



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**“ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y SEROLOGICO
SOBRE BRUCELOSIS BOVINA EN VACAS
REVACUNADAS 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 N :
JORGE BUSTAMANTE SANCHEZ
FERNANDO ISRAEL SALAZAR HERNANDEZ

DIRECTOR: M. EN C. CARLOS MANZANO CAÑAS
ASESORES: M.V.Z. ROSA MARIA REYES PALACIOS
DR. EFREN DIAZ APARICIO
M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ
M.V.Z. JOSE GUADALUPE DOSSETTI DURAN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

268081

12
2ej.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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 AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Estudio bacteriológico y serológico sobre
brucelosis bovina en vacas revacunadas con dosis
reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A (N) :

**JORGE BUSTAMANTE SANCHEZ.
FERNANDO ISRAEL SALAZAR HERNÁNDEZ.**

Director : M. En C. Carlos Manzano Cañas.
Asesores: M. V. Z Rosa María Reyes Palacios.
Dr. Efrén Díaz Aparicio.
M. V. Z. Rafael Pérez González.
M. V. Z. José Guadalupe Dossetti Duran.

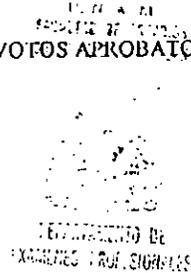
CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

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

"Estudio bacteriológico y serológico sobre brucelosis bovina en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de Brucella abortus".

que presenta el pasante: Bustamante Sánchez Jorge
 con número de cuenta: 8901115-1 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

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 19 de agosto de 1998.

PRESIDENTE	M.enC. Carlos Manzano Cañas.	
VOCAL	M.enC. Fernando Osnaya Gallardo.	
SECRETARIO	MVZ. Susana García Vázquez.	
PRIMER SUPLENTE	M.enC. Guillermo Valdivia Anda.	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Rafael Pérez González.	



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

" Estudio bacteriológico y serológico sobre brucelosis bovina en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de Brucella abortus".

que presenta el pasante: Salazar Hernández Fernando Israel.
con número de cuenta: 9256684-6 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

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 19 de agosto de 199 8

PRESIDENTE	M.enC. Carlos Manzano Cañas.	
VOCAL	M.enC. Fernando Osnaya Gallardo.	
SECRETARIO	MVZ. Susana García Vázquez.	
PRIMER SUPLENTE	M.enC. Guillermo Valdivia Anda.	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Rafael Pérez González	

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: POR ILUMINAR NUESTRO CAMINO Y POR DARNOS CUENTA QUE NO NOS ENCONTRAMOS SOLOS.

A NUESTROS PADRES: POR SU ESFUERZO, DEDICACION Y CONFIANZA HACIA NOSOTROS PARA QUE ESTO FUERA POSIBLE.

A NUESTROS HERMANOS: POR SU APOYO Y COOPERACION.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA: POR SER NUESTRA SEGUNDA CASA Y POR DARNOS LA OPORTUNIDAD DE REALIZARNOS COMO PROFESIONISTAS.

A NUESTROS ASESORES: MVZ ROSAMARIA REYES; DR. EFREN DIAZ; MC. CARLOS MANZANO; MVZ RAFAEL PEREZ Y AL MVZ JOSE GUADALUPE DOSSETTI; POR INVITARNOS Y AYUDARNOS A FORMAR PARTE DE ESTE TRABAJO. AGRADECIENDO SU APOYO, SU AMISTAD Y EL COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS.

A NUESTROS MAESTROS: A QUIENES RECORDAREMOS CON TOTAL GRATITUD A LO LARGO DE NUESTRAS VIDAS COMO PROFESIONISTAS.

A LOS MEDICOS DEL CAIT: QUIENES INCONDICIONALMENTE NOS BRINDARON SU APOYO DURANTE NUESTRO TRABAJO.

AL CENID-MICROBIOLOGIA (INIFAP): POR TODA SU COLABORACION OFRECIDA PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO Y UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A TODOS LOS MEDICOS QUE TRABAJAN EN EL.

A NUESTROS AMIGOS: POR TODOS AQUELLOS BUENOS MOMENTOS, POR COMPARTIR SU AMISTAD ESPERANDO PERDURE POR SIEMPRE.

AL M.V.Z. IGNACIO RANGEL: LE AGRADEZCO SINCERAMENTE SU AMISTAD, ADEMAS DE BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE PODER HACER MI SERVICIO SOCIAL Y COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS.

FERNANDO.

A JORGE : QUE GRACIAS A SU APOYO, AYUDA Y SU AMISTAD PUDIMOS CONCLUIR LA PRIMERA ETAPA DE NUESTRA VIDA COMO PROFESIONISTAS.

A FERNANDO: POR PARTICIPAR CONMIGO EN ESTE TRABAJO Y POR SER UN GRAN AMIGO.

A TODOS LOS ANIMALES: PORQUE GRACIAS A ELLOS Y POR ELLOS DEBEMOS NUESTRA CARRERA.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE TUVIERON MUCHO QUE VER PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO. MIL GRACIAS

DEDICATORIA

A DIOS: POR ESTAR SIEMPRE CERCA DE MI.

A MIS PADRES: POR DARME LA VIDA, CREER EN MI, SER MIS AMIGOS Y POR SER UN GRAN EJEMPLO A SEGUIR.

A MI HERMANO SERGIO: POR TU APOYO Y POR HACER QUE LOS MOMENTOS DIFICILES SE CONVIERTAN EN MOMENTOS AGRADABLES.

A MI HERMANA ALEJANDRA: POR APOYARME EN TODO MOMENTO INCONDICIONALMENTE Y POR SU GRAN ESFUERZO PARA LOGRAR LAS COSAS.

A MIS SOBRINOS: POR DARME LA FUERZA PARA SEGUIR ADELANTE.

A MI NOVIA PATY LIMA: POR ESTAR CONMIGO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, ESTO ES UN LOGRO DE LOS DOS.

JORGE

A DIOS Y A MIS PADRES. POR SENTIRLOS SIEMPRE A MI LADO A LO LARGO DE MI CARRERA.

A MIS HERMANOS. POR BRINDARME SU CARIÑO Y APOYO EN TODO MOMENTO.

A MI NOVIA PATRICIA. POR SER MI GRAN COMPAÑERA Y AMIGA. MBLATS.

FERNANDO

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y METODO	30
RESULTADOS	38
DISCUSION	42
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFIA	50

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar mediante diversas pruebas diagnósticas tanto oficiales como experimentales, si los anticuerpos que se presentan son debidos a infección o a vacunación en bovinos revacunados con dosis reducida de cepa 19 de *B. abortus* y aislar el agente etiológico para determinar la especie y el biotipo. Se utilizaron 100 bovinos hembras de raza Holstein positivas a la prueba de tarjeta (PT) para diagnóstico de brucelosis, pertenecientes al Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), en el Estado de Hidalgo, las vacas se encontraban distribuidas en 25 establos, estando en diferentes estados de producción. En el CAIT su programa de medicina preventiva de brucelosis, es el de vacunar con cepa 19 de *B. abortus* con dosis clásica (1×10^{10} UFC/ml), para becerras de 3-6 meses edad y revacunar con dosis reducida (3×10^8 UFC/2ml), también de cepa 19 de *B. abortus*, a hembras de más de 6 meses y adultas. Se muestrearon 100 vacas positivas a PT para obtener suero y exudado vaginal. Solo de 90 vacas se obtuvo leche, por estar 10 de ellas en período seco. A los sueros se les hicieron las pruebas de Fijación del Complemento (FC), Rivanol (Rv) e Inmunodifusión Radial con hapteno nativo de *Brucella melitensis* 16M (IDR). Las muestras de leche y exudado vaginal se emplearon para el análisis bacteriológico a fin de aislar y determinar el biotipo del agente etiológico. Las muestras se sembraron en medio selectivo de Farrell y se incubaron a 37°C, en atmósfera de 5-10 % de CO₂ por 8 días. A las colonias sospechosas se les realizaron las pruebas bioquímicas de: oxidasa, ureasa, producción de H₂S, Citrato y TSI. Además de aglutinación con sueros monoespecíficos, crecimiento en colorantes y fagotipificación. (Tb, Wv, Iz y R/C). Los resultados que se obtuvieron de la serología fueron para FC 52%, Rv 87% e IDR 74% de animales positivos (Cuadro 4). Se tomó a IDR, ya que en bovinos esta prueba presenta una alta especificidad para diferenciar animales con infección demostrada por aislamiento bacteriológico de los vacunados con cepa 19 de *B. abortus*, por incluir el hapteno nativo (HN) en un gel donde se colocan las muestras a estudiar y si algún suero contiene anticuerpos frente al HN, se desarrolla un anillo de precipitación alrededor del pozo entre 2 y 6 horas, los anticuerpos ante el HN son de clase IgG característicos de infección (12). El 26% de las vacas fueron negativas a IDR las cuales tenían diferentes tiempos posrevacunación. Los siguientes resultados se agruparon por meses posrevacunación (Pr). De 1 a 10 meses Pr de 10 vacas el 20 % fue positivo a FC y el 50 % fue positivo a Rv. De 11 a 20 meses Pr de 8 vacas el 25 % fue positivo a FC y el 75 % positivo a Rv. De 21 a 32 meses Pr de 7 vacas el 28.5% fue positivo a FC y el 71.4% a Rv. De 52-90 meses Pr de una vaca el 100% fue positivo a FC y Rv (Cuadro 6). Se logro el aislamiento a partir de 10 muestras de leche obteniendo *B. abortus* biotipo 1. Se concluye que pasados 21 meses posrevacunación todavía se detectan resultados positivos a las pruebas oficiales y que la prueba de IDR es una herramienta diagnóstica sencilla, práctica y eficaz para diferenciar animales infectados de vacunados, en lugares donde se aplica la cepa 19 de *B. abortus* para el control de brucelosis.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis muy importante y es una enfermedad infecto-contagiosa de etiología bacteriana que se encuentra distribuida mundialmente, y se considera enzootica en México; ha sido diagnosticada en todos los estados de la República Mexicana, representando un gran problema económico para la ganadería nacional y un riesgo considerable a la salud pública. La brucelosis recibe otros nombres dependiendo la especie afectada, como: Aborto contagioso o enfermedad de Bang en bovinos, epididimitis en cameros, en equinos se asocia con cruz fistulosa o talpa y fiebre de Malta o fiebre ondulante en el humano.

La enfermedad afecta a especies domésticas como: bovinos, ovinos, caprinos, suinos, caninos y equinos, además, especies silvestres como: ciervos, alces, yaks, camellos, búfalos, antílopes, la rata del desierto y mamíferos marinos y como hospedero accidental el humano. Es causada por varias especies del género *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris*, todas son bacteria Gram negativas, parásitos intracelulares facultativos en células del sistema reticuloendotelial, no fermentadoras, son oxidasa y ureasa positivos y reducen nitratos a nitritos.

La brucelosis afecta a animales de cualquier edad y sexo, produciendo en hembras abortos, partos prematuros, crías débiles, retenciones placentarias, endometritis, higromas del carpo e infertilidad en ambos sexos; mientras que en los machos ocasiona inflamación de glándulas anexas, orquitis y epididimitis en ovinos principalmente. En humanos la enfermedad es contraída a través del consumo de lácteos o sus derivados no pasteurizados, o bien por las actividades asociadas al contacto con animales o sus productos y se trata de pastores, ordeñadores, carniceros, médicos veterinarios zootecnistas y trabajadores de laboratorio.(5,6,19,24,39).

ANTECEDENTES HISTORICOS

La brucelosis humana en 1863 la descubrió Marston, quien registro presencia de la enfermedad sufrida por otras personas y por él mismo, durante su estancia en el ejército británico como cirujano en la isla de Malta.

En 1886 David Bruce descubre el agente causal de la fiebre de Malta, denominándolo *Micrococcus melitensis* haciendo el aislamiento a partir de muestras de bazo de personas enfermas, ya que se presentaron dificultades anteriormente en la diferenciación con la fiebre tifoidea y la malaria.

Posteriormente le dio el nombre de *Brucella* al microorganismo causante de la enfermedad. En 1897, en Dinamarca el Dr. Bang descubre la etiología de la enfermedad en el bovino (enfermedad de Bang), la cual no se relacionó con la enfermedad humana sino hasta 20 años después. Traub investigador estadounidense, aisló *Brucella suis* de un feto prematuro en 1914.(18, 23, 27).

En México Placeres y Vergara en 1921 reportaron que habían aislado *B. melitensis*. En 1924 Ocaranza y Várela observaron un caso de brucelosis en el Distrito Federal. La cascada de casos inundó el país y los pioneros en investigar la enfermedad tuvieron que fundar un centro de brucelosis en México, el cual se fundó en el Hospital General teniendo como responsable al Dr. Maximiliano Ruiz Castañeda aportando valiosas herramientas para el diagnóstico.(22).

La extensión del padecimiento en nuestro país ha sido gradual y en la actualidad esta ampliamente diseminada. En 1970 se instituye oficialmente una campaña Nacional, publicándose 11 años más tarde en el Diario Oficial de la Federación (DOF). La campaña tiene como antecedente regulador del reglamento para la profilaxis de la brucelosis publicado en el DOF en 1942. En Septiembre de 1993 lo reinicia la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis.(CONETB).

BRUCELOSIS EN MÉXICO

La incidencia de la brucelosis en México a partir de 1946, tendió a descender hasta 1976 y de ahí se apreció un aumento hasta 1981. Los estados con las tasas más altas en 1992 fueron: Coahuila, Guanajuato, Nuevo León, Querétaro, Sonora, Durango, Michoacán, Sinaloa y Tamaulipas.(37).

En el período de Enero - Octubre de 1997 se presentaron un total de 9399 focos de brucelosis y los estados que con mayor porcentaje de focos infecciosos son: Sinaloa, Chiapas, Tamaulipas, Nayarit, Veracruz, Jalisco y Aguascalientes.(CONETB).

En México existen unas 38 millones de cabezas de ganado bovino, caprino y ovino que, en caso de no tener las medidas preventivas mínimas, son susceptibles de contraer la enfermedad. Además los cerdos, caballos, perros, etc. pueden sufrir la enfermedad.

Se ha calculado que la brucelosis, tan sólo por problemas reproductivos, representa para la ganadería nacional una pérdida de 22 millones de pesos anuales, sin considerar las mermas en leche y los costos del tratamiento de infecciones secundarias.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, a través de la Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, realiza una Campaña Nacional contra la Brucelosis, cuyas actividades sustantivas son el muestreo sanguíneo de animales para determinar su estado de salud y la vacunación masiva de hembras para la prevención de la enfermedad.

En el caso de la enfermedad en población humana, la Secretaría de Salud cuenta con el programa de prevención y control de brucelosis, que se circunscribe a la detección oportuna del padecimiento, tratamiento específico y actividades de educación para la salud.

En salud pública durante el periodo que va de 1991 a 1997 se han detectado unos 29 mil casos; sin embargo, esa cifra se considera inferior a la realidad, en virtud de que la sintomatología del padecimiento no es específica y puede ser fácilmente confundida, pues se manifiesta con fiebre, sudoración, dolores musculares y articulares, inflamación de ganglios, signos y síntomas comunes a varias enfermedades.

Si el cuadro no es atendido oportunamente se desencadenan complicaciones graves, que pueden incluso causar la muerte. Lamentablemente, en el país se registran cada año unas 30 defunciones que tienen como causa directa de muerte la brucelosis.

Indudablemente, la mejor herramienta para controlar y a mediano plazo erradicar la enfermedad es la vacunación de todas las hembras susceptibles de contraerla. En ese sentido existe la meta de alcanzar una cobertura de 75 % como mínimo para el año 2000 con el fin de lograr una inmunidad poblacional o de hato que detenga la transmisión del padecimiento.

También es de vital importancia recomendar a la población que, ante la duda del origen de productos lácteos, no los consuma o bien, que adquiera sólo aquellos que hayan sido elaborados con leche pasteurizada o sometida a procesos de control sanitario. (19, 35, Jornada Febrero 1998, D.G.S.A.).

ETIOLOGÍA

La infección es producida por microorganismos del género *Brucella*, de forma bacilar o cocobacilar, Gram negativas siendo siete las especies de bacterias, de las cuales son clasificadas como cepas lisas: *B. melitensis* con tres biotipos, *B. abortus*, con nueve biotipos, *B. suis*, con cuatro biotipos y *B. neotomae*, y como cepas rugosas: *B. ovis* y *B. canis*. Además de una nueva especie aislada en mamíferos marinos. La especie bovina está preferentemente infectada por *B. abortus* pero es posible la infección por las otras especies.

Las brucelas son bacilos cocoides (0,6-1,5 μm de longitud, 0,5-0,7 μm de ancho), pequeños, Gram negativos, inmóviles, no esporulados, desprovistos de cápsula, habitualmente aislados y raramente dispuestos en pares y cadenas cortas. Son catalasa positivos, oxidasa positivos (excepto *B. ovis* y *B. neotomae*), ureasa variables y reducen nitrato a nitrito. Son de exigencias microaerofilicas (5-10% CO_2). Son citrato negativo, el metabolismo es principalmente oxidativo con escasa fermentación de carbohidratos en medios convencionales. La producción de H_2S es positiva, resistencia a la tionina y a la fucsina básica ayudan a diferenciar las especies. La temperatura óptima de desarrollo es de 37°C y un pH óptimo de 6.6 a 7.4. Las brucelas son parásitos intracelulares facultativos en células del sistema reticuloendotelial y ocasionan sintomatología sistémica.

En el aislamiento primario las colonias de *Brucella* tienen de 0.5-1.5 mm de diámetro y son convexas. Las colonias de las cepas rugosas (Rough) son de similar tamaño y forma a las colonias lisas pero varían considerablemente en color y textura., son usualmente menos transparentes que las colonias lisas. Las colonias lisas (Smooth) son similares a las rugosas en color y opacidad pero tienen una textura pegajosa. (9,18, 19, 20, 24, 27, 29, 38, 41, 44).

ESTRUCTURA ANTIGENICA DEL GENERO *Brucella*

Las brucelas son bacterias Gram negativas, constan de una envoltura celular que rodea al citoplasma, constituida por una membrana interna (citoplasmática) y una externa, y el espacio comprendido entre ambas es denominado periplasma ocupado por algunas proteínas solubles y un polímero glucopeptídico (mureína o peptidoglicano) que en estado de gel se dispone

rodeando a toda la membrana interna a modo de sáculo. La parte exterior de la membrana externa es la única parte de la bacteria que se encuentra en contacto con el medio ambiente y contiene distribuidos asimétricamente Fosfolípidos, Proteínas y un Lipopolisacárido (LPS). Esta información es importante para comprender el significado de los distintos antígenos en el diagnóstico y protección vacunal.

La estructura antigénica de las brucelas consta de dos antígenos dominantes en las cepas lisas, los cuales están contenidos en el LPS y se conocen como antígenos A y M, se ha señalado que los antígenos A y M están compuestos de glucosa, glucosamina, galactosa y ácidos hexaurónicos que se. De *B. abortus* y *B. melitensis* la proporción del antígeno A :M es de 20:1 y 1:20 respectivamente.

El LPS es una macromolécula, es el antígeno inmunodominante de la superficie de las brucelas, está constituido de una parte lipídica (lipido A), insertada en la membrana externa y por tanto no expuesta, y una cadena O que es la parte polisacárida (la perosamina que es un azúcar es el constituyente principal de la cadena O) dirigida hacia el exterior siendo el antígeno inmunodominante en las especies lisas y una región central o núcleo que es un oligosacárido que sirve de unión entre el lipido A y la cadena O. El LPS posee determinantes antigénicos de las reacciones cruzadas con otros Gram negativos. La cadena O es la responsable de las reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica* serotipo 9, *Escherichia coli* serotipos O:157, O:116 y O:117 y *Vibrio cholerae*.

La síntesis del LPS tiene lugar en el citoplasma, por lo que en el citoplasma podemos encontrar precursores del LPS desprovistos de su componente lipídico, que no son inmunogénicos pero reaccionan con anticuerpos específicos anti-LPS y son conocidos como *haptenos nativos*.

El análisis electroforético del LPS preparado a partir de cepas lisas, permite la identificación de un segundo componente de naturaleza exclusivamente polisacárida. Este componente fue originalmente llamado segundo polisacárido o polisacárido B (poly-B), pero por representar con toda certeza el equivalente en el género *Brucella* de los haptenos nativos de otras bacterias Gram negativas, actualmente con preferencia se denomina *hapteno nativo* (HN).

Proteínas y lípidos: Las envolturas celulares del género *Brucella* están formadas de fosfolípidos siendo el fosfolípido mayoritario el fosfatidiletanolamina y la cardiolipina, aun cuando los fosfolípidos no son

antigénicos por sí mismos, es posible que modulen la respuesta inmune. En general, la composición proteica de la membrana externa parece ser más compleja en el género *Brucella*, tres grupos de proteínas principales han sido identificadas: el 1, 2 y 3 (11,12,25,27).

Las cepas de *Brucella* muestran el tipo de disociación clásico de liso a rugoso. La mutación Smooth - Rough (cepas lisas y rugosas S → R) se acompaña de una pérdida de la virulencia, tendencia a la aglutinación espontánea y disminución de antígenos que estimulan aglutininas específicas para cepas lisas. La cepa 19 de *B. abortus*, un mutante intermedio, es inmunógena a pesar de su avirulencia para el ganado y virulencia para el humano. Taxonómicamente, las especies de *Brucella* no guardan estrecha relación entre ellas. Sin embargo, todas son homogéneas según las proporciones de las bases del ácido nucleico y la homología del DNA (12, 13, 26, 28, 39).

EPIZOOTIOLOGIA

La brucelosis está ampliamente distribuida y posee enorme importancia por las pérdidas económicas que produce en casi todo el mundo, principalmente por descenso de la producción lechera a causa de los abortos, la infertilidad, retenciones placentarias y como secuela, muertes por metritis aguda.

La incidencia varía considerablemente según los hatos, regiones y países como en el continente Africano, Asiático y centro de Sudamérica, algunas regiones de Europa, Australia, Nueva Zelanda, Canadá y en los Estados Unidos se encuentra en 14 estados y los 36 restantes son considerados como libres de brucelosis. La perspectiva sigue siendo promisoria para lograr la erradicación de la brucelosis en el ganado para 1998 en E.U.A., pero se necesita una actividad continua para prevenir la recurrencia y esa será la meta crítica.

La epizootiología de la brucelosis es compleja y está influenciada por numerosas variables que difieren según las áreas geográficas y según las técnicas de manejo. (16,23,28,31,36,44)

TRANSMISIÓN

La transmisión se presenta en forma horizontal o vertical, esto es: en la transmisión horizontal, un individuo infectado va a eliminar bacterias, las

cuales a su vez encontraran nuevos hospederos. De esta manera un individuo podrá infectarse por contacto directo.

En la transmisión vertical, la enfermedad se transmite de padres a hijos, en donde las terneras pueden adquirir la infección *in útero*. Por ingestión de leche contaminada en donde se elimina la bacteria de forma intermitente. Un pequeño número al rededor del 3% permanecen infectadas. Generalmente estos animales son seronegativos hasta la primera gestación. Los factores que influyen en la latencia son desconocidos todavía.

Las vías de infección más comunes son las mucosas digestivas y genitales (en la vaca y la cerda por contagio del toro y el verraco respectivamente). Como *Brucella* es sumamente infecciosa penetra al cuerpo por: ingestión de alimentos, agua y leche contaminados con exudados uterinos, orina o heces de un animal infectado, por monta o inseminación artificial de machos infectados y penetración a través de piel lesionada.

La piel es un órgano que al estar en contacto estrecho con el exterior, representa una importante vía de entrada para microorganismos. Si bien no es fácil que la bacteria se establezca en su superficie, debido a diferentes mecanismos como son: los anatomofisiológicos, por medio de la descamación epitelial, los biológicos, flora normal y bioquímicos, como son los componentes del sudor, todos aquellos de acción inespecífica, si es frecuente que a través de ella penetren microorganismos a tejidos más profundos. La *Brucella* tiene la capacidad de atravesar la piel intacta, pero es más factible que la penetración se realice cuando la piel se encuentra bajo stress como : exceso de humedad o cuando está lesionada penetrando la bacteria por laceraciones o heridas.(19, 28, 38, 39).

La brucelosis bovina casi siempre se origina en condiciones naturales tras la ingestión de *Brucella abortus* que ha sido eliminada por las vacas infectadas. Otros métodos de infección demostrados o sospechosos son : la inhalación, y la exposición conjuntival, inoculación intramamaria o intrauterina (vía congénita).

El período ante la exposición a *B. abortus* y la aparición de respuestas clínicas o serológicas es muy variable siendo de 53 a 251 días (Thomsen 1982); estando influenciado por la gestación, número y virulencia de las bacterias, edad, vacunaciones previas y quizá algunos otros factores.(13,15,25,26,27,42)

La existencia de arroyos, charcas o abrevaderos comunes aumenta el contacto entre animales y por tanto el riesgo de contagio. Este tipo de transmisión parece más importante que la producida por la ingestión de agua. Por fomites; es decir, por objetos inanimados que hayan estado en contacto con el enfermo y el microorganismo sea capaz de sobrevivir en ese objeto. También ocurre a través de vectores, los cuales son organismos vivos capaces de transmitir la enfermedad sin que ellos la sufran.

Las bacterias de género *Brucella* permanecen viables en orina, leche, agua y corrales húmedos por periodos hasta de cuatro meses, sobreviviendo a la congelación y a la descongelación, aunque no a las temperaturas de pasteurización o calentamiento mayor a 60°C por lapsos de 10 min.; son muy sensibles a los desinfectantes ordinarios y heces secas mueren en un día. bajo condiciones de humedad sobreviven hasta por 75 días. En membranas fetales persisten hasta por 4 meses y en leche fresca y fría logran mantenerse viables por varias semanas. La acidificación de la leche las inactiva, pero se conservan hasta por 30 días en mantequilla y quesos elaborados con cuajo. Entre los desinfectantes con una mayor efectividad frente a las brucelas se pueden mencionar el fenol, el cloro y el formaldehído. Los antibióticos con mayor actividad contra las brucelas son eritromicina, estreptomycinina y las tetraciclina. (19,23,28,39).

PATOGENIA

La bacteria ingresa al organismo por distintas vías. El sistema digestivo está expuesto a estos microorganismos que son ingeridos junto con el agua o alimentos, el sistema respiratorio, es vía de entrada para bacterias patógenas que se encuentran en aerosoles producidos en la nasofaringe, la boca, durante la respiración así como los producidos durante el aborto o el parto. La piel es importante en la entrada del microorganismo cuando presenta heridas. Existen otras vías de entrada al organismo, menos frecuentes que las ya mencionadas y son: el tracto genitourinario y la conjuntiva ocular. Sin embargo, para que se produzca una enfermedad infecciosa es necesario contar con un hospedero sensible, en el cual existan las condiciones para el establecimiento del microorganismo.

La capacidad de transmisión a las vacas susceptibles está relacionada con el número de bacterias excretadas en el momento del parto o aborto y cesa cuando desaparece la excreción de bacterias por los fluidos producidos en el postparto. La vaca es considerada como no infectante hasta partos posteriores.

Las vacas inmaduras sexualmente son altamente resistentes a *B. abortus*

y la susceptibilidad aumenta con el desarrollo sexual y con la gestación. El grado de infección es más alto en la época final de la primera gestación que ha seguido a la exposición del animal a la bacteria.(6,14,24,28)

La relación hospedero- parásito es muy compleja ya que el periodo de incubación es variable y está influenciado por la gestación, número y virulencia de las bacterias, edad y vacunaciones previas. Además hoy se sabe que las especies de *Brucella* no son específicas de especie, por lo que una misma especie puede infectar a otras siendo importante desde el punto de vista epidemiológico y para la transmisión al hombre. (Cuadro1).

La bacteria al entrar en el organismo es fácilmente fagocitada por los macrófagos pero resiste la destrucción celular, por lo tanto permanece a salvo de los mecanismos de defensa por largos periodos pudiéndose multiplicar dentro del fagocito ya que es un parásito facultativo y que puede vivir intra o extracelularmente y estar protegida de los mecanismos de defensa del hospedero.

La virulencia de las brucelas puede variar según la especie animal. Los factores de virulencia localizados en la pared celular desarrollan actividad antileucocitaria. Confieren protección contra el poder bactericida intracelular y hacen posible la supervivencia, así como la multiplicación, en leucocitos y macrófagos.(20).

A continuación se describen los principales mecanismos que utiliza la bacteria para invadir al hospedero, así como sus toxinas.

Cuadro1
Reservorios animales de las especies de *Brucella*

Especie	Aislamiento original	Otros reservorios en que se ha encontrado.
<i>B. melitensis</i>	Cabras	Vacas, cerdos, borregos, caballos, perros y humano.
<i>B. abortus</i>	Vacas	Cabras, borregos, cerdos, caballos, perros y humano.
<i>B. suis</i>	Cerdos	Vacas, caballos, borregos, perros y humano.
<i>B. canis</i>	Perros	humano.
<i>B. ovis</i>	Borregos	
<i>B. neotomae</i>	Rata del desierto	

(INDRE/SAGAR, 1996)

MECANISMOS ANTIFAGOCITICOS

Existen diferentes formas en que las bacterias pueden evitar el ser fagocitadas por las células especializadas del organismo, como son los polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos. Los mecanismos antifagocíticos pueden ser superados por el organismo debido al fenómeno de opsonización. Este mecanismo consiste en la ayuda a fagocitar que presenta principalmente los anticuerpos y la fracción C₃ de complemento. Los macrófagos y PMN, tienen en su superficie receptores específicos para la fracción Fc de los anticuerpos IgG e IgM, así como para la fracción C₃ del complemento. Debido a esto, los microorganismos una vez unidos a los anticuerpos o cubiertos por la fracción C₃ del complemento fácilmente fagocitadas.

Sobrevivencia a fagocitosis. Las brucelas permanecen largo tiempo, en forma intracelular, protegida del ataque directo de algunos componentes del sistema inmunológico. Algunos de los mecanismos por los cuales esta bacterias sobreviven a la fagocitosis son :

- a) Bloqueo de la unión entre el lisosoma y el fagosoma, evitando la formación del fagolisosoma, el cual es el organelo celular donde la partícula fagocitada es digerida si esto sucede la bacteria podrá seguir multiplicándose en forma intracelular.
- b) La bacteria fagocitada puede escapar de fagosoma.
- c) Resistencia a la acción de las enzimas contenidas en los lisosomas.

Producción de enzimas extracelulares. La producción de enzimas extracelulares es mecanismo de virulencia importante que facilita la invasividad, como: hialuronidasa, coagulasa, fibrinolisisina, colagenasa y proteasas.

Citoadherencia. La bacteria una vez que logró pasar las primeras barreras de defensa de hospedero, deben adherirse las células epiteliales. Una vez adheridas, estas podrán producir daño por el mecanismo de invasión intracelular.

Endotoxinas. Las endotoxinas forman parte de la pared celular de las bacterias Gram negativas, estando principalmente constituidas por el lipopolisacárido (LPS), el cual está formado por el lípido A responsable de la toxicidad, y por polisacáridos responsables de la antigenicidad. El aborto es un ejemplo de la acción de la endotoxina en la infección por *Brucella abortus*.(40).

TIPOS DE INFECCION

Las bacterias tienen afinidad por los órganos reproductivos de la hembra y el macho, también se alojan en otros lugares como: ganglios linfáticos que drenen la zona, ganglios linfáticos mamarios, bazo, cápsula y bolsas articulares y la glándula mamaria, siendo excretadas en grandes cantidades. (6,12,24).

AGUDA

En la forma aguda, el útero es invadido aproximadamente a mitad de gestación. Las bacterias colonizan el tejido conjuntivo del alantocorion y penetran en los vasos sanguíneos fetales, ya que se da la producción de un carbohidrato, el eritritol, que es producido por el feto y estimula el crecimiento de *B. abortus*, este existe de manera natural en máximas concentraciones en la placenta y los líquidos fetales. Los polimorfonucleares se acumulan intersticialmente, produciéndose una secreción purulenta. Los macrófagos llenos de bacterias son eliminados por las secreciones uterinas. El aborto se produce debido al deterioro de la circulación fetal como resultado de la infección de la placenta y como consecuencia de las endotoxinas de *Brucella*, produciéndose después del quinto mes de gestación. Esto ha podido ser comprobado experimentalmente al inocular endotoxina, vía intravenosa a cuyes o intraperitoneal a ratas y conejas gestantes produciéndose invariablemente el aborto.

Los fetos abortados están edematosos y en las cavidades torácica y abdominal tienen fluidos serosanguinolentos, presentan bronconeumonía lo que indica una diseminación hematogéna en el feto, más que por aspiración de líquidos fetales contaminados. La placenta está edematosa y tiene lesiones de inflamación y necrosis. Los cotiledones tienen aspecto pálido y granuloso. El corion aparece engrosado.

En hembras gestantes no vacunadas, altamente susceptibles, el signo principal es el aborto. en gestaciones sucesivas suele llegar a término el feto, aunque se registran casos de dos y tres abortos en la misma vaca. Son secuelas frecuentes del aborto la retención de placenta y la metritis.

Deben considerarse sospechosas las lesiones de tipo higromatoso, sobre todo en rodillas. Hay informes de artritis no supurativa de la articulación femoro- tibio- rotuliana en bovinos jóvenes de hatos libres de brucelosis que habían sido vacunados con vacuna de cepa 19 de *B. abortus* (6,7,24,28).

CRONICA

En la forma crónica de la enfermedad, la bacteria vive intracelularmente por lo que el individuo se convierte en portador y permanecen infectados a pesar de que clínicamente no presenten signos, los cuales se desencadenan con la gestación o inmunosupresión del animal.(6,14).

En machos bovinos, el escroto puede aumentar de tamaño. Habitualmente se aprecia una epididimitis unilateral. La túnica vaginal está engrosada debido a fibrosis del tejido conjuntivo. En equinos, la presencia de *B. abortus* suele coincidir con la aparición de tumefacciones bursátiles crónicas en el cuello y la cruz o cojera intermitente causada por la bolsa del navicular. En verracos se produce orquitis, en carneros epididimitis y en perros epididimitis, periorquitis y prostatitis. (19,26,27,28,41).

INMUNOLOGIA DE LA BRUCELOSIS

En bovinos, la diferencia entre el éxito o el fracaso de muchas explotaciones, está dada por el grado de inmunidad del hato y de la capacidad de los expertos responsables de mantener la salud de los animales, mediante el diagnóstico, su utilización en la vigilancia epizootiológica y el adecuado aprovechamiento y manipulación de sus capacidades inmunológicas para la prevención de enfermedades infectocontagiosas. (16).

El sistema inmune representa el medio para que los organismos puedan protegerse del efecto de las sustancias extrañas, reconocerlas y en su caso, eliminarlas o metabolizarlas. Los mecanismos de protección de los bovinos contra las enfermedades infecciosas son amplios y variados. Comprenden la interacción de iones, moléculas, células y tejidos especializados en la inducción, regulación y expresión de la respuesta inmune.

La protección de los individuos contra enfermedades infecciosas es resultado de la acción sinérgica de los mecanismos inespecíficos y mecanismos específicos de defensa.

MECANISMOS INESPECIFICOS

Dentro de los mecanismos inespecíficos se incluyen las barreras anatómicas, piel, por su integridad, pH ácido, la acción germicida de ácidos grasos, la flora normal, la descamación y el sudor y faneras. En el tracto

respiratorio, tenemos los cornetes, el reflejo tusígeno y del estornudo, la secreción del moco rico en lizosima, la flora normal, el aparato muco ciliar y la presencia de macrófagos alveolares. El tracto digestivo a través del epitelio estratificado que recubre la cavidad oral, la presencia de la lizosima, el lavado constante de la saliva y la flora normal, en el estómago el pH ácido, el reflejo del vómito, la flora normal y a nivel intestinal el pH alcalino y el peristaltismo. En el tracto genitourinario, el lavado continuo de orina, la flora normal y la lizosima de sus secreciones. Los mecanismos de la conjuntiva son el lavado por la lágrima y la lizosima.

MECANISMOS ESPECIFICOS

Los mecanismos específicos están dados por el sistema inmune. Como mecanismos específicos entendemos la respuesta del organismo al estímulo de un agente infeccioso, el cual se comporta en este caso como antígeno, por lo cual el sistema inmunológico del hospedero lo reconoce como extraña y reacciona contra él, siendo esta reacción específica ya que al entrar otro agente infeccioso antigénicamente diferente, el hospedero establece una nueva respuesta contra este nuevo agente. (7,26,28,32,40,43,44).

La inmunidad contra las infecciones de *Brucella* es extremadamente compleja debido a la diversidad de factores de virulencia utilizados por la bacteria para incrementar su supervivencia.

La respuesta inmunológica es una secuencia de procesos compleja y regulada, en el cual intervienen varios tipo de células. Se divide esta respuesta en: respuesta humoral y respuesta celular.

RESPUESTA HUMORAL

La respuesta humoral esta dada por linfocitos B, que al ser estimulados por el antígeno se transforman en células plasmáticas que se encargan de producir anticuerpos. Así mismo los linfocitos B se transforman en células de memoria para la protección del hospedero en reinfecciones por el mismo agente.

La brucelas tienen una estructura antigénica compleja; entre los antígenos más importantes están el LPS, el HN, el poly-B, proteínas citoplasmáticas y de membrana externa. Por su localización en la superficie de la célula y su inmunogenisidad, el LPS es el primer antígeno frente al que aparecen anticuerpos (IgM e IgG) tanto en la infección como en la vacunación.

El HN se comporta de manera diferente que el LPS, pues al menos en animales de experimentación, la aparición de anticuerpos precipitantes depende de su intensidad del estímulo antigénico (dosis infectante y virulencia). La vacunación con cepa 19 en terneras menores de 6 meses induce anticuerpos frente al HN, los cuales desaparecen antes de la edad adulta. Por el contrario la infección natural si lo hace, posiblemente por la multiplicación activa de la cepa virulenta causando un estímulo antigénico más intenso y prolongado, proporcionando así el método más específico para diferenciar animales infectados de vacunados con cepa 19.

En los bovinos la aparición de anticuerpos anti-proteínas solubles es, en relación con el LPS, tardía y no existe una correlación entre ambos tipos de anticuerpos. Esta observación indica que los anticuerpos anti-proteína soluble son, en brucelosis animal señal de una infección avanzada.(12,26,40).

RESPUESTA CELULAR

El hecho de que *Brucella spp* es un parásito intracelular facultativo: tiene la propiedad de evitar los sistemas de defensa de los hospederos. Estas bacterias inducen una inmunidad mediada por células T (linfocitos tipo T divididos en varios subgrupos con diferentes funciones), de manera que los anticuerpos séricos y el complemento no pueden hacerles daño y los polimorfonucleares no los pueden reconocer.

Los linfocitos T sensibilizados y macrófagos activados es el factor fundamental para la inmunidad. Los antígenos de brucela se expresan en la superficie de los macrófagos, después de que se procesan los antígenos, junto con productos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En esta configuración los macrófagos interactúan con linfocitos T para producir factores activadores de macrófagos. Se requiere esta serie compleja de procesos para la expresión de inmunidad efectiva contra patógenos intracelulares como brucela.

Esto requiere el desarrollo de un anticuerpo, que pueda incrementar la muerte por su propiedad opsonica o fijadora del complemento, o bien de la inmunidad celular que pueda desencadenar la actividad microbicida de los macrófagos.(10,12,26,27,41).

La respuesta inmunológica al entrar la brucela (antígeno) al organismo, esta es captada, procesada y presentada por células especializadas que se llaman células presentadoras de antígeno, lo anterior es debido a que las células T solo reconocen inmunógenos que están unidos al complejo mayor de

histocompatibilidad (CMH), el cual se encuentra en la superficie de las células.

Cantidades pequeñas del antígeno lo expresan en su superficie, de manera que pueda ser reconocido por los linfocitos T cooperadores específicos para este antígeno. Las células T cooperadoras también se activan y promueven la activación de otros tipos de linfocitos, como son las células B o también los linfocitos T citotóxicos. Durante las diferentes etapas de la respuesta inmunitaria, los linfocitos y las células presentadoras de antígeno se comunican entre sí, interactuando en forma simultánea con otros tipos de células o con componentes del complemento lo que origina la activación de fagocitos.

RESPUESTA HUMORAL EN EL CONTEXTO INFECCIÓN-VACUNACIÓN.

La elección de una prueba serológica para ser aplicada al diagnóstico es necesario tener en cuenta frente a que antígeno queremos detectar anticuerpos. Sin embargo esta información sería incompleta si no consideráramos también que clase de inmunoglobulina (IgM, IgG o IgA) o subclase interesa determinar. Tanto en los animales infectados como en los vacunados con cepa 19 la respuesta humoral incluye la síntesis de anticuerpos de las clases IgM e IgG, sin embargo en la vacunación el nivel de anticuerpos cae rápidamente de tal manera que a los 6 meses no se encuentra IgG₂ y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG₁. En contraste con los animales infectados persisten después de 6 meses altos niveles de IgG₁ e IgG₂. Aunque algunos estudios indican que mientras que la infección y vacunación estimulan la aparición de IgM e IgG frente al LPS, los anticuerpos frente al HN y proteínas citoplasmáticas son IgG.(12).

DIAGNOSTICO

Para el diagnóstico de cualquier enfermedad el procedimiento debe ser: de fácil realización, identificar a todos los animales reactivos y poder diferenciar entre los animales vacunados de los infectados. En brucelosis existe gran cantidad de pruebas diagnósticas, sin embargo, existe la necesidad de desarrollar investigaciones con el afán de incrementar la eficiencia de las técnicas de laboratorio.

Debido al carácter crónico de este padecimiento y el hecho de que los animales pueden estar eliminando al microorganismo en diversas secreciones, aún en ausencia de signos clínicos aparentes, es necesario recurrir al laboratorio para establecer el diagnóstico oportunamente

En la actualidad el diagnóstico inequívoco de la brucelosis bovina es el método directo, el cual consiste en el aislamiento e identificación del agente etiológico a partir de leche, exudados vaginales y tejidos animales. Sin embargo no siempre es posible aislar la bacteria de los animales vivos, en la práctica y sobre todo en las campañas de erradicación, se realiza el diagnóstico mediante métodos indirectos, basados en la demostración de una respuesta inmune frente a antígenos específicos de *Brucella*. Hay que considerar que *B. abortus* es una bacteria intracelular facultativa, capaz de reproducirse tanto extracelularmente como en el interior de los macrófagos y por ello en la respuesta inmune intervienen tanto mecanismos humorales como celulares.(7,10,18,26).

SEROLOGIA

El objetivo de las pruebas serológicas no es solo identificar a los animales que han estado en contacto con el antígeno. Es preciso poder diferenciar los animales que han sido vacunados y están sanos de aquellos que habiendo sido vacunados o no están infectados. Esto es debido a que la vacunación no protege al cien por ciento de los animales. La Campaña Nacional para la Erradicación de la brucelosis contempla diferentes pruebas como oficiales (**Cuadro 2**). Por lo tanto la prueba serológica ideal sería aquella que fuese capaz de diferenciar entre animales infectados de vacunados, simple de realizar y proporcionar los resultados con rapidez y repetibilidad.(10,28).

La diferenciación entre infectados y vacunados se realiza interpretando las pruebas serológicas en función del tipo de inmunoglobulina, el antígeno empleado y el estado del animal.

De las pruebas serológicas empleadas tenemos:

Prueba de tarjeta (PT) o card test. Es utilizada como prueba tamiz o de "screening". En la PT la estructura frente a la cual reaccionan los anticuerpos es el LPS y la clase de inmunoglobulinas que intervienen son las IgM e IgG₁. En bovinos la PT ha sido evaluada por diversos autores (1,10) y se ha demostrado que es la prueba más sencilla y sensible (100%) por lo que no presenta falsos negativos, pero también es la que menos capacidad tiene para diferenciar animales infectados de vacunados con cepa 19 de *B. abortus*.

Por estas razones, aún siendo la prueba tamiz óptima, ha de ser complementada con una prueba posterior confirmatoria en los casos de positividad, ya que presenta alrededor de 32% de falsos positivos.(7,12,41).

Cuadro2
Pruebas oficiales para el diagnóstico de brucelosis.

Brucelosis por especies lisas (<i>B. abortus</i>, <i>B. melitensis</i> y <i>B. suis</i>)		
Prueba	Muestra	Especie
Prueba de tarjeta	Suero	Bovinos, caprinos y ovinos
Prueba de rivanol	Suero	Bovinos
Prueba de fijación del complemento	Suero	Bovino, caprinos y ovinos
Prueba de anillo en leche	Leche	Bovinos y caprinos.
Brucelosis por <i>B. ovis</i>		
Doble inmunodifusión en gel	Suero	Ovinos
Prueba de fijación del complemento	Suero	Ovinos

INDRE/SAGAR1996.Norma Oficial Mexicana NOM-041ZOO-1995.

Prueba del anillo en leche o "Ring test". Esta ha sido y es ampliamente utilizada para detectar hatos infectados, empleándose para estos casos una muestra representativa de la mezcla de la leche de todos los animales del hato. Con esta técnica es posible identificar el 88% de los hatos donde existen animales infectados. El empleo de la prueba de anillo en leche no ha sido recomendada como prueba de diagnóstico individual debido a que existen animales infectados, pero resultan negativos a la prueba. Sin embargo, hay que tener en cuenta que hay animales con infecciones localizadas en ubre, y en los que en su suero sanguíneo no se pueden demostrar anticuerpos específicos. Estos animales eliminan brucelas en leche y en ellos la prueba es positiva. En esta prueba los anticuerpos que intervienen parece ser que pertenecen a las clases IgA e IgM, mientras que el papel de las IgM no está aclarado. Como se emplean suspensiones celulares enteras, dichos anticuerpos reaccionan con el LPS.(12,25).

Fijación del Complemento (FC). La FC es de las pruebas confirmatorias más utilizada, sin embargo es laboriosa se recomienda en animales positivos a la PT, para confirmar el diagnóstico, la prueba identifica IgM e IgG₁ específicas anti - LPS de *Brucella*. Por detectar IgM y ser el LPS

el antígeno responsable de la reacción, la FC no sirve para diferenciar los animales infectados de los vacunados recientemente con cepa 19 de *B. abortus*. La prueba se reporta como positiva con el título correspondiente a la mayor dilución, cuando la FC se realiza en frío son positivos los sueros con título de 1:20 y cuando la FC se realiza en caliente, son positivos los sueros con título de 1:8.(1).

Prueba de Rivanol (RV). Se recomienda su uso solamente en sueros bovinos, es una prueba de tipo cuantitativo complementaria a la PT para aquellos sueros que resultaron positivos a ella, en esta prueba el suero problema se trata con lactato 6,9-Diamino-2-etoxiacridina (reactivo de rivanol) y en una primera etapa precipita la albúmina y la IgM quedando exclusivamente IgG que se pondrá de manifiesto al aglutinar con el antígeno de rivanol (brucelas inactivadas), serán positivos los sueros de animales no vacunados que presenten aglutinación en cualquier dilución (desde 1:25 hasta 1:400), por el tipo de inmunoglobulina que detecta (IgG). En animales vacunados con títulos de 1:25 se consideran sospechosos, y mayor o igual a 1:50 serán positivos.(7).

La Inmunodifusión radial (IDR). Es una prueba que identifica IgG frente al hapteno nativo (determinante antigénico) el cual se incluye, en un gel que es depositado en placas especiales, se le practican unas perforaciones donde se colocan los sueros problema, si algún suero contiene anticuerpos frente al hapteno nativo se desarrolla un halo de precipitación alrededor del pozo indicando positividad a la infección por *Brucella*, en el ganado bovino, esta prueba presenta gran sensibilidad y especificidad. Esta prueba se recomienda realizar cuando se pretenda diferenciar animales con reacciones de anticuerpos vacúnales o por la cepa de campo(5,7,21).

Prueba de ELISA indirecto (ELISA-I). En esta prueba se ha encontrado que usando como antígeno el LPS y se han empleado células completas e incluso cadena O separada del LPS. Es tan sensible como la PT y FC para el diagnóstico de la infección causada por *B. abortus*. Además, al analizar sueros con esta prueba ha resultado más específica para diferenciar animales vacunados de infectados.

Prueba de ELISA competitivo. Esta prueba se basa en el uso de la cadena O del LPS de *B. abortus* como antígeno, conjugado con una poli-L-lisina para darle fijación en una placa y la utilización de anticuerpos monoclonales para que compitan contra los anticuerpos séricos. Es altamente específica ya que se ha evaluado comparándolo con las pruebas de rutina (PT, FC y RV), esta tiene un alto grado de selección entre animales infectados de

vacunados hasta en un 100% que han sido vacunados con dosis reducida de cepa 19 de *B. abortus*, pero cuando los animales han recibido más de una dosis de esta vacuna pierde su capacidad de diferenciar animales infectados de vacunados.(2,3).

PRUEBAS DE INMUNIDAD CELULAR

La inmunidad mediada por células es un mecanismo de defensa de gran importancia frente a las bacterias intracelulares facultativas. El diagnóstico se basa en poner de manifiesto reacciones de hipersensibilidad retardada mediante la inoculación de alérgenos adecuados. La hipersensibilidad retardada es una manifestación de la inmunidad mediada por células que refleja la respuesta de los linfocitos T y macrófagos sensibilizados con antígenos de *Brucella*. En la prueba de la brucelina (skin test), el antígeno son las fracciones solubles que contienen proteínas. Estos antígenos se preparan a partir de cepas rugosas para evitar la contaminación con el LPS, que interferiría con los ensayos al producir una reacción dérmica de hipersensibilidad inmediata que se puede prolongar hasta las 48 hrs. La reacción positiva se caracteriza por la aparición de una zona indurada con eritema a la 24 hrs. alcanzando su máximo desarrollo a las 48 y 72 hrs.. Una prueba alérgica positiva indica que ha existido una invasión de los tejidos por brucelas, pero ello no indica la presencia de la enfermedad activa. Una prueba negativa, no demuestra que el individuo no este infectado; algunos animales han presentado pruebas negativas en fases en que podían aislarse brucelas. es preciso tomar en cuenta en la interpretación de una prueba alérgica los antecedentes de sintomatología y resultados de las pruebas serológicas. Además son positivos los animales vacunados con vacunas vivas y muertas y puede durar la sensibilización por largo tiempo.(1).

BACTERIOLOGIA

El aislamiento de una cepa de *Brucella* implica su identificación y su tipificación. El conocimiento de la especie y el biotipo en cuestión, es importante para el análisis epidemiológico de las fuentes de infección.

El éxito en el aislamiento de *Brucella* depende de la selección y toma adecuada de la muestra más representativa, de su conservación y su correcto envío. Los productos, tejidos u órganos más idóneos para aislar *Brucella* son:

Leche, fetos abortados frescos, cotiledones placentarios, así como bazo, pulmón y contenido abomasal de fetos abortados (en caso de que los fetos estén muy macerados), útero grávido, bazo, testículos, glándula mamaria (porciones de los 4 cuartos), nódulos linfáticos supramamarios, ilíacos internos y retrofaríngeos y secreciones vaginales.

LECHE: La muestra se debe tomar de los cuatro cuartos en condiciones de asepsia, desinfectando con etanol al 70% el meato del pezón. La eliminación por la leche puede ser masiva y continua, poco intensa o intermitente e incluso nula en algunos animales. cuando es masiva puede alcanzar hasta 10^4 bacterias por mililitro de leche.

PRODUCTO DE ABORTO: tomar los cotiledones que parezcan más anormales (de coloración grisácea).

FETOS ABORTADOS: contenido abomasal.

ORGANOS DE ANIMALES SACRIFICADOS: Tomar asépticamente y colocarlos en recipientes estériles.

El transporte y el envío de muestras biológicas es importante ya que el envase: debe ser estéril, si es frasco que sea de boca ancha con pared lisa, transparente, para poder visualizar las lesiones, desechable, para favorecer su eliminación, de cierre hermético, para evitar escurrimientos. Las bolsas de plástico que sean gruesas y deben ir perfectamente selladas. Deben estar bien identificadas con los datos del propietario, el remitente y el tipo de muestra; un buen laboratorio no deberá aceptar muestras sin identificación.

Actualmente existen medios comerciales adaptados para el cultivo de *Brucella*. Entre los más utilizados, las preparaciones deshidratadas de medio base de *Brucella*, base de agar sangre número 2 (Oxoid, Ltd. Inglaterra), agar tripticosa soya (Bio-Mérieux, Francia, y BBL, USA), permiten un crecimiento satisfactorio de ambas cepas. Además existen medios de cultivo selectivos que permiten inhibiendo eficazmente el crecimiento de microorganismos contaminantes, el desarrollo de las colonias de *Brucella*; a estos medios se les añaden colorantes y/o antibióticos debido a que los constituyentes del medio son básicos. los más utilizados son : Renoux, Jones y Brinley-Morgan y Farrell. Este último es el mejor tanto por su poder de selección como por su capacidad de asegurar el crecimiento de los tipos de *Brucella* más exigentes, a excepción de *B. ovis*, que crece mal en este medio.

Este medio está constituido por agar base enriquecido con suero y

glucosa al cual se le añaden por litro de medio : 25,000 UI de bacitracina, 5,000 de polimixina B, 100 mg de ciclohexamina, 20 mg de vancomicina, 5 mg de ácido nalidixico y 100,000 UI de nistatina.(18,19,26,44)

En el caso del aislamiento a partir de leche, está se centrifuga de 3000-6000 rpm. La nata sobrenadante y el precipitado son sembrados sobre las placas de agar con un hisopo; para *B. abortus* es necesario que la incubación de las placas se realice en atmósfera con un 5-10% de CO₂ .

Las colonias aparecen en la superficie del agar luego de 2-3 días de incubación y a los 4 días alcanzan a medir 1.5 mm para *B. abortus* y 1 mm para *B. melitensis*, las colonias son convexas, circulares con bordes netos, de color gris blanquecino y translúcidas. Por encima de los cuatro días, las colonias se hacen mayores, tomando un color miel, pero permanecen translúcidas. En la lupa binocular por iluminación oblicua según el procedimiento de Henry, las colonias presentan un aspecto azuloso y tipo morfológico liso (Smooth) y las colonias rugosas (Rough) son similares a la lisas, pero se diferencian porque tienen una estructura más granulosa, una coloración un poco más amarilla y de consistencia pegajosa.(1,18,19).

El aislamiento de una cepa de *Brucella* implica su identificación y tipificación. Primero se identifica el género; se realizan frotis de los cultivos sospechosos y se tiñen por el método de Gram y coloraciones especiales como la de Stamp y la de Köster modificada. La utilización de los bacteriófagos permite una fácil y rápida diferenciación. La *B. abortus* es lisada por lo fagos tiblisi (Tb), Weybridge (Wb) y Berkeley (Bk₂). Los resultados de algunas de las pruebas se muestran en el **Cuadro 3**.(1,18,44).

PREVENCIÓN Y CONTROL

Para obtener resultados satisfactorios en los programas orientados a prevenir la brucelosis, es necesario establecer sistemas integrales, que contemplen acciones para reducir los focos de infección a los que quedan expuestos los animales de un hato y de una región determinada.

Los programas de prevención, control y erradicación de la brucelosis animal se organizan de acuerdo a lineamientos básicos a nivel internacional. Los diferentes componentes de programa incluyen : diagnóstico y aislamiento, medidas de bioseguridad, vigilancia epizootiologica, identificación de animales infectados, vacunación, sistemas de acreditación sanitaria, educación

Cuadro 3.
Características diferenciales de las especies del género *Brucella* y sus biotipos.

Especie	Biotipo	Oxidasa	Producción de H ₂ S	Ureasa	Crecimiento Tionina 1:25.000	en Tionina 1:50.000	presencia Tionina 1:100.000	de Fucsina 1:50.000	colorantes Fucsina 1:100.000	Aglutinación con sueros monoespecíficos anu-A anti-M
<i>B. melitensis</i>	1	+	-	V	+	+	+	+	+	+
	2	+	-	V	-	+	+	+	+	-
	3	+	-	V	-	+	+	+	+	+
<i>B. abortus</i>	1	+	+	1-2 h	-	-	+	+	+	-
	2	+	+	1-2 h	-	-	-	-	-	+
	3	+	+	1-2 h	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	1-2 h	-	-	+	+	+	-
	5	+	-	1-2 h	-	+	+	+	+	+
	6	+	-/+	1-2 h	-	+	+	+	+	-
	7	+	-/+	1-2 h	-	+	+	+	+	+
	8	+	-	1-2 h	-	+	+	+	+	+
	9	+	-/+	1-2 h	-	+	+	+	+	-
<i>B. suis</i>	1	+	+	0-30m	+	+	+	-	-	+
	2	+	-	0-30m	-	+	+	-	-	+
	3	+	-	0-30m	+	+	+	+	+	+
	4	+	-	0-30m	+	+	+	+	+	+
	1	+	-	0-30m	+	+	+	-	-	-
	1	-	-	Neg	+	+	+	+	+	-
<i>B. neotomae</i>	1	+	+	0-30m	-	-	+	-	-	+

V=variable, H₂S=ácido sulfhídrico
(Alton. Las Técnicas Del Laboratorio En Brucelosis. 1976)

sanitaria, entrenamiento, legislación, investigación, control de la movilización y fondos de emergencia.

PROGRAMA PARA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA BRUCELOSIS.

1.-Diagnóstico. El diagnóstico juega un papel primordial respecto a las actividades de disminuir los focos de infección, de manera que es fundamental utilizar las técnicas serológicas que ofrezcan la mejor correlación de sensibilidad y especificidad, con lo cual se persigue identificar con precisión a los animales infectados, reduciendo la probabilidad de que se registren como positivos a animales en cuyo suero se identifiquen anticuerpos no específicos.

2.-Eliminación o aislamiento de reactivos. La campaña contempla dos programas básicos. Programa de hatos libres y programa de hatos en control. En el primero se obliga al ganadero a sacrificar a los animales reactivos en un periodo de 3 a 10 días posteriores a la fecha en que se comunicaron los resultados. El sacrificio debe hacerse en un rastro autorizado por la SAGAR.

El programa de hatos en control indica el sacrificio de reactivos, y a su vez brinda la oportunidad de aislarlos. El aislamiento puede ser completo (unidades de segregación autorizada), o parcial en el mismo hato a criterio del Médico Veterinario aprobado u oficial. Este aislamiento se podrá realizar por un periodo no mayor a un año, al término del cual los animales serán enviados para su sacrificio a un rastro autorizado.

3.-Desinfección. Cuando se identifica algún animal reactivo este se aísla o se elimina del resto del ganado, siendo necesario se realice la desinfección química de las instalaciones o las áreas en que el animal se alojaba. Realizándose primero la limpieza mecánica para eliminar la materia orgánica. La norma oficial mexicana recomienda los siguientes desinfectantes: solución de Cloruro de cal al 2.5 % de Cloro activo, solución de hidróxido de sodio al 2 %, creolina al 5 % y fenol al 1 %.

4.-Vacunación. En México la Norma Oficial Mexicana para la Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los animales, contempla el uso obligatorio de la vacuna cepa 19 de *B. abortus* en sus dos presentaciones : dosis clásica y dosis reducida. Se ha utilizado la vacuna cepa 19 de *B. abortus*, en la dosis clásica para vaquillas de 4-6 meses de edad y dosis reducida para vaquillas de más de 6 meses y vacas adultas. La NOM marca una revacunación con dosis

reducida en hembras a partir de 18 meses que hayan sido vacunadas con dosis clásica a la edad de 3 a 6 meses.

Los problemas más importantes de la vacunación son los títulos de anticuerpos posvacunales, ya que esto dificulta el diagnóstico de ganado infectado. Si bien la norma no lo registra deja abierta la posibilidad de incluir en el programa oficial nuevos inmunógenos, siempre y cuando se sustente científicamente la efectividad.

Las llamadas fallas vacunales ocurren cuando en los animales se desarrolla la enfermedad a pesar de haber sido inmunizados. Las razones para estas fallas incluyen : los animales se encontraban en período de incubación cuando fueron vacunados; el producto biológico perdió su capacidad inmunogénica (de ahí la importancia de conservarlas dentro de la red fría); el bovino tenía una inmunodeficiencia al momento de la vacunación (tratamiento con corticosteroides) y la dosis infectante fue muy elevada.

El uso de la cepa rugosa viva, atenuada RB51 denominada RB51 de *B. abortus*. Correspondiendo "R" a espera y "B" a *Brucella*, 51 corresponde a la nomenclatura del laboratorio empleada en el tiempo en que fue derivada. La cepa RB51 resulto carente de la cadena "O" siendo muy estable después de múltiples pasajes *in vitro* e *in vivo* a través de varias especies de animales. Debido a su esencial carencia de cadena "O" no induce anticuerpos anti-cadena "O" detectables por la pruebas serológicas empleados en el diagnóstico de la brucelosis, sin importar la edad, dosis o frecuencia de las inyecciones. La inmunidad inducida por la cepa RB51 (al menos 1 año después de la vacunación) es similar o mejor que la inducida por la cepa 19.

La cepa RB51 ha sido aprobada para su uso como la vacuna oficial en los Estados Unidos reemplazando el uso de la cepa 19 y su uso se esta implementando en México. La administración oral de la cepa RB51 en ratones y ganado (Schurig, G.G. 1998) indica que la inmunidad protectora es inducida, abriendo un acercamiento práctico a la inmunización de animales silvestres.

5.-Control de movilización de animales. Es vital para el éxito o fracaso de los programas de control de la *Brucella* el tener bajo vigilancia la movilización de los animales, considerando el área de origen y el destino, así como el motivo de la movilización. Todos los animales procedentes de hatos libres se pueden movilizar en el territorio nacional sin restricción alguna, en referencia a brucelosis; en contraste los procedentes de hatos en control, se

autoriza solo su traslado dentro de zonas en control y con el fin de ser llevados a unidades de aislamiento o al rastro.

En el caso de animales domésticos no se recomienda tratamiento alguno, ya que la bacteria es un parásito intracelular facultativo que invade a las células del sistema reticuloendotelial donde no es factible llevar los antibióticos a niveles terapéuticos.(13, 14, 15, 16, 31, 33, 36,38).

SALUD PUBLICA

La brucelosis humana es una zoonosis auténtica. El contagio se produce por contacto directo con animales infectados y sus productos o en los ambientes contaminados por ellos. El principal peligro radica en el consumo de leche cruda o de productos lácteos (queso, mantequilla).Las personas expuestas por su profesión (labradores, veterinarios, carniceros) están muy amenazadas en las regiones endémicas.

La brucelosis se presenta como una infección localizada o sistémica. La expresión clínica puede ser breve y autolimitada, caracterizada por una fase bacterémica aguda o grave y prolongada, acompañada de toxemia, seguida por una fase crónica que puede durar años. El periodo de incubación es generalmente de 2 a 3 semanas, aunque llega a ser de 3 a 4 meses. Por ello y porque no existen signo o síntomas característicos de la enfermedad, se debe sospechar de brucelosis en aquellos individuos que :

Sean originarios de zonas endémicas, tengan antecedentes recientes de permanencias en zonas endémicas, hayan tenido contacto estrecho con animales de zonas endémicas, hayan ingerido productos lácteos no pasteurizados de origen dudoso y presenten uno o más de los siguientes síntomas : debilidad, malestar, cefaleas y dolores articulares con fiebre ondulante y sudoración durante la noche. Una alteración frecuente es también la esplenomegalia.

La mayoría de casos se basan sobre pruebas serológicas más que en el aislamiento del microorganismos.Los casos severos de brucelosis aguda se tratan en el hospital, dado que requieren de terapia de apoyo y de un seguimiento cuidadoso del tratamiento. Los casos menos severos pueden tratarse ambulatoriamente. Los antimicrobianos de elección en adultos son la tetraciclina y la estreptomycin, en las mujeres embarazadas, niños y ancianos se recomienda rifampicina y trimetoprim-sulfametoxazol y en recaídas o

falta de una pronta recuperación se indica el uso de doxiciclina y rifampicina. Hasta la fecha no se dispone de una buena vacuna para uso en humanos.(19, 23, 37)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL :

Determinar mediante diversas pruebas diagnósticas, tanto oficiales como experimentales, si los anticuerpos que se presentan son debidos a infección o a la vacunación en bovinos revacunados con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS :

a) Determinar si es posible diferenciar animales vacunados de infectados mediante las pruebas serológicas de tarjeta (PT), Fijación del complemento (FC'), Rivanol (Rv) e Inmunodifusión radial (IDR).

b) Aislar el agente etiológico y determinar el biotipo a través de muestras de leche y exudados vaginales (hisopo vaginal) de vacas positivas a PT, FC' e IDR.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 100 vacas lecheras de la raza Holstein, que se encontraban positivas a la prueba de tarjeta para diagnóstico de brucelosis, en diferentes estados de producción y algunas de ellas recién paridas. El ganado muestreado pertenece a 25 diferentes establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca en el Estado de Hidalgo (CAIT).

El C.A.I.T. fue creado en 1973; teniendo como objetivo la descentralización de las explotaciones lecheras del Distrito Federal. Se encuentra localizado al sur del estado de Hidalgo, en el municipio de Tizayuca, en las coordenadas 19°51'25" latitud norte y 98°59'08" longitud oeste, en el municipio de Tizayuca Hidalgo, con un clima BSkw (según Koepen, tipo semiseco templado con lluvias en verano), una precipitación pluvial anual de 624.9 mm y una temperatura media anual de 16.3 °C. Contando con una superficie de 208 Ha., ocupando el 2.25% de superficie del municipio.

Para 1997 el C.A.I.T. cuenta con un total de 126 establos, de los cuales 118 se encuentran en operación, 21 se utilizan para cría y para vacas secas y 97 para la producción de leche. Y se encuentran 8 establos vacíos. Existe una población estimada de 24,985 vacas, con una producción en línea promedio de 21 Lts. y una producción diaria de aproximadamente 400,000 Lts.

MUESTREO

Se obtuvieron muestras de sangre de vena coccígea mediante tubos al vacío los cuales, después de obtener la coagulación, fueron centrifugados a 3000 r.p.m. durante 5 minutos, para de esta forma separar el suero, vaciándolo en viales, guardándose en congelación; estos muestreos se realizaron en diferentes fechas conforme se encontraron a los animales positivos a la PT.

También se recolectaron muestras de exudado vaginal, con un hisopo vaginal, colocando la muestra en un medio de Stuart (medio de transporte); en el laboratorio bajo medidas de seguridad (utilización de bata, guantes, cubre boca, caretas, gafas, mechero de Bunsen), se sembraron en Medio selectivo de Farrell. Contenido en cajas de petri y se incubaron en un frasco de cristal bajo condiciones parciales de CO₂ (5 – 10 %) a 37°C durante por lo menos 8 días en una estufa bacteriológica. Observando el crecimiento cada tercer día.

Se muestreo leche de vacas en lactación de los 4 cuartos de la glándula

mamaria, previa asepsia y meato del pezón utilizando alcohol al 70 %, colectándose la muestra en tubos Falcón estériles de 20 ml. La leche se centrifugó a 6,000 rpm durante 15 min. Obteniendo el sobrenadante (nata - parte grasa) y el sedimento. Se sembró la nata en medio selectivo de Farrell, con hisopos de algodón estériles, bajo medidas de seguridad de laboratorio de bacteriología, se incubaron bajo condiciones parciales de CO₂ (5 - 10 %) a 37 °C durante 8 días.

De las colonias sospechosas se realizaron frotis para posteriormente hacer la tinción de Gram y después se resembraron en medio de *Brucella*, para la identificación de la morfología colonial. Para determinar su especie y biotipo, se realizaron pruebas bioquímicas de : citrato, oxidasa, urea, TSI y producción de H₂S; también se llevo a cabo la prueba de dependencia de colorantes, la reacción con antisueros monoespecíficos, la fagotipificación y la sensibilidad a los antibióticos.

Se remitieron parte de los sueros al Centro Nacional de Salud Animal (CENASA), para la realización de la prueba de Fijación del complemento. Localizado en el municipio de Tecamac en el Estado de México.

Las pruebas serológicas de Tarjeta, Rivanol e Inmunodifusión Radial y bacteriológicas como citrato, TSI, urea, H₂S, medio de SIM y oxidasa; se realizaron en el CENID-Microbiología, INIFAP SAGAR (carretera federal México -Toluca KM 15.5 col. Palo alto, delegación Cuajimalpa D.F.).

Las pruebas bacteriológicas para la tipificación de las bacterias de :dependencia de colorantes, reacción con antisueros monoespecíficos, fagotipificación y sensibilidad a antibióticos fueron realizadas en el CENID-Microbiología, con la colaboración de la QFB Laura Hernández Andrade y la MVZ Rosa María Reyes Palacios.

Tomándose en cuenta que nuestros resultados fueron variables discretas, como método estadístico se eligió hacer un análisis de Kappa, extraído del programa EPI-INFO, para comparar proporciones entre pruebas, con el fin de establecer la concordancia entre estas.

DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS.

PRUEBA DE TARJETA

En la PT la actividad de los anticuerpos que aglutinan inespecíficamente a las brucelas lisas desaparecen a pH de 3.6, mientras que se mantienen la de los anticuerpos específicos. En esta prueba se emplea un antígeno celular teñido con Rosa de Bengala y tamponado. Es un procedimiento cualitativo rápido de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución. En la PT, la estructura frente a la cual reaccionan los anticuerpos es el LPS. En bovinos se ha demostrado que es la prueba más sencilla y sensible, por lo que no presenta falsos negativos pero también es la que menos capacidad tiene para diferenciar animales infectados de vacunados.(12)

Se colocaron 30µl de cada muestra de suero con una micropipeta en una placa, se les colocó una gota (30 µl), de antígeno de *Brucella abortus* (aba test tarjeta paquete celular de *Brucella abortus* cepa 1119-3 inactivada por calor coloreada y concentrada al 8% y con un pH a 3.5. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) se mezcló el suero con el antígeno por 4 minutos con una rotación suave de la placa; la presencia o ausencia de aglutinación indicaron si la prueba era positiva o negativa.(10)

FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (FC).

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

La FC es de las pruebas confirmatorias más utilizadas, sin embargo es laboriosa, difícil de estandarizar y no puede realizarse con sueros hemolisados o con poder anticomplementario.(12)

RIVANOL

Se mezclaron 0.4ml de solución de Rv, con 0.4ml de suero, se dejó reposar durante 30 min. y posteriormente se centrifugaron a 3000 r.p.m.

durante 5 minutos. Se tomo el sobrenadante con una pipeta y se hicieron las diluciones correspondientes (0.08,0.04,0.02,0.01 y 0.005ml) sobre una placa de vidrio, se le agregaron 30 μ l de antígeno para prueba de Rv (aba test rivanol en placa, paquete celular de *Brucella abortus* cepa 1119-3 inactivada por calor, coloreada y concentrada al 4%. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios), se mezclaron de menor a mayor concentración, se agitaron 4 veces y se dejó reposar durante 6 minutos posteriormente se observó en una fuente de luz y se realizó la lectura. Expresándose el resultado en función de la dilución más alta en la que se observa la aglutinación.(10)

INMUNODIFUSIÓN RADIAL

La IDR por sus sencillez de realización, rapidez en la lectura de los resultados y especificidad, la cual ha sido recomendada para aquellos animales que excretan brucelas siendo los más peligrosos desde el punto de vista epidemiológico (21). La prueba se realizó en un medio hipertónico (10% NaCl) y utilizando un soporte de gel de agarosa conteniendo una solución amortiguadora de pH, en el que fue agregado el *hapteno nativo* (HN) de 16M de *B. melitensis* (determinante antigénico), en una concentración de 1 μ g/ml. Se elaboró de la siguiente manera:

- a) solución madre de antígeno (poly B Z0PPNH)
10 mg de antígeno en 10ml de agua destilada. Quedando a una concentración de 1 μ g/ml.
- b) solución IDR de gel
50ml de agua destilada
1.1 gr de agarosa
- c) Buffer glicina
500ml de agua destilada
7.13 grde glicina
5.75 gr de NaCl
Ajustar a pH de 7.8 con Hidróxido de sodio (NaOH).

Muy importante. Para su utilización en IDR se añade 20 gr de NaCl por cada 100ml.

El gel se prepara a+b+c A razón de:
ml de a + ml de c = ml de b

Para 10 placas de IDR a una concentración de 15 μ g/ml

10 placas por 1.7 ml de volumen del gel en nuestras placas = 17 ml que debemos preparar. Por cada ml debe de haber 15 μ g de antígeno luego precisamos.

17x15= 255 ug de antígeno solución madre (a) tiene 1 μ g/ μ l de donde se

deduce que añadir 255 μ l (0.255 ml) de antígeno.

Luego $0.255 \text{ ml} + b + c = 17 \text{ ml}$

$0.255 \text{ ml} + c = 8.5 \text{ ml}$ de gel de agarosa

$c = 8.245 \text{ ml}$ de buffer glicina.

Lo anterior se calentó en baño maría a una temperatura de 60°C tomándose a esa temperatura con una pipeta y se depositó en portaobjetos limpios y desengrasados, la cantidad necesaria para dar un espesor de 2mm. Una vez solidificado y dejando pasar 24 hrs antes de utilizarlo se le realizaron perforaciones con un sacabocados (6 mm de diámetro) y con una separación entre ellos de 3 mm. Antes de realizar la prueba a los sueros se dejaron a temperatura ambiente. Después se colocaron los sueros problema, y se incluyó un control positivo y uno negativo, se dejaron incubar por 24 hrs. a temperatura ambiente. Si algún suero contenía anticuerpos frente al HN desarrollaba un anillo de precipitación alrededor del pozo entre dos y seis horas, dando una prueba positiva. (8,12).

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FARRELL.

Se preparó la base de agar *Brucella* (Agar *Brucella* Bioxon), en una proporción de 23g/l de agua destilada se mezcló y se puso a calentar hasta que disolvió, se esterilizó en autoclave, se suspendió el suplemento selectivo de antibióticos (25,000 U.I. bacitracina, 5,000 U.I. de polimixina B, 100 mg de ciclohexamida, 20 mg de vancomicina, 5mg de ácido nalidixico y 100,000 U.I. de nistatina) en 10ml de los cuales el 50% es agua destilada estéril y 50% de metanol (para diluir antibióticos liposolubles), manteniéndose de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Por cada 500ml de medio se añadieron 10 ml del suplemento selectivo. Se homogeneiza procurando no hacer burbujas y se distribuyen en cajas de petri.(19).

IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS

MEDIO DE CITRATO DE SIMMONS

Se sembró por estría en la superficie. Observando la falta de utilización de este substrato como fuente de carbono, por la ausencia de crecimiento.(19)

MEDIO DE TSI

Se sembró por picadura y estria, se incubo a 37⁰C por 48 h. Observando la ausencia de fermentación de glucosa y lactosa al no observarse cambio en la coloración del medio.(2,19)

MEDIO DE UREA

En un medio base (base agar urea Bioxon), se agregó una solución de urea al 5%, y un indicador de pH (rojo de fenol), este fue vaciado en tubos de ensaye y se dejaron solidificar en forma inclinada. Se sembró por estria en la superficie. Se midió el tiempo que tarda en variar el color del medio que es indicativo de utilización de urea como fuente de nitrógeno por algunas especies, a partir del momento que se sembró en el tubo.(2,19)

PRUEBA DE ÁCIDO SULFHIDRICO

En un tubo inclinado con agar soya tripticasa se sembró en la superficie por estria y se le coloco una tira de papel filtro impregnado con acetato de plomo, sujeto por la contratapa. El papel no debe tocar la superficie de agar, se incubó por 48 h a 37°C, se cambio diariamente y se observo la aparición de un color negro en el extremo de la tira debido a la producción de H₂S.(1,19)

MEDIO DE SIM

Se sembró por picadura, se observo la inmovilidad de las brucelas y la ausencia de la producción de indol. El indol es un bencilpirrol producto de la degradación del triptófano. Las bacteria que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar al triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco. La prueba esta basada en la formación de un complejo de color rojo el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído.(19)

PRUEBA DE OXIDASA

Se impregnó un papel filtro con clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 0.5% y se le depositó una colonia. La aparición de una mancha de color púrpura sobre el papel filtro significó una prueba positiva. La

prueba de oxidasa se basa en la producción bacteriana de la enzima oxidasa. Dicha reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por oxígeno molecular, el que actúa a su vez como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

Las bacterias anaerobias obligadas carecen de actividad oxidasa ya que no pueden crecer en presencia del oxígeno atmosférico y no poseen el sistema citocromooxidasa(2,19).

Los resultados de las pruebas de **dependencia de colorantes, reacción con sueros monoespecíficos, fototipificación y sensibilidad a antibióticos**, se muestran en el Cuadro 7.

RESULTADOS

**RESULTADO GENERAL DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS Y AISLAMIENTO
PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN VACAS HOLSTEIN
REVACUNADAS CON DOSIS REDUCIDA DE CEPA 19 DE *B. abortus*.**

ESTABLO	VACA	EDAD	MESES PR	MUESTRA P/ AISLAMIENTO LECHE		PT	FC	RV	IDR	A
					E.V.					
1	10	5 años 10 meses	48	X	X	+	1:40	1:400	+	
1	11	5 años 11 meses	52	X	X	+	1:320	1:400	+	
1	18	3 años 11 meses	27	X	X	+	1:80	1:400	+	
1	42	3 años 10 meses	27	X	X	+	1:320	1:400	+	
1	122	2 años	15	X	X	+	1:320	1:400	+	
1	149	2 años	15	X	X	+	1:320	1:400	+	
1	437	2 años	15	X	X	+	1:80	1:400	+	
2	126	1 año	8	V.S.	X	+	1:20	1:25	-	
2	815	1 año	8	V.S.	X	+	-	-	-	
3	823	6 años 10 meses	60	X	X	+	1:10	-	+	
3	909	2 años 10 meses	12	X	X	+	1:20	1:400	+	
4	537	1 año 10 meses	1	X	X	+	1:40	1:400	+	
5	123	4 años	24	X	X	+	1:320	-	-	
5	180	3 años 6 meses	23	X	X	+	1:320	1:400	+	*
5	341	1 año	1	V.S.	X	+	1:80	1:400	+	
5	369	2 años	11	X	X	+	1:160	1:400	+	
6	380	3 años	23	X	X	+	1:320	1:400	+	
6	569	3 años 10 meses	22	X	X	+	1:10	1:50	+	*
6	631	4 años 9 meses	36	X	X	+	1:320	1:400	+	
6	632	2 años	12	X	X	+	-	-	+	
7	119	3 años	15	X	X	+	1:20	1:100	-	
7	225	2 años 6 meses	11	X	X	+	1:20	1:400	-	
8	393	2 años	15	X	X	+	1:20	1:50	+	
8	611	8 años 6 meses	90	X	X	+	1:40	1:200	+	
8	747	5 años 6 meses	48	X	X	+	1:20	1:200	+	
9	499	2 años	11	V.S.	X	+	1:20	-	-	
10	6	3 años 10 meses	23	X	X	+	1:20	1:400	-	
10	690	3 años	23	X	X	+	1:10	1:50	-	
10	830	2 años	10	X	X	+	1:10	1:25	-	
11	555	4 años	32	V.S.	X	+	-	-	+	
11	610	3 años 6 meses	12	X	X	+	1:320	1:400	+	*
11	858	3 años	23	V.S.	X	+	1:20	1:400	-	
12	215	2 años	6	X	X	+	1:320	1:400	+	
13	365	2 años 6 meses	8	V.S.	X	+	1:40	1:400	+	
13	386	2 años 6 meses	12	X	X	+	1:20	1:100	-	
14	93	4 años	36	X	X	+	1:80	1:25	+	
15	45	4 años	35	X	X	+	1:40	1:400	+	
15	127	3 años	23	X	X	+	1:320	1:400	+	
15	284	7 años 10 meses	87	X	X	+	1:320	1:400	+	*
15	297	2 años	6	X	X	+	1:320	1:400	+	
15	299	6 años 6 meses	58	V.S.	X	+	1:320	1:400	-	
15	315	6 años	60	X	X	+	1:160	1:400	+	
15	338	4 años	30	X	X	+	1:40	1:100	+	
15	340	3 años 6 meses	22	X	X	+	1:320	1:400	+	
15	346	5 años	48	V.S.	X	+	1:160	1:400	+	

CONTINUACIÓN

ESTABLO	VACA	EDAD	MESES PR	MUESTRA PAISLAMIENTO LECHE E.V.		PT	FC	RV	IDR	A
15	356	3 años 6 meses	23	X	X	+	1:320	1:400	+	
15	379	2 años	6	X	X	+	1:40	1:400	+	
16	840	2 años	12	X	X	+	1:320	1:400	-	
17	1056	1 año 10 meses	1	X	X	+	1:40	1:400	-	
18	41	2 años	1	X	X	+	1:40	-	-	
18	160	3 años	24	X	X	+	1:40	1:100	+	
18	161	3 años	24	X	X	+	1:320	1:400	+	
18	164	3 años	20	X	X	+	1:320	1:400	-	
18	165	3 años	24	X	X	+	1:160	1:400	-	
18	189	3 años	19	X	X	+	1:40	1:200	-	
18	334	2 años	7	V.S.	X	+	1:320	1:400	+	
18	365	2 años	3	X	X	+	1:40	1:40	+	
18	985	3 años	1	X	X	+	1:80	1:400	-	
18	7948	7 años	72	X	X	+	1:320	1:400	+	
19	203	4 años 6 meses	32	X	X	+	1:40	1:400	+	
19	233	3 años 6 meses	24	X	X	+	1:20	1:200	-	
19	253	2 años	10	X	X	+	1:5	1:400	-	
19	271	3 años	17	X	X	+	1:80	1:400	+	
19	277	3 años 10 meses	17	X	X	+	1:40	1:400	+	
19	284	2 años 6 meses	12	X	X	+	1:320	1:400	+	
19	289	3 años	6	X	X	+	1:160	1:400	+	
19	338	2 años	11	X	X	+	1:40	1:400	+	
19	372	2 años 6 meses	12	X	X	+	1:160	1:400	+	
19	388	2 años 6 meses	10	X	X	+	1:20	1:400	+	
19	428	3 años 6 meses	12	X	X	+	1:160	1:400	+	
19	441	3 años 6 meses	23	X	x	+	1:80	1:400	+	
19	582	3 años	22	X	X	+	1:160	1:400	+	
19	866	3 años	21	X	X	+	1:160	1:400	+	
19	983	4 años 6 meses	36	X	X	+	1:20	1:400	+	
20	613	2 años 10 meses	6	X	X	+	1:320	1:200	-	
21	84	4 años	33	x	x	+	1:40	1:400	+	*
21	197	3 años 6 meses	23	X	X	+	1:320	1:400	+	
21	199	3 años	23	X	X	+	1:20	1:50	+	
21	251	3 años	22	X	X	+	1:320	1:400	+	*
21	261	3 años	22	X	X	+	1:40	-	-	
21	405	3 años	10	X	X	+	1:80	1:400	+	*
21	412	2 años	7	X	X	+	1:80	1:200	+	*
21	436	2 años	3	X	X	+	1:40	1:400	+	
21	447	2 años	4	X	X	+	1:5	1:25	-	
21	465	2 años	4	X	X	+	1:40	1:400	-	
21	470	2 años	1	X	X	+	1:40	1:400	-	
22	635	7 años 6 meses	72	X	X	+	1:320	1:400	+	
22	648	7 años 6 meses	68	X	X	+	1:160	1:400	+	
22	699	6 años	51	X	X	+	1:80	1:400	+	
22	757	5 años 6 meses	44	X	X	+	1:320	1:400	+	
22	761	5 años 6 meses	41	X	X	+	1:160	1:400	+	
22	785	4 años 10 meses	36	X	X	+	1:320	1:400	+	
22	826	3 años 6 meses	24	X	X	+	1:80	1:100	+	

CONTINUACIÓN

ESTABLO	VACA	EDAD	MESES PR	MUESTRAS P/AISLAMIENTO		PT	FC	RV	IDR	A
				LECHE	E. V.					
22	868	2 años	15	X	X	+	1:160	1:400	+	*
22	889	2 años	12	X	X	+	1:20	-	+	
23	605	4 años	36	X	X	+	1:50	1:200	+	
24	248	2 años	16	X	X	+	1:320	1:400	+	
24	36	3 años 10 meses	12	X	X	+	-	1:100	+	*
25	22	3 años 6 meses	24	X	X	+	1:40	1:100	+	
25	54	7 años	72	X	X	+	1:20	1:100	+	

PR= posrevacunación.

E. V.= Esudado Vaginal.

V.S.= Vaca Seca.

PT= Prueba de Tarjeta.

FC= Fijación del Complemento.

IDR= Inmunodifusión Radial.

A= Aislamiento.

X= Muestra.

*= Positivo a aislamiento.

El criterio de inclusión de las vacas revacunadas en este trabajo, es que fueran positivas a la prueba de tarjeta. Al realizarle a los sueros de estas vacas las pruebas confirmatorias de FC, RV e IDR, se encontraron los resultados plasmados en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4
**Porcentaje de Vacas revacunadas con cepa 19 de *Brucella abortus*,
 positivas y negativas a las diferentes pruebas diagnosticas para brucelosis
 bovina.**

PRUEBAS	RESULTADO	PORCENTAJE %
Prueba de tarjeta	Positivos	100
Prueba de tarjeta	Negativos	0
Fijación del complemento	Positivos	52
Fijación del complemento	Negativos	48
Rivanol	Positivos	87
Rivanol	Negativos	13
IDR	Positivos	74
IDR	Negativos	26

IDR = Prueba de Inmunodifusión Radial
 n = total de animales muestreados 100

El resultado de IDR que se obtuvo fue positivo en un 74 % de las vacas y de las muestras de leche obtenidas de estas vacas, se logró el aislamiento de 10 cepas de *Brucella abortus* biotipo 1, lo que sugiere que los anticuerpos que presentan estas vacas son debidos a la cepa de campo. En el **Cuadro 5** se muestran los resultados de las 74 vacas positivas a IDR y a las diferentes pruebas serológicas oficiales, expresado en porcentaje, mostrando el comportamiento de estas pruebas a la detección de anticuerpos por cepa de campo.

Cuadro 5

Total de Vacas positivas a las diferentes pruebas serológicas a distintos meses posrevacunación, expresado en porcentaje.

MESES POS-REVACUNACION	PRUEBA DE TARJETA	PRUEBA DE FC	PRUEBA DE RIVANOL	PRUEBA DE IDR	TOTAL DE ANIMALES
1-10	100.0	53.8	100.0	100.0	13
11-20	100.0	61.1	88.8	100.0	18
21-32	100.0	66.6	95.2	100.0	21
33-51	100.0	53.8	92.3	100.0	13
52-90	100.0	66.6	88.8	100.0	9
					74

Total de animales muestreados = 100

Animales infectados por cepa de campo 74 %

FC= Fijación del complemento

Del 26% de las vacas negativas a IDR se obtuvieron resultados positivos a las pruebas de PT, FC y Rv a distintos meses posrevacunación (Cuadro 6). En vacas de entre 11 y 20 meses posrevacunación resultaron positivas a la prueba de PT en un 100%, FC 25% y Rv 75%; de estas vacas no se logró ningún aislamiento de la bacteria tanto de muestras de leche como de exudado vaginal.

Cuadro 6

Vacas negativas a IDR, con resultado positivo a PT, FC y Rv a diferentes días posrevacunación.

MESES POS REVACUNACION	PRUEBA DE TARJETA	PRUEBA DE FC	PRUEBA DE RIVANOL	TOTAL DE ANIMALES
1-10	100.0	20.0	50.0	10
11-20	100.0	25.0	75.0	8
21-32	100.0	28.5	71.4	7
33-51	0	0	0	0
52-90	100.0	100.0	100.0	1
				26

FC = Fijación del Complemento

Los resultados de las pruebas bioquímicas muestran que las cepas aisladas de las muestras de leche son *Brucella abortus* biotipo 1, ya que

resultaron negativas a las pruebas de TSI y citrato; positivas a las pruebas de oxidasa, producción de H₂S y ureasa; hubo crecimiento en presencia de colorantes fucsina y safranina en todas sus concentraciones, además de reaccionar con el antisuero inmunoespecífico A y presentar lisis en presencia de los fagos Iz, Wb y Tb.. Estos resultados se muestran en el Cuadro 7.

En el muestreo con el hisopo vaginal, no se pudo obtener el aislamiento de ninguna de las muestras.

El análisis estadístico de Kappa no muestra diferencias significativas entre las pruebas. Demostrando que no hay concordancia entre las pruebas serológicas utilizadas.

Cuadro 7

Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a 10 cepas aisladas a partir de 90 muestras de leche.

ESTABLO	VACAS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS				CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE COLORANTES.						AGLUTINACION DE SUEROS MONOESPECIFICOS		
		OXIDASA	PROD. DE H ₂ S *	UREASA	SAFRANINA 100 mg/ml	TIONINA 40 mg/ml	TIONINA 20 mg/ml	TIONINA 10 mg/ml	FUCSINA 20 mg/ml	FUCSINA 10 mg/ml	MONOESPECIFICOS ANTI A	ANTI M		
5	180	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
11	610	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
15	284	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
24	36	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
19	428	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
21	251	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
22	868	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
19	866	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
21	405	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
6	569	+	+	1-2 h	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-

*= 48 hrs.

PRUEBA DE FAGOTIPIFICACION. Las 10 cepas presentaron lisis en presencia de los fagos Iz, Wb y Tb.
 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS. La cepas sembradas en el medio que contenia 5 UI /ml de penicilina, resultado positivo (usualmente positiva en primoaislamiento) en las 10 cepas.

DISCUSIÓN

Reyes (1996). En un trabajo realizado en la FES-C con becerras de entre 4-6 meses vacunadas con dosis clásica de *B. abortus*, encontró que las pruebas tradicionales (PT, Rv y FC) muestran su máxima especificidad al día 270 posvacunación siendo del 95% y que la prueba de IDR al día 60 posvacunación da el 100% de especificidad (35). En el presente trabajo en el cual se utilizaron vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus* se encontró que a mas de 960 días posrevacunación las pruebas serológicas de PT, FC y Rv se presentan resultados positivos, de dichas vacas no se logró el aislamiento. Esto se atribuye a que en la revacunación hay una respuesta de segundo orden, la cual se incrementa habiendo una producción de IgG en grandes cantidades, mientras que IgM se encuentra en menor cantidad; y dichas inmunoglobulinas (Ig) son detectadas por las pruebas serológicas empleadas.

Durante 1980 Jones y col. encontraron que la prueba de IDR, al compararla con la prueba de FC en animales vacunados en edad adulta con cepa 19 de *B. abortus* demostró ser más sensible y específica (21).. En este trabajo del 26% que fue el total de animales negativos a IDR, resultaron 2 vacas positivas a FC a mas de 21 meses posrevacunación, representando un 7.6% del total de vacas negativas a IDR. Esto es debido a que IDR es una prueba que tiene la capacidad de detectar a los individuos que no presentan la enfermedad (especificidad). Berman y Jones (1979) observaron que el *hapteno nativo* (HN) 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 HN es un antígeno de tipo intracelular por lo que 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 HN y no cuando se trata de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de una revacunación con cepa 19 de *B. abortus*, desapareciendo a los 6 meses, lo cual la hace una prueba de gran importancia para diferenciar animales infectados de vacunados y en la toma de decisiones para que un animal sea eliminado.

La PT es la prueba tamiz para el diagnóstico de la brucelosis bovina según la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995). Suárez (1993) describe a la PT en el caso de la revacunación 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 positivos. Esto puede observarse en este trabajo ya que a pesar de que todas las vacas muestreadas eran positivas a la PT, pero al realizar las diferentes pruebas diagnósticas oficiales y la prueba de IDR existieron resultados negativos, indicando que la PT no es suficiente para dar un diagnóstico definitivo.(36,41).

Paez y col. (1991) En un experimento vacunaron 300 vacas criollas con cepa 19 de *B. abortus* en donde eran comunes los abortos por *Brucella*, los autores concluyen que al primer mes siguiente de la vacunación un 99.3% reaccionaron positivos a la PT y solo el 5.4% reacciono al 6to mes (32). En este trabajo que se realizó con vacas revacunadas con dosis reducida de *B. abortus* cepa 19 y positivas a la PT en un 100% a más de 20 meses posrevacunación, se realizó la comparación de IDR para descartar la presencia de anticuerpos hacia la bacteria y de esta forma hacer notar que la PT a mas de 6 meses detecta anticuerpos posrevacunación. Demostrando que dicha prueba no es confiable su diagnóstico y menos en zonas de alto riesgo.

Reyes (1996) menciona que la prueba de Rv tiene una especificidad del 95% a los 270 días posvacunación, mientras que Díaz (1997) encontró que en la revacunación la prueba de Rv es poco efectiva al diferenciar animales vacunados de infectados ya que a los 270 días posrevacunación se observó una especificidad del 85% (35). En este trabajo se encontró que la prueba de Rv detecta anticuerpos vacúnales a más de 20 meses posrevacunación, por lo que no se considera a esta prueba efectiva para diferenciar animales vacunados de infectados.

La Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995) (36) contra la brucelosis indica que para el caso de bovinos se utilizará la PT como tamiz, la prueba de FC como confirmatoria y la prueba de Rv para diferenciar animales vacunados de infectados, marcando que para el caso de animales vacunados tanto con dosis normal como reducida las pruebas se realizarán 10 meses después de la vacunación. Aunque la NOM contempla una revacunación única con dosis reducida de cepa 19, no menciona nada sobre las pruebas diagnósticas, ni el tiempo en que deben utilizarse. De acuerdo a este estudio todavía hay muchos animales que presentan falsos positivos aun después de los 10 meses después de la revacunación, con lo que el diagnóstico de estos animales a través de las pruebas oficiales sería poco confiable. Con respecto a la prueba de Rv que es la oficial para diferenciar entre animales vacunados de infectados tampoco tiene una especificidad muy aceptable por su gran cantidad de falsos positivos. Por lo que la IDR puede resultar una buena alternativa para diferenciar animales infectados de aquellos con más de una revacunación.

Aparicio 1997 realizó una evaluación bacteriológica de un hato bovino con problemas de brucelosis en el estado de México. Las vacas eran procedentes del estado de Hidalgo, las pruebas bioquímicas indicaron que las cepas aisladas de muestras de leche son *B. abortus* biotipo 1 ya que resultaron

positivas a las pruebas de producción de H₂S y urea y negativa a la prueba de TSI y se hubo crecimiento en presencia de colorantes fucsina y safranina, además de reaccionar con el antisuero inmunoespecífico A y presentar lisis en presencia de los fagos Iz, Wb, Tb; confirmando el tipo de cepa por crecimiento en presencia de antibióticos que resulto positivo.(3). En el presente trabajo, en el cual se muestrearon vacas pertenecientes al municipio de Tizayuca en el estado de Hidalgo, de estas vacas se obtuvo leche y exudado vaginal, para intentar el aislamiento del agente etiológico; solo se logro el aislamiento a partir de muestras de leche, para la determinación de especie y biotipo. Se corrieron las pruebas bioquímicas de ureasa, producción de H₂S, TSI, crecimiento en presencia de colorantes, aglutinación con sueros monoespecíficos (anti A y anti M) y fagotipificación (Iz, Wb, Tb).Obteniendo los mismos resultados que el trabajo antes mencionado. Determinando que se trataba de *B. abortus* biotipo 1 cepa de campo.

CONCLUSIONES

- Las pruebas oficiales que marca la NOM no son útiles en el caso de la revacunación, ya que en animales de más de 10 meses aun se encuentran falsos positivos, siendo necesaria una prueba más específica para diagnosticar animales vacunados de infectados.

- La prueba de IDR es una buena opción para poder diagnosticar animales vacunados de infectados, demostrando ser más efectiva que la prueba de Rv, que la NOM marca como oficial para poder diferenciar animales vacunados de infectados.

- La brucelosis de los hatos del CAIT es causada por *Brucella abortus* biotipo I.

RECOMENDACIONES

- Sería conveniente realizar este mismo trabajo pero en vacas negativas a la prueba de tarjeta para observar el comportamiento de las pruebas confirmatorias en animales netamente negativos.

- Se recomienda hacer un trabajo similar en establos con medidas sanitarias extremas, para observar el comportamiento de el establo y de los animales en cuanto a obtención de resultados y reacciones a las diferentes pruebas serológicas.

- La revacunación es un elemento básico para tratar los problemas de brucelosis, en zonas de alta prevalencia, debido a que proporciona una inmunidad mayor que una vacunación normal, pero no es el único medio de control ya que se deben tomar en cuenta medidas sanitarias, buen manejo del hato, control de movilización, vigilancia epidemiológica activa, seguir las campañas oficiales de control de enfermedades infecciosas ya que son puntos indispensables al considerar un programa de vacunación para bovinos, así como contar con buenos métodos de diagnóstico y con esto proteger a todo el hato, a todos los hatos.

- El empleo tanto de pruebas diagnósticas, inteligencia epidemiológica, vacunaciones masivas y medidas zoonitarias, deben contribuir a aumentar la productividad, salvaguardar la riqueza pecuaria de México y a favorecer el control de las zoonosis, la salud de los animales y el comercio nacional e internacional.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFÍA

1.-Alton, G, G; Jones, M, L y Pietz, E.D: Las Técnicas de Laboratorio en la Brucelosis. 2da. Edición. Ginebra Suiza. Editorial FAO y OMS. 1976.

2.- Alvarez, M.C. y Mendoza, E.S. Manual básico de bacteriología. Primera edición. FES-Cuautitlán . Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 1994.

3.-Aparicio, B.A. "Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con problemas de brucelosis revacunado con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*". Tesis para obtener el título de médico veterinario zootecnista. FES-Cuautitlán UNAM. Estado de México. 1997.

4.-Baerman, D.T. y Jones L.M "Radial Immunodiffusion a confirmatory test for bovine brucellosis". Memorias de la 83ª reunión anual de la United States Animal Health Association. Department of Veterinary Science University of Wisconsin Madison 1979.

5.-Blasco, J.M. "Estado actual de la brucelosis bovina en España.", Bovis (Tratado de Veterinaria Práctica). 1994.N57 p 13-17.

6.-Blood, D.C., Medicina Veterinaria; Libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino y equino, 7a. edición, Editorial Interamericana McGraw-Hill, Madrid España 1992.

7.-Díaz Aparicio E; "Diagnóstico serológico de brucelosis", Tesis Doctoral, Universidad de Navarra, España, 1993.

8.-Díaz, A.E. "Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo y prueba de rivanol, para diagnóstico de brucelosis". Memorias del curso teórico-práctico de diagnóstico de brucelosis animal. p 1-6 SARH-INIFAP CENID-Microbiología. D.F., 1994.

9.-Díaz Aparicio E. Marin, C. Alonso, B; "Evaluation of serological test for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats". Journal of Clinical Microbiology. Vol. 32

10.-Díaz, A.E. y Suárez, G.F. "Diagnóstico de brucelosis". Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. F.M.V.Z. UNAM y SARH. p221-226. México. 1994.

11.-Díaz, A.E., Aragón, V., Marín, C., Alonso, B., Font, M., Moreno, M., Pérez-Ortiz, S., Blasco, J.M., Díaz, R. and Moriyón, Y. "Comparative

analysis of *Brucella* sorotype A and M and *Yersinia enterocolitica* 0:9 polysaccharides for serological diagnosis of *Brucella* in cattle, sheep and goats. Journal of clinical microbiology. Vol. 3 No.12. p 3136-3141. Dec. 1993.

12.-Díaz, R y Blasco, J.M.: Diagnóstico Inmunológico. Bovis, Tratado de Veterinaria Pública. Editorial Luzán S. Madrid España 1994.

13.-Flores, C. R. "Brucelosis: prevención y control". Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis . F-M.V.Z. UNAM, SARH, p 239-247. México 1994.

14.-Flores, C.R; Programa de acreditación de Médicos Veterinarios y Zootecnistas. Material para la actualización técnica en Brucelosis y Tuberculosis Bovina; 1a Edición, México, Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México, 1990.

15.- 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 simposium internacional de medicina preventiva. p 23-28. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L. 1992.

16.- Garza, R.J. "Respuesta inmune en bovinos, su utilización en el diagnóstico vigilancia epidemiológica y prevención". Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría. p100-103. Colima México. 1997.

17.-Guerrero, L.M.L. "Evaluación económica de un programa de control de brucelosis bovina en un hato lechero del C.A.I.T. durante 1993. Tesis de licenciatura para obtener el título de médica veterinaria zootecnista. F-M.V.Z. UNAM México, D.F. 1993.

18.-Hernández,A.L. Diagnóstico bacteriológico de brucelosis. Memorias del curso teórico-práctico de diagnóstico de brucelosis animal . p1-6 SARH-INIFAP CENID Microbiología D.F. 1994.

19.-Hernández, M.I; Peña, F.P. y Betancourt, M.X.: Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR 19.Brucelosis 1ra. Edición, México D.F. Editorial INDRE. 1996.

20.-Jacques, Nicolet Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España 1985.

- 21.-Jones L; Berman D; Moreno E; Deyoe D; Gildsford M; Huber J; and Nicoletti P. "Evaluation of a RID with poly-B for diagnosis of bovine".
- 22.-Lopez, M.A; Brucelosis avances y perspectivas. INER, 1991.
- 23.-Luna, M.E. " Epidemiología de la brucelosis su repercusión en la salud pública. Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. p 167-171. F-M.V.Z. UNAM, SARH. México, 1994.
- 24.-Merck & CO., Inc., El manual Merck de Veterinaria., Un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades de los animales domésticos, 3a. edición en español, Editorial Ediciones Centrum Técnicas y Científicas, S.A., Madrid España., 1988.
- 25.-Morgan, W.J; "The serological diagnosis of bovine brucelosis". Veterinary Record, 80, 612-621, 1967.
- 26.-Moriyón, Y. "Estructura antigénica del género *Brucella bovis*", Tratado de veterinaria práctica. p 39-57. España.1994.
- 27.-Myrvik, Q.N. y Weiser, R.S. Bacteriología y micologías medicas. 2da. Edición, Editorial Interamericana Mc Graw Hill. México D.F. 1991.
- 28.-Nicoletti, P. Epidemiología, patogénia y cuadro clínico. Bovis (tratado de veterinaria práctica. p19-25, España. 1994.
- 29.-Nielsen, K and Duncan, R.J. Animal Brucelosis. 2da, edición. CRC, Boca ratón, Florida. 1990.
- 30.-Nuñez Torres, E.D; "Evaluación de la prueba diagnóstica de brucelosis, anillo en leche de cabras vacunadas con vacuna de *Brucella melitensis* REV 1, a dosis reducida". Tesis para obtener el título de BIÓLOGO, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México D.F. 1994.
- 31.-Olsen, S., Palmer, M. y Stivens, M. "La nueva vacuna contra la brucelosis, no causa falsos positivos. *Hoards's Dairyman*. año 4 No.2. p 90-91. Mex. 1997.

32.-Paez, C.J; Castro, R.L; del Razo, B; Cortés, L. y de Miguel B.N: Cinética de anticuerpos post-vacunales anti *Brucella abortus* en vacas en el trópico húmedo. Memorias del XVI congreso Nal. de Buiatría, Asoc. Nal. Med. Vet. Esp. en Bovinos, Ver.1991, pp.284-287.

33.-Plommet. M. control y profilaxis. Bovis, tratado de veterinaria práctica. 71-79. España . 1994.

34.-Rendón, F.H. brucelosis bovina. *Acontecer bovino* . Vol3, # 14. p 24-27. México 1998.

35.-Reyes, P.R., Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad de Varias Pruebas Diagnósticas Usadas en Brucelosis Bovina. Tesis para obtener el título de Medica Veterinaria Zootecnista, FES-Cuautitlán, UNAM. Estado de México 1996.

36.-Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo rural, Norma Oficial mexicana de emergencia, campaña nacional contra brucelosis en los animales.(NOM-041-ZOO-1995). Diario oficial de la Federación, Primera Sección, México 1995.

37.-Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Informe Semanal, Año 12, 2:33.

38.-Schurig, G.G. Vacunas contra la brucelosis: pasado, presente y futuro. Memorias del curso de epidemiología. p1-5 Mérida, Yuc. 1998.

39.- Suárez, G.F. Descripción y generalidades de brucelosis. Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. p 167-171. F-M.V.Z. UNAM SARH México 1994.

40.-Suárez G.F; Inmunología en Brucelosis. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

41.-Suárez G.F; Tendencias de la Investigación en el Diagnóstico y Control de Brucelosis. Memorias del "V Curso Internacional de Reproducción Bovina". Academia de Investigación Implicada en la Reproducción (A.I.B.I.R.).México 1993.

42.-Thomsen, A. "Experimental studies on the incubation peiod of infectious abortion in cattle." Brit. Vet. J. 100-41-54.1950.

43.-Tizard,I., Inmunología veterinaria, 4a edición en español., editorial Interamericana McGraw-Hill, México D. F. 1995.

44.-Verger, J.M. Estudio y diagnóstico bacteriológico de brucelosis. Bovis (tratado de veterinaria practica) p 39-57. España. 1994.