente diseminada, alcanzando una mayor prevalencia en el sureste, el centro y las regiones costeras. Los índices de prevalencia son menores en el norte del país, lo cual puede explicarse por las características ecológicas de aquellos lugares en donde los bajos índices de agostadero impide una elevada densidad de población bovina (ganado de carne), contrario a lo que ocurre en las zonas de alta prevalencia en donde la densidad de población es elevada propiciando la diseminación de la infección (10).

En la mayoría de los estados con mayor cantidad de ganado bovino lechero se ha encontrado una prevalencia del 5-6% (Censo de 1995 de la CONETB).

La brucelosis ocasiona severas pérdidas a la ganadería a consecuencia de los siguientes conceptos: abortos, infertilidad, esterilidad, muerte de terneros, disminución de mejoramiento genético, depreciación de los animales enfermos y retraso en el crecimiento (10).

Se emplean en general una vacuna para inmunizar el ganado bovino contra la brucelosis: la vacuna viva atenuada de *B. abortus* cepa 19, a dosis normal para vaquillas de 4-6 meses de edad y dosis reducida para vaquillas mayores de 6 meses y vacas adultas. La cepa 19 de *B. abortus* (B 19) es un agente inmunógeno que ha sido reconocido por más de 30 años, teniendo un amplio uso en muchos países incluyendo Estados Unidos y México (4).

Esta cepa es de baja patogenicidad y estable, de inmunogenicidad relativamente alta, y no se propaga de animal a animal. Esas características se han mantenido por la selección cuidadosa de los cultivos de siembra, por la preparación de una siembra original con las propiedades deseadas para la producción de una vacuna y por la conservación de éstas en forma liofilizada. Es indispensable la apropiada vigilancia en la elaboración y el empleo de esta vacuna para lograr que el producto tenga la estabilidad, inocuidad y eficacia que en general ha mostrado a lo largo de los años (2).

Las normas para la vacuna de *Brucella abortus* cepa 19 (viva, para uso veterinario) han sido descritas por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Patrones Biológicos; se dispone de un cultivo de siembra original satisfactorio para la preparación de la vacuna o de lotes de siembra. Se recomienda que en los países en los que más de un laboratorio prepara la vacuna de cepa 19, sea un laboratorio central el que obtenga y distribuya los cultivos de siembra originales y prepare cultivos de siembra liofilizados para su distribución a los demás laboratorios. Además, la vacuna fabricada por cada laboratorio debe ser probada por el laboratorio central antes de permitir su empleo (2).

La vacuna de cepa 19 puede producirse en un medio sólido o en un medio líquido, éste último para la preparación de lotes en gran escala (2).

La vacuna de *Brucella abortus* cepa 19 en su presentación de dosis clásica para vacunar becerros de 3 a 6 meses de edad, se ha elaborado en México desde 1951, sin embargo, su empleo no ha logrado arraigo en nuestra ganadería por razones no bien definidas, aún cuando los programas de la campaña nacional vigente señalan como obligatorio el vacunar con ella a todas las becerras de 3-6 meses de edad (11).

Su uso en adultos ha sido prohibido dado que existen problemas con los títulos de anticuerpos tan elevados que provocan aglutinación en pruebas diagnósticas, esto presenta dificultades al momento de diagnóstico de la brucelosis sin embargo, estos inconvenientes pueden ser minimizados utilizando la dosis reducida y empleando pruebas serológicas más específicas después de los 10 meses (4). En 1941 cuando fue introducida en los Estados Unidos la vacunación con cepa 19 la dosis estándar fue de 5×10^{10} Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.). A los inicios de 1981 algunos estados cambiaron a una dosis reducida estandarizándola de 3×10^8 a 3×10^9 U.F.C. y en 1985 se discontinuó, quedando de 3×10^9 a 1×10^9 , esto en E.U. (15). Los 3 objetivos que se buscan con la reducción de la dosis son:

- 1.- Reducir los títulos de anticuerpos pos-vacunales.
- 2.- Reducir posibles efectos secundarios pos-vacunales.
- 3.- Aumentar la edad de vacunación de 4 a 12 meses.

A pesar de esto uno de los problemas más importantes de la vacunación son los títulos de anticuerpos pos-vacunales, ya que esto dificulta el diagnóstico de ganado infectado. Las soluciones propuestas para el problema son las siguientes:

- 1.-Bajar la dosis (dosis reducida).
- 2.-Bajar la edad de vacunación.
- 3.-No vacunar becerras en áreas de baja incidencia.
- 4.-Desarrollar mejoras en las pruebas de diagnóstico (15)

La vacunación de ganado sexualmente maduro ha despertado cuestionamientos sobre la posibilidad de infección con cepa vacunal en ubre provocando títulos de anticuerpos inusuales en suero y leche. Los estudios realizados demuestran que un mínimo porcentaje de animales presentan infección en ubres tanto en la vacunación de vaquillas como en ganado adulto (22).

En los países en desarrollo donde existe imposibilidad de pagar indemnizaciones por la eliminación de bovinos reactivos a brucelosis, se presentan con frecuencia rebaños lecheros que muestran elevadas prevalencias de la enfermedad, las que llegan en muchos casos a tasas superiores del 20%. Estas prevalencias aparecen aún cuando se complan estrictamente las normas de vacunación tradicional (23). Esto obliga a buscar otros métodos alternativos para la protección del ganado contra una posible infección, una de estas alternativas es la revacunación.

La revacunación es una herramienta poco estudiada ya que no se sabe a ciencia cierta si ayuda o no al control de la brucelosis, sin embargo, en la cuenca lechera de Tizayuca Edo. de Hidalgo se tomó la decisión de revacunar a todo el ganado a los 9 meses siguientes de la vacunación, fueron apareciendo nuevas vacas infectadas pero a pesar de esto el problema se redujo considerablemente. Se optó entonces en 1983 por establecer un programa, fundamentado en vacunar becerras de 3 a 6 meses de edad con la vacuna estándar; todos estos animales serían revacunados con dosis reducida al entrar a su primer servicio de inseminación artificial. En ese año se sacrificaron 67 animales, lo que representa el 0.36% de la población. Para 1987 solamente se presentaron 5 casos de vacas reactivas, es importante señalar que esa cuenca está ubicada en una área enzootica para brucelosis (12).

A pesar de llevarse acabo estas prácticas y obtener buenos resultados falta más investigación para afirmar la ayuda que otorga la revacunación.

El procedimiento para el diagnóstico de cualquier enfermedad debe tener por lo menos las siguientes cualidades: ser de fácil ejecución , debe identificarse todos los animales reactivos y ser capaz de diferenciar entre animales infectados y vacunados.

Desafortunadamente no existe aún una técnica que reúna estas características. Probablemente la brucelosis cuenta con más pruebas de diagnóstico que ninguna otra enfermedad, sin embargo, la investigación orientada al desarrollo de nuevos procedimientos continua activamente. Las dificultades técnicas que ofrece el diagnóstico de esta enfermedad han creado la necesidad de desarrollar investigaciones con el afán de incrementar la eficiencia de las técnicas de laboratorio.

Las pruebas serológicas han constituido una importante herramienta en el diagnóstico de las enfermedades entre otros aspectos por la "rapidez" en que dan sus resultados como en su alta efectividad, las pruebas serológicas más utilizadas en el diagnóstico de brucelosis son

PRUEBA DE TARJETA.- Se fundamenta en la prueba de placa con antígeno acidificado, la cual consistía en una mezcla del antígeno de placa con tres diferentes ácidos: ácido acético glacial concentrado, ácido láctico concentrado y ácido tartárico al 60%; solo que tenia que ser preparado diariamente. Estos autores observaron que el pH de la prueba destruía la actividad de las aglutininas "no específicas" sin afectar las "específicas". Es la prueba de rutina para diagnosticar brucelosis, es rápida, sencilla, sólo se necesita el suero y un test comercial para realizarla; solamente es cualitativa y puede dar muchos falsos positivos (6).

PRUEBA DE RIVANOL.- Esta prueba fue desarrollada por Anderson (1964), y se basa en que el rivanol (que es un colorante de acridina) tiene la habilidad de precipitar las proteínas del suero de bovino, entre ellas las aglutininas "no específicas". Mediante el uso de cantidades iguales de suero y una solución al 1% de rivanol, queda un precipitado y un sobrenadante : de este sobrenadante se detectan exclusivamente las IgG. Sin embargo, para que la prueba pueda ser efectiva se emplea un antígeno de *Brucella abortus* especial, que es altamente sensible, con el fin de compensar el efecto de la dilución de los anticuerpos. Es una

prueba complementaria a la prueba de tarjeta, es de tipo cuantitativa, sin embargo, puede llegar a dar resultados falsos positivos y negativos (6).

PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL.- Esta prueba ha sido evaluada en el ganado bovino y, en menor medida en el ovino y caprino. En bovino, la prueba presenta una alta especificidad para diferenciar animales con infección demostrada por aislamiento bacteriológico de los vacunados con cepa 19. En el caso más desfavorable, que se da en la vacunación de adultos con la cepa 19, su especificidad es del 80%, superior al 66% de la Fijación de Complemento. Sin embargo, como ocurre con la Fijación de Complemento, la Inmunodifusión radial puede ser positiva en bovinos vacunados en la edad adulta o en estado de gestación, cuando se establece una infección permanente en las ubres por la cepa vacunal. El 76.5% de los animales que eliminan vacuna B-19 por la leche, contienen anticuerpos en la sangre. Esta prueba ha sido aplicada al diagnóstico de la brucelosis bovina dentro de programas de control con buenos resultados (7).

PRUEBA DE ELISA INDIRECTO - En esta prueba se ha encontrado que el ELISA indirecto (ELISA-I) usando como antígeno el lipopolisacárido es tan sensible como las pruebas de Tarjeta y Fijación de Complemento para el diagnóstico de la infección por *B.abortus*. Además, al analizar sueros con esta prueba, el ELISA ha resultado más específico para la diferenciación entre vacunados e infectados. En el caso de los animales adultos, el ELISA ha sido tan específico como la Inmunodifusión Radial y más específico que las pruebas de Tarjeta y Fijación de Complemento, aunque tampoco diferencia totalmente vacunados de infectados (7).

En el caso del antígeno no solo se ha empleado lipopolisacárido, se han empleado células completas e incluso cadena-o separada del lipopolisacárido (7).

PRUEBA DE ELISA COMPETITIVO.- Esta prueba se basa en el uso de la cadena "o" del lipopolisacárido de *B. abortus* como antígeno, conjugado con una poli-L-lisina para darle fijación en una placa de poliestireno, y la utilización de anticuerpos monoclonales para que compitan en contra de los anticuerpos séricos (20). Es altamente específica ya que se ha evaluado comparándolo con las pruebas de rutina en el diagnóstico de la brucelosis (tarjeta, rivanol, fijación del complemento), esta tiene un alto grado de selección entre animales infectados y animales vacunados, las investigaciones recientes demuestran que tiende a diferenciar el 100% de los animales infectados y es una herramienta muy útil cuando se trata de diferenciar animales que han sido vacunados con dosis reducida en edad adulta, sin embargo, cuando los animales han recibido más de una vacunación con dosis reducida esta prueba pierde su capacidad de diferenciar animales (1).

PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO - El empleo de la prueba de Fijación de Complemento (F.C.) está muy generalizado para el diagnóstico de la brucelosis en la vaca, oveja y cabra, ofrece especial interés para distinguir las reacciones serológicas consecutivas a la vacunación con vacunas vivas y las producidas por infección natural (2). Los resultados en esta prueba son , más confiables considerándola como una prueba de alta sensibilidad y especificidad, ya que las reacciones con antígeno, heterólogo son menores y los anticuerpos pos-vacunación fijadores del complemento desaparecen más rápido que los anticuerpos aglutinantes (26). La técnica más común para la F.C. se basa en la fijación en frío de 0 a 4 °C durante 14 a 18 h. Este método es plenamente satisfactorio para investigar la brucelosis en sueros humanos, pero en los casos de brucelosis bovina muchos laboratorios prefieren recurrir a la fijación en caliente durante un periodo más corto, generalmente de media hora a 37 °C.

Varios factores influyen en la elección del método:

1. En general, se considera más práctico el empleo del método de fijación en caliente.
2. La actividad anticomplementaria de los sueros bovinos, ovinos y caprinos es mayor que de los sueros humanos, pero cuando se emplea el método de fijación en caliente, los sueros de esos animales pueden inactivarse perfectamente calentando a 58 °C, mientras que para la fijación en frío deben calentarse previamente al menos hasta 60 °C.
3. Con la fijación en frío se obtienen títulos más altos.

4. Con la fijación en caliente se producen con frecuencia fenómenos de prozona, a veces en título elevado, que dificultan la adaptación del sistema a un método de trabajo con uno o dos tubos. En la fijación en frío, las prozonas son menos evidentes (2).

CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Brucella*

El género *Brucella* está constituido por seis especies de las cuales *Brucella abortus* es la más común en ganado bovino. Estas son bacterias Gram negativas que miden 0.5 a 0.7 μ , de forma coccobacilar, no son móviles, ni forman esporas, son negativas a la reacción de la catalasa y positivas a la oxidasa. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y el pH de 6.8, son microorganismos aerobios estrictos, algunas de las especies y/o biotipos necesitan una atmósfera enriquecida con CO₂ (5-10%) y la adición de suero estéril de ternera al medio de cultivo para su crecimiento, sobre todo si se trata de aislamientos primarios (28). Estos biotipos son una subdivisión de las diferentes especies de brucelas a las cuales se les designa un número, en el caso de *Brucella abortus* se han descubierto hasta hoy los biotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (2) de los cuales ha reportado en América hasta 1985 los biotipos 1, 2, 3, 4, 6 y 9 y en nuestro país el 1 y el 4 principalmente (14). Esto es importante para los estudios epidemiológicos que se realizan en México los cuales demuestran que el biotipo más importante por la frecuencia con que se ha reportado es el 1 (18).

El diagnóstico bacteriológico es más seguro pero tardado, en el se aísla el microorganismo a partir de muestras obtenidas de animales que han resultado positivos en las pruebas serológicas. Se utiliza un medio selectivo para el primoaislamiento y posteriormente se puede cultivar en agar tripticosa soya. El medio selectivo más utilizado para el aislamiento de *Brucella* es el medio Farrell creado en 1974 y es recomendado para el aislamiento de *Brucella* a partir de muestras que pudieran estar contaminadas (leche, placenta, semen y secreciones vaginales) este medio contiene:

- 1.- Base de agar *Brucella*.
- 2.- Suero de ternera estéril al 5%.
- 3.- Suplemento selectivo (Oxoid SR083A) conteniendo antibióticos y agentes antimicrobianos como:

- a) Bacitracina 25 mil Unidades Internacionales/ml.
- b) Polimixina B 5 mil Unidades Internacionales/ml.
- c) Cyclohexamida 100 µg/ml.
- d) Vancomicina 20 µg/ml.
- e) Ácido nalidixico 5 µg/ml.
- f) Nistatina 100 mil Unidades Internacionales/ml. (2).

Otros medios de cultivo específicos para el aislamiento de *Brucella* son:

1. Medio líquido de Brodie y Sintons.- Este medio es usado proporcionar nutrientes a las bacterias cuando tratamos de aislarlas de muestras contaminadas, en general contiene lo mismo que el medio Farrell solo que aquí su base es de caldo tripticosa soya.

2.- Medio Ruiz Castañeda.- Es un medio desarrollado en 1974 para tratar de aislar *Brucella* spp. de muestras de sangre y otros líquidos; consiste en botellas pequeñas selladas conteniendo medio de cultivo, estas son inoculadas con la sangre u otro líquido en el que se quiera intentar el aislamiento. Este método no es recomendable para utilizarse en material contaminado.

3. Medio modificado de Vancomicina-Colsteina-Nistatina.- Este medio fue desarrollado en 1971 e incorpora estos antibióticos en su fórmula es utilizado para el aislamiento de *Brucella ovis* a partir de muestras de semen, también puede ser utilizado para el aislamiento de *Brucella canis* y otras especies de *Brucella*. Es menos selectivo que otros medios de cultivo y es recomendado para el aislamiento de cepas de *Brucella* fastidiosas o sensibles a los antibióticos (2).

Hay métodos de tinción que permiten poner de relieve a las brucellas pueden hacerse en frotis de membranas fetales, contenido gástrico de fetos, exudado vaginal semen de camero etc. Los resultados positivos y negativos pueden confirmarse a mediante cultivo. En general, se utilizan dos métodos:

Método de Ziehl-Neelsen modificado.

- 1.- Secar y fijar el frotis a la flama.
 - 2.- Teñir durante 10 minutos con una dilución al 1:10 de la solución madre de fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen (solución madre: disolver 1g de fucsina básica en 10 ml de alcohol absoluto y agregar 90 ml de solución de fenol al 5%).
 - 3.- Lavar con agua corriente.
 - 4.- Decolorar con ácido acético al 0.5% durante 30 segundos como máximo.
 - 5.- Lavar con cuidadosamente.
 - 6.- Recolorar ligeramente (20 segundos) con azul de metileno al 1%.
- Las brucellas aparecen teñidas de rojo sobre fondo azul (2).

Método de Köster modificado.

- 1.- Secar y fijar el frotis en la flama.
 - 2.- Teñir durante 1 minuto con una mezcla recién preparada de 2 partes de solución acuosa saturada de safranina y 5 partes de una solución de 1mol/litro de hidróxido de potasio.
 - 3.- Lavar con agua corriente.
 - 4.- Decolorar dos veces durante 10 a 20 segundos con ácido sulfúrico al 0.1%.
 - 5.- Lavar con agua corriente.
 - 6.- Recolorar con azul de metileno fenicado al 1% de 20 a 30 segundos.
- las brucellas aparecen teñidas de rojo anaranjado sobre fondo azul (2).

Para la confirmación de la especie y biotipo de *Brucella* se realizan las pruebas bioquímicas correspondientes:

PRUEBA DE TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI).- Esta prueba se utiliza para determinar la fermentación de los carbohidratos (Glucosa, Lactosa y Sucrosa). Se usa como primer paso en la identificación de bacterias Gram negativas, como base de pruebas adicionales.

PRUEBA DE ÁCIDO SULFÚDRICO.- Consiste en determinar la producción de ac. sulfúdrico a través de una tira de papel impregnada con acetato de plomo al 10%, éste se oscurece por la presencia del ácido producido por las bacterias (2).

PRUEBA DE UREA.- En esta prueba se determina la capacidad de degradar la urea, a través de la producción de la enzima ureasa. Dependiendo de la capacidad de degradación será el tipo de *Brucella* (2).

PRUEBA DE DEPENDENCIA DE COLORANTES.- Consiste en sembrar en medios base de *Brucella* (con tionina, fucsina y safranina); las diferentes especies de *Brucella*, pueden ser inhibidas por la presencia de estos colorantes (2).

PRUEBA DE REACCIÓN CON ANTISUEROS.- Se utiliza para determinar el biotipo correspondiente o sea, se determina si la *Brucella* es de tipo liso o rugoso; se utilizan los antisueros A , M. y R (2).

PRUEBA DE FAGOTIPIFICACIÓN.- Esta prueba consiste en determinar qué tipo de fago inhibe el crecimiento de la bacteria, para que de ésta forma se clasifique el biotipo de que se trata; algunos de los fagos más utilizados son: Iz, Rc, Wb y Tb (2).

OBJETIVOS

-Realizar un estudio serológico y bacteriológico (a partir de muestras de leche) de un hato bovino con problemas de brucelosis revacunando con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19

-Obtener la especificidad de diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de bovinos revacunados contra la brucelosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizó un hato lechero de 70 vacas Holstein, 35 de ellas con diferente producción lechera y el resto vaquillas de reemplazo. El hato se encuentra en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, localizado en la antigua carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, en el municipio de Cuautitlán Izcalli, estando rodeadas de explotaciones de ovinos, caprinos, equinos, aves y conejos, así como áreas de cultivo e instalaciones educativas. El hato bovino se encuentra clasificado de acuerdo a producción, número de parto de las vacas, o si están secas o son vacas de práctica.

Material biológico

La revacunación se realizó con la cepa 19 a dosis reducida (3×10^9 U.F.C./ml.) vía subcutánea.

Material y metodología para muestreo

Se obtuvieron muestras de sangre de vena coccígea mediante tubos al vacío los cuales se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos separando de ésta manera el suero necesario vaciándolo en viales (Ependof); éstos muestreos se realizaron de forma periódica a intervalos desde el día 0 a los 30, 60, 90, 180 y 270 días pos-vacunación.

Material para aislamiento

Complementario al muestreo de suero se tomaron muestras de leche obtenidas de los 4 cuartos de las vacas productoras en tubos de vidrio con tapón de rosca previamente esterilizados. A partir de estas muestras se intentó el aislamiento de *Brucella abortus*, sembrándolas en medio selectivo Farrell, se centrifugaron y se sembró la grasa y el sedimento, se incubaron en condiciones microaerofílicas y normales. El resembrado se hizo en medio de tripticasa soya y se realizaron las pruebas bioquímicas respectivas para establecer la especie de *Brucella*, como son: producción de ácido sulfhídrico, urea, triple azúcar hierro (TSI),. Además la prueba de dependencia de colorantes; tionina, fucsina y safranina. Reacción con antisuero A y M para conocer el biotipo. Fagotipificación empleando los fagos: Iz, Re, Wb, Tb. Estas pruebas se realizaron según la técnica descrita por Alton y col.

Método estadístico

Los resultados fueron analizados por el método estadístico de χ^2

DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS.

PRUEBA DE TARJETA

Para la realización de la Prueba de Tarjeta se utilizó una pipeta micrométrica, se colocaron 30 μ l de suero en una placa de vidrio, posteriormente se colocaron 30 μ l de antígeno para prueba de tarjeta, se mezclaron y se agitaron durante 4 min; posteriormente se observaron en una fuente luminosa; la presencia o ausencia de aglutinación indicaron si la prueba era positiva o negativa (2).

PRUEBA DE RIVANOL

Se mezclaron 0.4 ml de suero con 0.4 ml de solución de rivanol, se dejaron reposar durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Posteriormente se tomó el sobrenadante con una pipeta de 0.2 ml y se hicieron las diluciones correspondientes (0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml) en una placa de vidrio, se agregaron 30 μ l de antígeno para prueba de rivanol, se mezclaron de menor a mayor concentración, se agitaron 4 veces y se dejó reposar en un estuche para prueba de rivanol durante 6 minutos; posteriormente se observó en una fuente luminosa y se realizó la lectura (6).

PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Se utilizaron portaobjetos limpios y desengrasados, se cubrieron con gel que contenía: a) Solución de antígeno de hapteno nativo (1 μ g/ml.). b) Solución de Inmunodifusión Radial (IDR) de gel c) Solución amortiguadora de glicina. Se hicieron perforaciones en el agar en hileras de 6 mm de diámetro y con una separación entre ellos de 3 mm aproximadamente. Los sueros se dispensaron (0.02 ml) en los pozos y se dejaron incubando durante 24 h a temperatura ambiente; al día siguiente se realizó la lectura.

PRUEBA DE ELISA INDIRECTO

Se realizó sobre microplacas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. Tras una titulación previa, el Lipopolisacárido (LPS) liso de *B. abortus* se empleo a una concentración de 2.5 mg/ml en solución amortiguada de carbonatos (0.06 M pH 9.6). La adsorción se consiguió añadiendo a los pocillos 100 µl de esta solución e incubando durante 24 h a 37 °C. El antígeno no adsorbido, se retiro mediante 3 lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) adicionado con un detergente en este caso se uso Tween 20 y con esta solución (PBS-Tween) se realizaron los lavados, se sellaron las placas y se guardaron a 4°C. La técnica se realizó como se describe a continuación:

A. Incubación de 100 µl de suero problema, diluido en PBS-Tween, de 1:200 a 1:1.600, durante 60 min a 37 °C.

B. Lavado de las placa con los sueros con PBS-Tween.

C. Incubación (60 min, 37 °C) de 100 µl de conjugado se empleo anti-IgG bovina obtenido en conejo con peroxidasa.

D. Lavado 3 veces con PBS-Tween.

E. Adición de 100 µl de sustrato e incubación durante 15 min a temperatura ambiente. Como sustrato se empleo ácido 2-2 azinobis, 3-etilbenzotiazolina sulfúrico (ABTS, 5.5 mg en 50 ml de Solución amortiguada de citrato 0.05M pH 4, mas 19 µl de agua oxigenada al 1.2%).

F. La lectura se realizó a los 15 min, sin detener la reacción, a una λ de 405 nm en un espectrofotómetro múltiple, provisto de un registrador de datos (7).

PRUEBA DE ELISA COMPETITIVO

Se utilizó lipopolisacárido como antígeno pegándolo en placas de poliestireno a una concentración de 100 µg diluidos en 100 µl de solución amortiguadora de carbonato al 0.06 M, pH 9.6 por pozo, durante 18 horas a 20 °C y conservándolas en congelación a -20 °C. Antes de usar las placas fueron descongeladas a 37 °C durante 30 a 45 minutos. Se lavaron 4 veces en una solución amortiguadora de PBS Tween al 0.1 M conteniendo 0.15 M de NaCl y 0.05% de Tween 20 para remover el sobrenadante del antígeno. Se adicionaron 50 µl de suero en concentración 1:10, diluido en PBS conteniendo 7.5 mM de sal de ácido etilendiamino

tetracético disodium (EDTA) y ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter)- tetracetil (EGTA), seguido 50 μ l de anticuerpos monoclonales, M84, también diluidos en PBS con EDTA/EGTA, todo fue adicionado por duplicado. Se utilizaron cuatro controles: un suero con altos títulos de una vaca infectada con *B. abortus*, un suero con bajos títulos de una vaca inmunizada, un suero de un animal negativo y un control blanco (solo anticuerpos monoclonales y PBS). La placa fue incubada por 30 minutos a 20 °C y lavada 4 veces en PBS tween. Fueron agregados anticuerpos purificados afines a la anti-IgG de ratón obtenidos de cabra; 100 μ l de una dilución en PBS en cada pozo y se incubo por 30 minutos. Después 4 lavados adicionales, el sustrato (1.0 mM de H₂O₂ y 4 mM de ABTS) fue adicionado y se dieron continuas agitaciones circulares por 10 minutos. Se utilizo una λ de 414 nm para obtener la densidad óptica. Los datos se presentan como % de inhibición relativa a el control. Aquellos sueros que daban un valor de 30% de inhibición o más fueron considerados positivos y fueron reexaminados. (20)

PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

Se realizó la técnica en caliente para la cual se utilizó microplacas de plástico con fondo en U. la técnica se realizó de la siguiente manera:

- a) Se realizaron 5 diluciones de cada muestra de suero y un control para medir la actividad complementaria de cada suero.
- b) Se diluyó cada muestra de suero en una relación 1:5 utilizando 0.6 ml de SSF y 0.15 ml del suero problema inactivado.
- c) Se dispusieron los sueros en pozos, una hilera para cada suero a probarse, agregando con una pipeta automática 0.25 ml de diluyente a cada pozo exceptuando el primero de cada hilera.
- d) Con una pipeta se extrajo 0.5 ml de la primera dilución de suero y se colocaron 0.25 ml al primer pozo y 0.25 ml al segundo, mezclando éste para pasar 0.25 al siguiente, repitiendo la operación hasta llegar al número 5, del que una vez efectuada la mezcla se desecharon 0.25 ml. El pozo número 5 que corresponde al suero inactivado.
- e) Se agregó 0.25 ml de antígeno debidamente diluido a todos los tubos. El complemento se conservo frío mientras se distribuyo.

Para verificar el grado de actividad del complemento se prepararon 4 tubos testigos con 0.05 ml de complemento en 0.7 ml de diluyente cada uno; el complemento se agregó cuidadosamente con una pipeta de 0.1 ml, estos testigos se prepararon en tubos de vidrio.

f) Se conservaron las placas problema y los tubos testigos a una temperatura de 37° C durante 30 minutos en baño maria.

g) Se agregó 0.25 ml del sistema indicador (eritrocitos de camero) a todos los pozos y a los tubos testigos.

h) Se incubaron las placas y los tubos en baño maria a 37° C durante 30 min . para completar la prueba.

i) Se agregó 1 ml de diluyente frío en cada pozo y tubos de la prueba se centrifugaron las placas para observar el grado de hemolisis.

Los resultados se clasificaron como positivos y negativos dando como positivos a los sueros de los animales que dieron títulos mayores a 1:8 (2).

REALIZACIÓN DEL MEDIO FARRELL

Se prepara la base de agar brucella en una proporción de 23g/1L de agua destilada se mezcla y se pone a calentar hasta que clarifique, después se esteriliza por autoclave mientras tanto, se resuspende el suplemento selectivo de antibióticos en 10 ml de una mezcla de 50% de agua destilada estéril y 50% de metanol manteniéndose de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, una vez estéril el medio se le deja enfriar y posteriormente se añade 25 ml de suero de ternera estéril por cada 500 ml de medio más 10 ml del suplemento selectivo. Se homogeniza procurando no hacer espuma y se dispensa en placas no muy finas.

IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS

PRUEBA DE TSI

En un medio de TSI se sembró la bacteria por picadura y estría, se incubo a 37° C por 48 h, después de lo cual se hizo la lectura correspondiente. El género *Brucella* da resultados negativo.

PRUEBA DE UREA

En un medio base se agregó una solución de urea al 5% , y un indicador de pH (rojo de fenol) . este es vaciado a tubos de ensaye y se dejaron que solidificaran en forma inclinada, la bacteria fue sembrada por estría y se incubo a 37° C por 24 h. El género *Brucella* dio un resultado positivo (2).

PRUEBA DE ÁCIDO SULFHÍDRICO

En un medio de agar brucella inclinado se sembró la bacteria por estría, junto con esta se colocó en el interior una tira de papel impregnada con acetato de plomo, el tubo fue puesto a incubar durante 48 h a 37° C. Para la especie *abortus* la prueba dio positiva (observándose la tira de papel de un color negro intenso) (2).

PRUEBA DE DEPENDENCIA DE COLORANTES

En un medio base de agar sangre se hicieron diluciones de los siguientes colorantes: Tionina en una concentración al 0.1% (1/25,000, 1/50,000 y 1/100,000), Fuesina en una concentración al 0.1% (1/50,000 y 1/100,000) y Safranina en una concentración al 1% (1/10,000) . Estos medios fueron sembrados con un hisopo impregnado de una suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 0.9×10^9 U.F.C. / ml, se incuban a 37° C por 48 ó 72 h. Dependiendo de el crecimiento en las diferentes concentraciones del colorante, se puede conocer el biotipo del que se trata .

PRUEBA DE REACCIÓN CON ANTISUEROS MONOESPECIFICOS

En microplacas de plástico se agregaron en cada columna 40µ de solución salina fisiológica y, posteriormente se agregaron 25µl de una suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^9 U.F.C./ml, luego se agregaron 10µl de antisuero (y se realizaron diluciones: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160). Después se procedió a incubar las placas a 37° C durante 24 h. El antisuero que dio el titulo más alto indico el biotipo al que pertenece la bacteria.

PRUEBA DE FAGOTIFICACIÓN

En un medio de base de agar sangre se marcaron diferentes líneas una para cada cepa a probar, con un hisopo impregnado en una suspensión bacteriana a la misma concentración usada para la prueba de los antisueros posteriormente con una jeringa insulínica se agrego en medio de cada línea sembrada una gota de una suspensión de fagos a una concentración de 1×10^4 (dilución corriente de prueba), posteriormente se incubo a 27°C durante 48 a 72 h. La presencia de lisis se interpreto como lisis total, parcial o nula, para los fagos Wb, Tb, Iz y R/C.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Complementario a las pruebas bioquímicas se realizo el sembrado de la cepa problema en medio con 5 U.I./ml de penicilina para determinar si la cepa era vacunal o de campo ya que esta última puede crecer en presencia del antibiótico (2).

RESULTADOS

Las pruebas de tarjeta, rivanol, ELISA-I y fijación de complemento son las que detectan una mayor cantidad de reactores positivos, de los 30 a los 270 días pos-vacunación. En contraste las pruebas de ELISA-Competitivo (ELISA-C) e IDR presentaron un menor número de animales positivos (cuadro 1).

A los 270 días pos-vacunación la prueba de tarjeta presentó un 50% de reactores positivos, un 31% la prueba de rivanol, un 29% la prueba de ELISA-I, y un 45% para la F.C. a diferencia de las pruebas de ELISA-C e IDR que presentaron un 8% de reactores positivos a los 270 días.

En la especificidad de las pruebas diagnósticas puede apreciarse que las pruebas de ELISA-C e IDR presentaron un porcentaje del 100% a los 270 días cada una y las pruebas de tarjeta, rivanol, F.C. y ELISA-I presentaron un porcentaje del 53%, 74%, 59% y 76% respectivamente lo que indica que una gran diferencia en cuanto a especificidad entre ELISA-C e IDR y las demás pruebas (cuadro 2).

La sensibilidad y especificidad al día 0 muestran que las pruebas de tarjeta e ELISA-I son las más sensibles con un 100% cada una, en cambio las pruebas más específicas fueron ELISA-C e IDR también con un 100 % cada una (cuadro 3).

En cuanto a los valores predictivos observamos que al día 0 antes de la revacunación, la mayoría de las pruebas tienen 100% de valor predictivo positivo y negativo, excepto en el caso de F.C. e IDR con una diferencia mínima en su valor predictivo negativo (99%) (cuadro 4). Por el contrario los resultados del valor predictivo al día 270 pos-revacunación muestran variabilidad en sus resultados, ya que solo la IDR y ELISA-C tienen un valor predictivo positivo del 100% mientras que las pruebas de tarjeta, rivanol, F.C. y ELISA-I tienen un valor predictivo negativo del 100% (cuadro 5).

En el muestreo basal se presentaron reactores en todas las pruebas, aunque en diferente número, dado que algunos animales presentan vestigios de la inmunidad que adquirieron en su primera vacunación y en otros se aisló la bacteria lo que determinó que algunos animales se encontraban enfermos.

Los positivos que se detectaron en el muestreo basal por las pruebas de ELISA-C e IDR., son las seis vacas de las cuales se consiguió el aislamiento de *Brucella abortus* a partir de muestras de leche .

Las pruebas bioquímicas muestran que las bacterias aisladas de las muestras de leche son *Brucella abortus* biotipo 1, ya que resulto positiva a las pruebas de producción de ácido sulfhídrico y urea y negativa a la prueba de TSI (triple azúcar hierro) y se determino que se trataba del Biotipo 1 cepa de campo ya que hubo crecimiento en presencia de los colorantes ficcina y safranina en todas sus concentraciones, además de reaccionar con el antisuero inmunoespecifico A y presentar lisis en presencia de los fagos Iz, Wb y Tb, la confirmación del tipo de cepa fue realizada por el crecimiento en presencia de antibiótico que en este caso fue positiva (cuadro 7). Estos resultados fueron comparados con lo que marca la literatura (cuadro 6). En base a estos aislamientos se determino que la prevalencia de brucelosis en el hato era del 8%.

El análisis de X^2 mostró diferencia significativa comparándola entre las diferentes pruebas.

TOTALES DE ANIMALES POSITIVOS POR MUESTREO

TIPO DE PRUEBA.	DÍA 0	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90	DÍA 180	DÍA 270
PRUEBA DE TARJETA	21	68	63	54	49	26
PRUEBA DE RIVANOL	10	65	51	45	27	16
INMUNODIFUSIÓN RADIAL	6*	6*	4*	3*	2*	4*
FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO.	17	65	55	53	32	23
ELISA INDIRECTO	16	44	33	8	22	15
ELISA COMPETITIVO	6*	6*	5*	4*	5*	4*
AISLAMIENTO	6*	6*	5*	4*	5*	4*
TOTAL DE ANIMALES	73	70	66	58	59	51

* Sin los reactivos normales

Nota. La cantidad de animales muestreados varía ya que después de los 60 días algunos de estos fueron sacrificados por diversos razones, además de que estos muestreos no incluyen las vacas gestantes y secas.

CUADRO 1. En este cuadro se aprecia la diferencia entre el número de reactivos positivos a las diferentes pruebas serológicas; vemos que las pruebas de IDR y ELISA-C muestran los mismos reactivos que a su vez coinciden con los aislamientos.

**ESPECIFICIDAD EXPRESADA EN PORCENTAJE DE LAS
PRUEBAS SEROLÓGICAS DE LOS ANIMALES REVACUNADOS
CON *Brucella abortus* CEPA 19**

TIPO DE PRUEBA.	DÍA 0	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90	DÍA 180	DÍA 270
PRUEBA DE TARJETA	70	2	5	7	18	53
PRUEBA DE RIVANOL	94	7	24	22	59	74
FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO	83	15	18	9	54	59
INMUNODIFUSIÓN RADIAL	100	100	100	100	100	100
ELISA INDIRECTO	82	37	40	92	68	76
ELISA COMPETITIVO	100	100	100	100	100	100

CUADRO 2. Aquí se puede apreciar que las pruebas de IDR y ELISA-C tienen una alta especificidad (100%) a todo lo largo del trabajo, cosa que no sucede con las demás pruebas serológicas ya que su especificidad varía en los diferentes muestreos.

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS DIFERENTES
PRUEBAS SEROLÓGICAS (DÍA 0)**

TIPO DE PRUEBA	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
PRUEBA DE TARJETA	100	77
PRUEBA DE RIVANOL	83	93
FIXACIÓN DEL COMPLEMENTO	83	83
INMUNODIFUSIÓN RADIAL	66	100
ELISA-INDIRECTO	100	84
ELISA-COMPETITIVO	83	100

CUADRO 3. Se observa que en el día 0 las pruebas más sensibles son la prueba de tarjeta y la prueba de ELISA-I, en cambio las pruebas más específicas son IDR y ELISA-C.

***VALOR PREDICTIVO DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS
DE LOS ANIMALES **VACUNADOS**

TIPO DE PRUEBA	VALOR PREDICTIVO POSITIVO (%)	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (%)
PRUEBA DE TARJETA	100	100
PRUEBA DE RIVANOL	100	100
FIXACIÓN DEL COMPLEMENTO	100	99
INMUNODIFUSIÓN RADIAL	100	99
ELISA-INDIRECTO	100	100
ELISA-COMPETITIVO	100	100

* Realizado en base a datos obtenidos del trabajo de Reyes (1996)

** Día 0 antes de la revacunación

CUADRO 4. En este cuadro se aprecia que todas las pruebas tienen una alta probabilidad de que sus resultados sean los correctos, ya que todas tienen porcentajes altos tanto en valor predictivo positivo que en negativo.

**VALOR PREDICTIVO DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS
DE LOS ANIMALES *REVACUNADOS**

TIPO DE PRUEBA	VALOR PREDICTIVO POSITIVO (%)	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (%)
PRUEBA DE TARJETA	28	100
PRUEBA DE RIVANOL	35	100
FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO	31	98
INMUNODIFUSION RADIAL	100	100
ELISA-INDIRECTO	35	97
ELISA-COMPETITIVO	100	100

*Día 270 pos-revacuación

CUADRO 5. Se observa que a diferencia del cuadro anterior aquí la mayoría de las pruebas tienen resultados variables exceptuando a las pruebas de IDR y ELISA-C ya que estas tienen un porcentaje de valor predictivo positivo y negativo del 100 %.

*CARACTERES DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GENERO *BRUCELLA* Y SUS BIOTIPOS

		DEPENDENCIA DE COLORANTES									
									TRONINA	FLUCSINA	AGLUTINACION CON SUEROS
ESPECIE	BIOTIPO	PRODUCCIÓN DE SULFÍDRICO	TRF V	1/25,000	1/50,000	1/100,000	1/50,000	1/100,000	A	M	
<i>B. melitensis</i>	1	-	v	-	+	+	+	+	-	+	
	2	-	v	-	+	+	+	+	+	-	
	3	-	v	-	+	+	+	+	+	+	
<i>B. abortus</i>	1	+	+	-	-	-	-	+	+	-	
	2	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4	+	+	-	-	-	-	+	+	-	
	5	-	+	-	-	-	-	+	+	+	
	6	v	+	-	-	-	-	+	+	+	
	7	v	+	-	+	+	+	+	+	+	
	8	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
	9	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
<i>B. suis</i>	1	+	-	+	+	+	-	-	+	-	
	2	-	+	-	+	+	-	-	+	-	
	3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
	4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>B. neotomae</i>	1	+	+	-	-	+	-	-	+	-	
<i>B. ovis</i>	1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>B. canis</i>	1	-	+	+	+	+	-	+	-	-	

V = Variable

*Realizado de acuerdo a Allen y col

CAUADRO 6. En este cuadro se observan las diferentes especies y biotipos de *Brucella* y sus resultados en diferentes pruebas de identificación, este es un cuadro de referencia para comparar los resultados de algunas de las pruebas realizadas a las cepas aisladas

**RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS
A LAS CEPAS AISLADAS**

PRUEBA BIOQUÍMICA	NUMERO DE VACA					
	108	121	128	132	153	161
TRIPLE AZUCAR HIERRO	-	-	-	-	-	-
PRODUCCIÓN DE AC. SULFÚDRICO	+	+	+	+	+	+
URÉA	+	+	+	+	+	+
DEPENDENCIA DE COLORANTES						
TIONINA						
1/25,000	-	-	-	-	-	-
1/50,000	-	-	-	-	-	-
1/100,00	-	-	-	-	-	-
FUCSINA						
1/50,000	+	+	+	+	+	+
1/100,000	+	+	+	+	+	+
SAFRANINA						
1/10,000	+	+	+	+	+	+
REACCIÓN CON ANTISUEROS						
A	+	+	+	+	+	+
M	-	-	-	-	-	-
FAGOTIPIFICACIÓN						
Iz	+	+	+	+	+	+
Rc	-	-	-	-	-	-
Wb	+	+	+	+	+	+
Tb	+	+	+	+	+	+
CRECIMIENTO EN ANTIBIÓTICO	+	+	+	+	+	+

CUADRO 7. En este cuadro se pueden apreciar los resultados de las pruebas bioquímicas los cuales nos indican que se trata de un *Brucella abortus* bitipo 1 cepa de campo.

DISCUSIÓN

Pinochet y col (1991) Realizaron un trabajo en el cual revacunó hembras adultas con dosis reducida (4.5×10^8 U.F.C.) vía conjuntival, que habían sido vacunadas entre los 3 y 8 meses de edad con dosis completa de *B. abortus* cepa 19. Formó 2 grupos, uno experimental al cual se le aplicó la revacunación y un grupo control, se realizaron muestreos periódicos y se llevaron a cabo pruebas serológicas para dar seguimiento a la curva de anticuerpos, observo que a pesar de la alta prevalencia de la enfermedad no se presentaron casos en los animales revacunados, cosa que no sucedió con los animales testigos ya que algunos de ellos se infectaron (23). En el caso de el trabajo realizado en la FES-C se plantea una situación similar ya que animales de un establo en una zona de alta prevalencia de brucelosis, vacunados entre 3 y 6 meses de edad se les aplicó una revacunación con dosis reducida pero en este caso fue 3×10^9 U.F.C. por vía subcutánea, además a diferencia del trabajo de Pinochet no se contó con un grupo testigo y se realizaron 5 pruebas diagnósticas para dar seguimiento. También cabe destacar que el hato de la FES-C se encuentra en una zona donde la prevalencia es mucho menor que donde se encontraban los animales del estudio de Pinochet; pese a esto hubo mucha similitud con los resultados obtenidos en este trabajo ya que no se encontraron nuevos reactores a la enfermedad después de la revacunación. Flores (1985) realizó un trabajo en el cual vacunó becerras de 3 a 6 meses con dosis normal (5.6×10^9 U.F.C.) de cepa 19 de *B. abortus* en la cuenca de Tizayuca Hidalgo, sin embargo, al observar que la prevalencia aumentó y que el número de vacas seropositivas se incrementaba al igual que el aislamiento de cepas patógenas de *Brucella*, se decidió revacunar todo el ganado con dosis reducida (3×10^8 U.F.C.) por vía subcutánea al mismo tiempo que se hicieron más estrictas las medidas preventivas, esto repercutió en una dramática baja en el número de animales desechados por este concepto; de una población en 1982 de 18,456 bovinos con un total de animales eliminados por brucelosis de 1,183 a una población en 1983 de 18,425 con un total de animales eliminados de solo 145 (13). Esto s resultados son parecidos a los de este trabajo ya que antes del programa se había aislado *B. abortus* de 6 animales y al termino del trabajo no se presentaron nuevos casos.

El uso de la revacunación es indicado para hatos localizados en zonas enzooticas de la enfermedad en donde los animales se encuentran en mayor riesgo de contraer la infección y cuando la vacunación única con dosis normal a veces es insuficiente para la prevención como lo demostraron anteriormente Pinochet y Flores. La revacunación provoca una respuesta inmune secundaria así como el aumento de la cantidad de anticuerpos que los animales pasan a sus crías.

La prueba de tarjeta es la prueba tamiz para el diagnóstico de la brucelosis bovina según la Norma Oficial Mexicana (N.O.M.) contra la brucelosis en la que se establece como prueba tamiz, mostró en este trabajo un porcentaje de reactivos del 95.4% a los 60 días pos-revacunación, lo que difiere del trabajo de Pinochet (1991) que reporta un porcentaje del 30.6% de reactivos positivos a los 45 días pos-revacunación (23). El mayor porcentaje de positivos en nuestro trabajo se atribuye a que la vacunación en el trabajo de Pinochet fue conjuntival y no subcutánea. Ya que la vía conjuntival provoca una menor respuesta de anticuerpos aunque esto no merma la protección. Suárez (1993) describe a la prueba de tarjeta como una técnica usada de rutina para el diagnóstico, sin embargo los resultados que se obtienen no son confiables por el alto número de falsos negativos (27). Esto puede observarse en el presente trabajo ya que nueve meses después de la revacunación se encontraron 26 animales de los cuales solo 4 fueron confirmados por aislamiento de un total de 51 animales.

Dohol y col (1986) describieron la gran especificidad de la prueba de fijación del complemento (cerca de un 100%) para el diagnóstico serológico en bovinos no vacunados (9). Nicolletti (1976) en un reporte preliminar sobre la eficiencia de la vacunación del ganado adulto usando cepa 19, reporta que entre los 7-9 meses después de una vacunación con dosis reducida los títulos de anticuerpos en la prueba de F.C. desciende de forma significativa (21). Sin embargo en el caso de el hato de la FES-C la prueba de F.C. obtuvo un 45% de reactivos positivos 270 días después de la revacunación. Díaz y Blasco (1986)

reporta la excelente especificidad en la distinción de animales infectados de vacunados con cepa 19 cuando la vacunación se practica entre los 3 y 7 meses de edad (8). Pero en el caso de la revacunación no hubo tal especificidad ya que a los 270 días pos-revacunación, al igual que la prueba de tarjeta la F.C. presentaba un número importante de reactores positivos, los cuales la mayoría (54% a los 270 días) no concuerdan con los animales positivos a aislamiento. Esta prueba está considerada por su alta sensibilidad, sin embargo al momento de diferenciar entre animales vacunados de infectados su capacidad es muy pobre y las mismas características se presentan en animales revacunados.

Sutherland (1985) demuestran que la prueba de ELISA-I tiene una mayor sensibilidad que la F.C. ya que desafío vacas que habían sido vacunadas con cepa 19 de *B abortus* de 3-6 meses de edad, estos animales fueron muestreados por desafío y se observó que la respuesta en la ELISA-I fue mayor que la F.C. ya que se detectaron anticuerpos durante un período significativamente largo (29). Este trabajo difiere del hecho en FES-C con la revacunación, porque la prueba de F.C. tubo una especificidad del 43% mayor que la ELISA-I que fue del 28% al final del trabajo, en este caso la prueba de ELISA-I tuvo un 29% de reactores positivos a los 270 días pos-revacunación. Urmenta (1988) probó varios tipos de antígenos para la prueba de ELISA-I y observó que en sueros diluidos 1:400 utilizando hapteno nativo y LPS como antígeno no hay diferencia significativa, ya que detectó los anticuerpos vacunales e infecciosos contra *B abortus*, estos animales fueron vacunados con dosis clásica de cepa 19 (30). En el presente trabajo se utilizó el LPS como antígeno para la prueba de ELISA-I con los resultados ya antes mencionados.

Nicoletti (1976) observa que la prueba de rivanol es una buena opción para diferenciar animales vacunados de infectados, después de la vacunación del ganado adulto con dosis reducida, sin embargo no menciona la especificidad que obtuvo en la prueba (21). Reyes (1996) menciona una especificidad del 95% a los 210 días pos-vacunación, en el hato de FES-C; sin embargo en la revacunación, la prueba de rivanol fue poco efectiva al

diferenciar vacunados de infectados ya que también a los 270 días se observó una especificidad del 85% (24). Esto se debe a que en la respuesta secundaria inducida por la segunda vacunación que se aplicó, se provoca la producción de anticuerpos de tipo IgG en grandes cantidades y en cantidades menores IgM (16,25, 31). Por esta razón posiblemente la prueba de rivanol al ser selectiva para detectar anticuerpos IgG de tipo "infecciosos" reaccione ante los producidos por la revacunación provocando resultados falsos positivos.

Varios autores han trabajado con la prueba de IDR observando su alta especificidad (80% por lo menos) en ganado bovino tanto con dosis normal como con dosis reducida de cepa 19 (3,5,6,8,16.). Esta especificidad es tan alta, por el uso del hapteno nativo en la prueba. Berman y Jones (1979) observaron que el uso de hapteno nativo en una solución de gel de agarosa conteniendo un 10% de NaCl precipita rápidamente los anticuerpos, tan bien como lo haría el LPS; solo que el hapteno nativo es un antígeno de tipo intracelular por lo que solo una exposición prolongada de la bacteria al sistema inmune como es el caso de una infección por cepa de campo se producen anticuerpos contra el hapteno nativo y no cuando se trata de una exposición temporal al microorganismo como es el caso de la revacunación con cepa 19.

También describen la capacidad que tiene la prueba para descubrir animales positivos después de la vacunación de vacas con dosis reducida comparandola con otras pruebas como tarjeta, rivanol y F.C., 23 vacas preñadas fueron vacunadas con dosis reducida (5×10^9 U.F.C./ml), muestreadas periódicamente y se realizaron las pruebas antes mencionadas; los resultados demostraron que la prueba de IDR fue la que menos resultados falsos positivos presentó seguida por la de F.C., la pruebas de tarjeta y la prueba de rivanol fueron las que presentaron mayor número de falsos positivos pos-vacunación (3). Berman y Jones, describen el trabajo realizado por Deyoe en donde se corroboró la capacidad de IDR para diferenciar vacunados de infectados, en donde 40 vacas preñadas vacunadas con dosis reducida se muestrearán periódicamente realizando las pruebas de tarjeta, rivanol, F.C. e

IDR, concluyó que tanto IDR como F.C. dieron resultados positivos en vacas de las cuales se aisló *Brucella*, lo que no ocurrió con las pruebas de tarjeta y rivanol las cuales dieron resultados positivos en animales donde no hubo aislamiento. Ambos trabajos tienen relación con este ya que se realizaron muestreos periódicos pos-vacunación y se hicieron las mismas pruebas las cuales dieron resultados parecidos al trabajo de Berman y Jones así como el de Deyoe, sin embargo en ambos trabajos solamente fue una vacunación con diferentes concentraciones de dosis reducida. Díaz (1993) también probó la especificidad de la prueba de IDR utilizando 40 becerros vacunados con cepa 19 de *B. abortus* con dosis clásica (1×10^{10} U.F.C./ml) vía subcutánea observó que ninguna becerro fue positiva 2 meses después de la vacunación (7).

En el caso de la revacunación la IDR resultó positiva solo en los animales infectados 30 días pos-revacunación. La utilización de una prueba diagnóstica tamiz como es tarjeta aunada a la IDR mejora enormemente la capacidad de distinguir animales vacunados de infectados como lo demuestra Iannelli y col (1976) el cual de un banco de 689 sueros de bovinos, realizó las pruebas de tarjeta, F.C. e IDR y observó que 93% coincidía con los resultados de las 3 pruebas y desgraciadamente no indica en este grupo de sueros si hay animales vacunados o infectados. También observó que un número "Considerable" de animales dieron resultados positivos a tarjeta y F.C. pero no a IDR (16). Esto también se presenta en este trabajo ya que algunos animales infectados en algunos muestreos arrojaron negatividad. Cabe mencionar que a pesar de esto la IDR en todos los muestreos de resultados positivos fueron concluyentes ya que coincidieron con los aislamientos realizados.

Otra prueba que logró diferenciar animales vacunados de infectados con casi un 100% de especificidad fue la prueba de ELISA-C Nilsen y col (1989) realizaron una investigación en la cual utilizaron 25 animales, 17 vaquillas y 8 vacas, vacunadas con dosis reducida (3×10^{10} U.F.C./ml) de cepa 19 de *Brucella abortus* vía subcutánea y fueron

sangrados mensualmente por 10 meses realizando las pruebas de ELISA-I y ELISA-C. También se utilizaron 25 animales infectados con *B. abortus* diagnosticadas a partir de muestras de leche y 25 animales negativos a la prueba de aglutinación en placa fueron incluidos como controles. En el caso de la prueba de ELISA-I se utilizó el LPS como antígeno y la cadena-o se usó para lo propio en la ELISA-C. Los resultados demostraron que al momento de diferenciar vacunados de los infectados la ELISA-I no discernía entre anticuerpos inducidos por la vacunación de los producidos por cepas de campo (19). Esto se da por la utilización de anticuerpos monoclonales marcados extraídos de ratón, que compiten contra los anticuerpos séricos lo que aumenta la especificidad de la prueba (20). En el caso de la revacunación en la ELISA-C se obtuvieron buenos resultados ya que se observó una especificidad de un 100% coincidiendo todos los resultados con el aislamiento. Alfonso y col (1995) realizaron una ELISA-C utilizando sueros de bovino con diferentes características: un grupo de animales positivos a serología y bacteriología, un grupo de 166 animales vacunados con dosis normal de cepa 19 de *Brucella abortus* con diferente protocolo de vacunación, otro grupo de 39 animales adultos vacunados 2 veces con 10 meses de diferencia con dosis reducida de cepa 19 y un grupo de 14 animales negativos a serología y bacteriología. Al realizar la ELISA a los diferentes grupos se observó que el 100% de controles negativos dieron resultados negativos a la prueba y el 90.5% de los controles positivos fueron positivos. En los demás grupos se observó que la ELISA-C mostró resultados negativos excepto en el grupo de animales vacunados 2 veces de adultos con dosis reducida, ya que en el segundo muestreo se obtuvieron animales positivos y 32 sospechosos por lo que en animales adultos que han recibido más de una vacunación con dosis reducidas la ELISA-C pierde su efectividad (1). En el caso de la revacunación se observó que a los 30 días pos-revacunación de 6 animales positivos 5 han sido detectados por esta prueba con lo que representa una sensibilidad del 100% , el resto de los animales fueron negativos. Estos resultados coinciden con el trabajo de Alfonso ya que en sus controles positivos y negativos obtuvo resultados similares, también observó que en los grupos vacunados, uno con dosis normal y uno con dosis reducida la ELISA-C diferencia animales vacunados de infectados 30 días después de la vacunación, cosa que también ocurrió en el presente trabajo.

La Norma Oficial Mexicana (NOM) contra la brucelosis indica que para el caso de bovinos se utilizaran las pruebas de tarjeta, F.C. y rivanol para el diagnóstico. La prueba de tarjeta como prueba tamiz, la prueba de F.C. como prueba confirmatoria y la prueba de rivanol para diferenciar animales vacunados de infectados marcando que, para el caso de animales vacunados tanto con dosis normal como con dosis reducida las pruebas se realizaran 10 meses después de la vacunación (26). Sin embargo en la revacunación de el hato de la FES-C 270 días después se detecto una cantidad "alta" de animales con anticuerpos contra *Brucella* que a los 10 meses todavía significan una cantidad de animales falsos positivos importante, con lo que el diagnóstico de estos animales a través de las pruebas oficiales sería poco confiable. Con respecto a la prueba de rivanol que es la oficial para diferenciar animales sanos de infectados tampoco tiene una confiabilidad muy alta por su gran cantidad de falsos positivos. Por lo que la IDR y la ELISA-C pueden resultar una buena alternativa para detectar animales infectados con más de una vacunación.

Reyes (1996) realizó un trabajo en el hato de la FES-C en el cual probó la especificidad y sensibilidad de diferentes pruebas diagnosticas en becerros de 3-9 meses vacunadas con dosis normal de cepa 19 de *Brucella abortus*. Sus resultados mostraron que a los 270 días todas las pruebas alcanzan su máxima especificidad (por lo menos 95%) (24). Sin embargo en el caso de la revacunación a los 270 días las pruebas mostraron una especificidad variable, los cuales solo rebasaron el 90% de sensibilidad

En cuanto al medio Farrell como medio selectivo para el genero *Brucella* este presento buenos resultados ya que no permitió el crecimiento de otros microorganismos que pudiera haber llegado a contaminar la muestra a pesar de que se tomaron las medidas higiénicas pertinentes al momento de obtener la leche, esta capacidad del medio a sido descrita por Alton y col (2).

CONCLUSIONES

Una vez terminado el presente trabajo podemos concluir:

- La revacunación es una herramienta útil en el control de la brucelosis bovina ya que otorga a los animales una inmunidad más alta de la obtenida con la vacunación normal, pero no debe ser el único control que se haga ya que el éxito de esta práctica depende en gran medida en la instrumentación de todo un programa de prevención y control.
- Las pruebas oficiales para el diagnóstico de brucelosis son útiles en el caso de la revacunación, en hatos bajo control ya que nos ayuda a comprobar que se monto una respuesta inmune, pero no debe de tomarse en cuenta para el diagnóstico de vacas enfermas.
- Las pruebas de ELISA-C e IDR son las mejores opciones para identificar animales infectados de vacunados ya que presentaron una mayor especificidad en comparación a la prueba de rivanol que es la prueba diferencial que marca la norma oficial.
- La brucelosis en el hato de la FES -C fue causado por *Brucella abortus* biotipo 1.
- Bajo el esquema de revacunación con dosis reducida de un hato de producción sin antecedentes de vacunación previa y ante un problema de abortos de etiología inespecífica se ha podido controlar y eliminar el problema de brucelosis de el hato a un costo bajo reduciéndose el riesgo de contaminación.
- El presente trabajo permite identificar a los animales positivos aislándolos hasta el término de su vida productiva y eliminándose solo los positivos a la cepa de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Alfonseca S.E., Díaz A.E., Hernández A.L. y Suárez G.F., Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en diferentes grupos de bovinos, Anuario de la "Reunion Nacional de Investigación Pecuaria", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.N.A.M., 26: 46 1995.
- 2.-Alton G.G., Jones L.M. y Pietz D.E.: Las Técnicas de Laboratorios en la Brucelosis, 2ªed. F.A.O y O.M.S. Suiza 1988.
- 3.-Berman D.T. y Jones L.M.: Radial immunodiffusion a confirmatory test for bovine brucellosis, Memorias de la "83ª Reunion Anual de la United States Animal Health Association", Department of veterinary Science University of Wisconsin-Madison, 1979.
- 4.-Borton C.E. y Lomme J.R., Reduced dose whole herd vaccination against brucellosis: A review of recent experience, *J. Am. Vet. Med. Ass.* 177, (2): 1218-1220 (1980).
- 5.-Cherwonogrodzky J.W. y Nilsen K.H.: *Brucella abortus* 119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19-vaccinated and field- strain-infected cattle by agar gel immunodiffusion, *J. Clin. Mic.*, 26, (6), : 1120-1123 (1988).
- 6.-Ciprián C.A., Rodríguez V.M. y Mendoza E.S., Diagnóstico serológico de brucelosis y su interpretación, Material para actualización técnica en brucelosis y tuberculosis , del "Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas", SARH, México 1990.
- 7.-Díaz A.E., Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina, Tesis de doctorado, Universidad de Navarra, España 1993.
- 8.- Díaz R. Y Blasco J.M.: Diagnóstico inmunológico, *Bovis*, Edit. Luzcán 5, 2: 55-69, España, 1986.
- 9.- Dohoo I.R., Wright P.F., Ruckerbauer G.M., Samagh B.S., Robertson F.J. y Forbes L.B.: A comparasion of five serological test for bovine brucellosis, *Can. J. Vet. Res.*, 50: 485-495 (1986).

- 10.-Flores C.R., Brucelosis en ganado bovino, Material para actualización técnica en brucelosis y tuberculosis , del "Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas", *SARH*, México 1990.
- 11.-Flores C.R., Brucelosis: prevención y control, Memorias del "Curso de Capacitación de Coordinadores Estatales y Supervisores Distritales en Tuberculosis Bovina y Brucelosis", *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos*, México 1994.
- 12.-Flores C.R., Uso de la vacuna elaborada con cepa 19 en dosis reducidas, para el control de la brucelosis en la república mexicana, Memorias del "Curso de Capacitación de Coordinadores Estatales y Supervisores Distritales en Tuberculosis Bovina y Brucelosis", *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos*, México 1994.
- 13.-Flores C.R., Fernandez C.L., Trejo S.J., Del Rio V.J.: Adult cattle vaccination and revaccination with strain 19 reduced dosis for the control of Brucellosis a field experience in Mexico, *Int. J. Zoon.*, **122**,: 799-303 (1985).
- 14.-Garcia C.C., Brucelosis de los animales en America, Edit Oficina internacional de epizootias, 1987.
- 15.-Huber J.D., Beal V.C., Crawford R.P. y Adams L.G., Evaluation of reduced dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination (artículo en preparación).
- 16.-Iannelli D., Diaz R. Y Bettini T.M.: Identification of *Brucella abortus* antibodis in cattle serum by radial diffusion, *J. Clin. Mic.*, **3**, (2): 230-250 (1976).
- 17.-Joames T.B., Inmunología medica, 5ª Edición, Edit. Interamericana, pp150-151, 1990.
- 18.-Lopez M.A., Brucelosis avances y perspectivas, Edit. Secretaria de Salud, 1991.

19.- Nilsen K., Cherwonogrodzky J.W., Duncan J.R. y Bondle D.R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle maturely infected with *Brucella abortus* or vaccinator with strain 19, *Ame. J. Vet. Res.*, **50**, (1): 5-9 (1989).

20.-Nilsen K.H., Kelly L., Gall D., Nicoletti P., y Kelly W.: Improved competitive enzima inmuno for the diagnosis of bovine brucellosis, (artículo en preparación).

21.-Nicoletti P.: A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dary herds in florida, *Memorias de la "80ª reunion anual de la United Estaticed Animal Health Association, United Estaticed department of Agriculture*, 1976.

22.-Nicoletti P.: Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection and prevalence of other biotipes in vaccinated adult dairy cattle, *J. Ame. Vet. Med. Ass.* **178**, (2): pp 143-145 (1981).

23.-Pinochet V.L., Abalos P.P., Best B.A., López M.J. Vergara L.C. y Palavicino H.I., Protección contra brucelosis en hembras adultas mediante la revacunación con dosis reducida de cepa 19, *Ava. en Cie. Vet.*, **6**, (2), 152-157 (1991).

24.-Reyes P.R., Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina, Tesis de licenciatura, *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Universidad Nacional Autónoma de México*, México 1996.

25.- Rusel S.W., Myrvik R.Q. y Persall N.N., *Inmunología*, Edit. Interamericana, pp54-59, México 1993.

26.-Secretaria de Agricultura Ganaderia y Desarrollo Rural, Norma oficial mexicana de emergencia, campaña nacional contra la brucelosis en los animales, *Diario Oficial de la Federación*, Primera sección, México 1995.

- 27.- Suárez G.F., Tendencias de la investigación en el diagnóstico y control de brucelosis; Memorias de el "V curso internacional de reproducción bovina", *Academia de Investigación Involucada en la Reproducción (A.I.B.I.R.)*, México 1993.
- 28.- Suárez G.F., Descripción y generalidades de brucelosis, Tomado de las memorias del "Curso de Capacitación de Coordinadores Estatales y Supervisores Distritales en Tuberculosis Bovina y Brucelosis", *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos*, México 1994.
- 29.- Sutherland S.S.: Comparison of enzyme -liked immuno sorbent assay and complement fixation test for the detection of specific antibody in cattle vaccinated and challenge with *Brucella abortus*., *J. Clin. Mic.* **22**, (1): 44-47 (1985).
- 30.- Urmenta A.B., Moriyon I.; Díaz R. Y Blasco J.M.: Enzyme-liked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polisaccharide and smooth lipopolisaccharide, *J. Clin. Mic.*, **26**, (12): 2642-2646, 1988.
- 31.- Willian R.M., *Inmunología*, 9ª Edición, Edit. Corporación para investigaciones biológicas, pp180-183, Colombia 1993.