

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SEROEPIDEMIOLOGIA DE CINCO AGENTES
ZONOTICOS QUE AFECTAN AL GANADO BOVINO
EN EXPLOTACIONES DE LA REGION FRAILESCA
EN EL ESTADO DE CHIAPAS, MEXICO

T E S I S
PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL
P R E S E N T A
JOSE ALFREDO GUTIERREZ REYES

ASESORES: MVZ MSc MPVM PhD JOSE ALFONSO BARAJAS ROJAS
MVZ MPVM PhD ZEFERINO GARCIA VAZQUEZ
MVZ MSc PhD JOSE MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS



MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**SEROEPIDEMIOLOGÍA DE CINCO AGENTES ZONÓTICOS QUE AFECTAN
AL GANADO BOVINO EN EXPLOTACIONES DE LA REGIÓN FRAILESCA EN
EL ESTADO DE CHIAPAS, MÉXICO.**

Tesis presentada ante la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Producción y de la
Salud Animal

por

José Alfredo Gutiérrez Reyes

Asesores: MVZ MSc MPVM PhD José Alfonso Barajas Rojas
MVZ MPVM PhD Zeferino García Vázquez
MVZ MSc PhD José Manuel Berruecos Villalobos

México, D.F.

2000.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario, posterior a la publicación de los resultados de la misma.



José Alfredo Gutiérrez Reyes

DEDICATORIAS

A Dios, por manifestarte tantas veces en mi vida a través de mi familia y de todos mis seres queridos, así como en mis logros y tropiezos, gracias por hacerme sentir como un consentido tuyo....

A mis padres, José Alfredo Gutiérrez Pinto y Patricia Reyes; por darme la vida, por todos sus sacrificios y no desfallecer ante la adversidad, por conservar nuestra familia a pesar de todo y por darme la oportunidad de llegar hasta este momento. Gracias por cuidarme tanto..... los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos, Luis Adrián y Paola Patricia por existir y ser también razón de mi existencia, por no dejarme sentir nunca la soledad y por amarme tanto a pesar de lo diferentes que somos, este fruto también es de ustedes.....los amo.

A mi madrina Delicia Gutiérrez y **mis tías** Luz del Carmen y Clemencia Gutiérrez así como a Yolanda Reyes, por su apoyo, comprensión y amor en este que fue un largo camino de formación.

A mis abuelitas, Carmita y Julia, por su inmenso amor y que Dios me las conserve mucho tiempo más.

† A la memoria de mi abuelo Mariano Asunción Gutiérrez.

A Martha, por tu apoyo, tu amor y compañía en todo este tiempo y porque lo importante es el presente que vivimos.....gracias.

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi más sincera gratitud a mi Maestro y Asesor Principal, al **Dr. José Alfonso Barajas Rojas**, por su dirección, su confianza, apoyo y paciencia en la realización de este trabajo, y por la oportunidad de formarme con él durante los últimos 6 años de mi vida; gracias por su amistad y por su compañía como personaje principal en esta etapa de mi vida profesional.

A mis profesores del Posgrado, por su fiel vocación de instruir y formar. Gracias a los MVZ's Raúl Vargas García, Carlos Julio Jaramillo, José Juan Martínez Maya, Marco Antonio Casillas, Jorge Cárdenas, Marco Antonio Méndez, Alejandra León, Graciela Tapia, Javier Flores y Carlos Galina.

A mi Jurado de examen, con admiración y respeto. A los MVZ's: José Manuel Berruecos, Zeferino García, Antonio Morilla y José Ángel Gutiérrez.

A los ganaderos de la región Frailesca, especialmente a los Señores Efraín Coutiño, Romeo Corzo y Medardo Zuart, por la ayuda prestada. De la misma manera al personal de Campañas Zoonosológicas del Gobierno del Estado, los MVZ's Bernardo Valdivieso, Héctor Ramos y Modesto Valencia por su valiosa colaboración. Al Dr. Juan Antonio Montaña Hirose y al MVZ Rigoberto Hernández del Departamento de Microbiología e Inmunología de la F.M.V.Z., así como al Dr. Raúl Mancilla y a la Biól. Patricia Espinoza del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su orientación y ayuda en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Seroepidemiología, por su colaboración y empeño, gracias al pMVZ Antonio Miranda y Alejandro Benítez así como a Gerardo Palma y al MVZ Hugo Esquivel. A mis compañeros de la Maestría, por su apoyo y por la amistad que logramos formar en este tiempo, a los MVZ's Rolando Reyna, Héctor Águila, Adrián Castillo, Omar Valdez, Zayra Padrón, Dora Luz Pantoja, Eduardo Fano y Orbelín Soberanis.

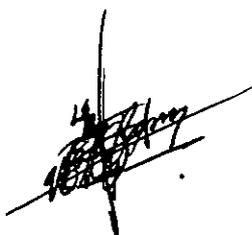
A mis amigos de carrera, antiguos y recientes que son parte importantísima en mi vida, por su cariño y los grandes momentos, gracias a: Abner Gutiérrez, Marco Antonio Lobo, Isabel Estévez, Roberto Santiago, Luis Arturo Mendoza, Raúl Mata, Miguel Ramírez, Alma Guillén, Carlos Cedillo, Hortensia Corona, Erika Betancourt, Israel Lezama, Mario Espinoza, y Martha Gutiérrez.

Al Pbro. Gustavo Romero, por su gran amistad y apoyo.

Mi reconocimiento a Dirección General de Personal Académico - DGAPA por el apoyo brindado a través del proyecto IN216798.

Finalmente, a la U.N.A.M. y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser espacio de mi formación y de vida en estos años.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, el apoyo otorgado a través de su Programa de Becas Nacionales para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, en el periodo comprendido del 1° de febrero de 1998 al 1° de febrero de 2000.



José Alfredo Gutiérrez Reyes

INDICE

	PÁGINA	
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Antecedentes	1
1.2	Situación geográfica	2
1.3	Ganadería bovina en el Estado de Chiapas	3
1.4	Características de la región IV Frailesca, Chiapas	5
2	REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
2.1	Brucelosis	6
2.2	Borreliosis	9
2.3	Leptospirosis	11
2.4	Tuberculosis	13
2.5	Rabia	16
3	JUSTIFICACIÓN	18
3.1	Aspectos importantes en la salud pública chiapaneca	19
4	HIPÓTESIS	23
5	OBJETIVO GENERAL	23
5.1	Objetivos específicos	24
6	MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1	Sitio del estudio	26
6.2	Determinación del tamaño mínimo de la muestra	26
6.3	Selección de la muestra y tipo de muestreo	27
6.4	Toma y conservación de las muestras de suero	28
6.5	Selección y características de los animales muestreados	29
6.6	Antígenos utilizados	30
6.7	Preparación del antígeno de rabia	31
6.7.1	Método de Bradford para la cuantificación de proteínas	32
6.8	Técnica de ELISA	33
6.8.1	Interpretación de la técnica de ELISA	35
6.9	Análisis estadístico de los datos	38
6.10	Cálculo de la seroprevalencia real y valores predictivos	38
6.11	Análisis de la concordancia entre pruebas serológicas	39
6.12	Prueba de tarjeta	39
6.13	Prueba de Rivanol	39
6.14	Prueba de aglutinación microscópica	41
6.15	Prueba de Kappa	42
6.16	Evaluación de la respuesta serológica provista por la vacunación antirrábica	42
6.17	Seguimiento prospectivo longitudinal en 35 animales seleccionados	44
7	RESULTADOS	45
7.1	Seroprevalencia general	45
7.2	Seroprevalencia por sexo	45

7.3	Seroprevalencia por edad	46
7.4	Seroprevalencia por sexo - edad	48
7.5	Seroprevalencia en función de la gestación	48
7.6	Seroprevalencia por explotación muestreada	50
7.7	Resultados de la seroprevalencia general real y valores predictivos de la técnica de ELISA indirecta	50
7.7.1	Resultados del análisis de concordancia entre pruebas serológicas	51
7.8	Evaluación de la respuesta vacunal contra la rabia por la técnica de ELISA	51
7.8.1	Resultados de 1996	51
7.8.2	Resultados de 1998	53
7.9	Seguimiento prospectivo longitudinal de 35 animales 1996 - 1999	54
8	DISCUSIÓN	58
8.1	Determinación del tamaño mínimo de la muestra	58
8.2	La técnica de ELISA indirecta	58
8.3	Cálculo de la seroprevalencia real y valores predictivos de la técnica de ELISA	59
8.4	Concordancia de la técnica de ELISA indirecta con otras pruebas	63
8.5	Seroprevalencia general	64
8.6	Seroprevalencia por sexo	75
8.7	Seroprevalencia por edad	78
8.8	Seroprevalencia por edad y sexo	81
8.9	Seroprevalencia en hembras gestantes y no gestantes	83
8.10	Evaluación de la respuesta vacunal contra la rabia por la técnica de ELISA	84
8.11	Estudio prospectivo longitudinal	86
9	LITERATURA CITADA	88
10	FIGURAS Y CUADROS	100

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
• Figura 1. Situación geográfica de la región Frailesca, en el Estado de Chiapas, México.	100
• Figura 2. Formato de la encuesta epidemiológica aplicada a los productores previo al muestreo de los animales en cada una de las explotaciones seleccionadas para el estudio.	101
• Figura 3. Representación esquemática de la técnica de ELISA Indirecta.	102
• Figura 4. Esquema de la microplaca para el análisis de los sueros problema a procesarse por duplicado con la prueba de ELISA.	103
• Figura 5. Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en bovinos de doble propósito de la región Frailesca Chiapas, 1996 y 1998.	104
• Figura 6. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra <i>B. abortus</i> por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.	105
• Figura 7. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra <i>B. burgdorferi</i> por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.	106
• Figura 8. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra <i>L. hardjo</i> por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.	107
• Figura 9. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra <i>M. bovis</i> por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.	108
• Figura 10. Seroprevalencia de cuatro agentes zoonóticos por estrato de edad en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998	109
• Figura 11. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas en 1996.	110
• Figura 12. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas en 1998.	111
• Figura 13. Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Frailesca, Chiapas en 1996.	112

- **Figura 14.** Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Frailesca, Chiapas en 1998. **113**
- **Figura 15.** Frecuencia de bovinos por estrato de edad que presentaron un porcentaje de ELISA ≥ 80 contra el antígeno de la rabia. Región Frailesca, Chiapas 1996 y 1998. **114**
- **Figura 16.** Frecuencia de bovinos por explotación que obtuvieron un porcentaje de ELISA ≥ 80 contra el antígeno de la rabia. Región Frailesca, Chiapas 1996 y 1998. **115**
- **Figura 17.** Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en 35 bovinos de doble propósito de la región Frailesca, Chiapas. 1996, 1998 y 1999. **116**
- **Figura 18.** Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras gestantes de la región Frailesca, Chiapas. 1996, 1998 y 1999. **117**
- **Figura 19.** Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras no gestantes de la región Frailesca, Chiapas. 1996, 1998 y 1999. **118**

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

- **Cuadro 1.** Clasificación general, por edad y por sexo de la población bovina muestreada en la región Frailesca, Chiapas. 1996, 1998 y 1999. **119**
- **Cuadro 2.** Seroprevalencia general aparente de cuatro agentes zoonóticos en la población bovina de la región Frailesca, Chiapas en 1996 y 1998. **120**
- **Cuadro 3.** Análisis estadístico (Ji^2) entre diferentes estratos: sexo, edad y año contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998. **121**
- **Cuadro 4.** Seroprevalencia por estrato de sexo de cuatro agentes zoonóticos, obtenidas en 1996 de la población bovina muestreada en la región Frailesca, Chiapas. **122**
- **Cuadro 5.** Seroprevalencia por estrato de sexo de cuatro agentes zoonóticos, obtenidas en 1998 de la población bovina muestreada en la región Frailesca, Chiapas. **123**
- **Cuadro 6.** Seroprevalencia por estrato de edad – sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas 1996. **124**
- **Cuadro 7.** Seroprevalencia por estrato de edad – sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas 1998. **125**
- **Cuadro 8.** Análisis estadístico (Ji^2) de manera conjunta de los estratos “edad y sexo” así como año de muestreo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas, 1996. **126**
- **Cuadro 9.** Seroprevalencia por estrato de edad, presencia o ausencia de la gestación y año de muestreo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. (1996 y 1998). **127**
- **Cuadro 10.** Análisis estadístico (Ji^2) entre hembras gestantes y no gestantes en función de la edad, contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998 **128**
- **Cuadro 11.** Seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos por explotación bovina muestreadas en 1996 y 1998. Región Frailesca, Chiapas. **129**
- **Cuadro 12.** Cálculo de la seroprevalencia real y valores predictivos de la técnica de ELISA aplicada en el análisis de las muestras de suero de bovinos de la región Frailesca, Chiapas. 1996, 1998 y 1999. **130**
- **Cuadro 13.** Determinación del coeficiente de concordancia (Kappa) entre diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico epidemiológico de *B. abortus* y *L. hardjo*. **131**

- **Cuadro 14.** Resultados por explotación bovina de la región Frailesca, Chiapas que obtuvieron un valor de porcentaje de ELISA ≥ 80 contra el antígeno de la rabia en 1996 y 1998. **132**
- **Cuadro 15.** Seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos en función de la edad de 35 bovinos muestreados en 1996, 1998 y 1999. Región Frailesca, Chiapas. **133**

RESUMEN

GUTIERREZ REYES JOSE ALFREDO. Seroepidemiología de cinco agentes zoonóticos que afectan al ganado bovino en explotaciones de la región Frailesca en el Estado de Chiapas, México. (Dirigida por José Alfonso Barajas Rojas. Coasesores: Zeferino García Vázquez y José Manuel Berruecos Villalobos).

Se realizó un estudio seroepidemiológico observacional transversal de cinco agentes zoonóticos en bovinos de doble propósito de la región Frailesca, Chiapas durante 1996 y 1998. Asimismo se efectuó un estudio prospectivo longitudinal en 35 bovinos muestreados en 1996, 1998 y 1999. Se colectaron 344 muestras séricas previa encuesta en 16 explotaciones en 1996, en 1998, se obtuvieron 294 muestras de 13 ranchos y en 1999 fueron 35 muestras de 7 explotaciones. Se utilizó ELISA indirecta para el diagnóstico seroepidemiológico de *Brucella abortus* (*B. abortus*), *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* (*L. hardjo*) y *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). En el caso del virus de la rabia (RV), el estudio se enfocó a medir la inmunidad de hato provista por vacunación. Se realizaron 3365 pruebas serológicas en 673 muestras colectadas. Las tasas de seroprevalencia general aparente fueron: contra *L. hardjo*, 31.1% en 1996 y 17.0% en 1998, *B. burgdorferi*, 12.5% en 1996 y 15.6% en 1998, *B. abortus* 9.3% en 1996 y 9.5% en 1998 y *M. bovis* 7.3% en 1996 y 5.8% en 1998. Se observó una frecuencia de animales con % de Elisa ≥ 80 (protegidos), análogo a un título de anticuerpos de 5 U.I. de 11% en 1996 y 10.5% en 1998. En ninguno de los ranchos muestreados se encontró al menos 50% de animales protegidos. Se realizó Ji cuadrada para el análisis estadístico encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$) en las tasas de seroprevalencia general de *L. hardjo* entre 1996 y 1998. Con respecto a la edad se encontraron diferencias estadísticas ($P = 0.033$), entre los estratos

de becerros (0-4 meses) y producción (> 36 meses) para *M. bovis* en 1998, y en los estratos de animales en desarrollo (> 4 meses < 36 meses) y adultos (> 36 meses) para *L. hardjo* en 1996 y 1998 ($P = 0.005$). Considerando la presencia de gestación en función de la seroprevalencia se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$), entre hembras gestantes muestreadas en 1996 y 1998 para *B. abortus*, *L. hardjo* y *M. bovis*. El estudio prospectivo longitudinal mostró incremento de seroprevalencia contra cuatro agentes confirmando que los becerros son los centinelas de seroconversión pues cuando fueron creciendo, pudo observarse que en la etapa de desarrollo se presentaron las mayores variaciones de seroprevalencia, tendiendo a establecerse en los adultos. Se concluye que las seroprevalencias de *B. abortus*, así como de *L. hardjo* y *M. bovis* son altas en algunas de las explotaciones muestreadas, que representa información importante para las campañas zoonitarias y productores por el impacto sobre las exportaciones y comercialización de productos de origen bovino. El hallazgo de evidencia serológica contra *B. burgdorferi*, es trascendente considerando que este agente no se ha reportado en México y se requiere de estudios confirmatorios en las poblaciones en riesgo. La baja inmunidad de hato por vacunación contra rabia bovina requiere revisar calendarios de vacunación en zonas endémicas ante la fuerte problemática de rabia en la ganadería chiapaneca. La importancia de este estudio fue marcar un precedente y realzar la trascendencia de las acciones de monitoreo y vigilancia epidemiológica para el control de enfermedades, por ser Chiapas una frontera de entrada de productos pecuarios a México, y que representan un riesgo zoonitario y de salud pública, y un reto ante el auge del comercio internacional en el marco de la globalización.

Palabras Clave: Seroepidemiología, Zoonosis, Bovinos, Chiapas.

ABSTRACT

GUTIERREZ REYES JOSE ALFREDO. Seroepidemiology of five zoonotic agents that affects cattle in premises from the Frailesca Region in the state of Chiapas, Mexico. (Supervised by Jose Alfonso Barajas Rojas, Zeferino Garcia Vazquez and Jose Manuel Berruecos Villalobos).

An observational transversal seroepidemiological study was performed of five zoonotic agents on double-purpose cattle from the Frailesca Region, Chiapas, south of Mexico during 1996 and 1998. Likewise a longitudinal prospective study was carried out on 35 bovines in 1996, 1998 and 1999. A total of 344 serum samples were collected during the survey on 16 farms in 1996. In 1998 were taken 294 samples on 13 farms, and in 1999 were collected 35 samples of 7 farms. Indirect ELISA was performed for seroepidemiological diagnosis of *Brucella abortus* (*B. abortus*), *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* (*L. hardjo*) and *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). In the case of rabies virus (RV), the study was focused on measuring herd immunity provided by vaccination. A total of 3365 serological test were done on 673 samples, finding global apparent seroprevalence rates against *L. hardjo* (31.1% in 1996 and 17.0% in 1998), *B. burgdorferi* (12.5% in 1996 and 15.6% in 1998), *B. abortus* (9.3% in 1996 and 9.5% in 1998) and *M. bovis* (7.3% in 1996 and 5.8% in 1998). A frequency of animals with ELISA % \geq 80 of rabies IgG (protected), similar to an antibody titer of 5 I.U. was 11% in 1996 and 10.5% in 1998. None of the sampled premises was found with at least 50% of protected animals. A chi square test for statistical analysis was performed, finding significant differences (P value < 0.05) between global seroprevalence rates of *L. hardjo* in 1996 and 1998. With regard to age, statistical differences were found among calf's stratum (0-4 months) and production (> 36 months) for *M. bovis* in 1998, and in growing animals strata (>4 moths <36 months) and adults (>36 months) for *L. hardjo* in 1996 and 1998 (P value = 0.005). According to

prevalence by reproductive status, pregnant animals showed, statistical differences (P value = 0.05) were found between sampled pregnant cows in 1996 and 1998 for *B. abortus*, *L. hardjo* and *M. bovis*. The longitudinal prospective study showed an increase in seroprevalence rates against four zoonotic agents in accordance conforming the young animals as the best centinels for seroresponse there was observed that the highest variations of seroprevalence were presented in animals on development stage, with the tendency to settle in adults. It is concluded that the seroprevalence rates of *B. abortus*, *L. hardjo* and *M. bovis* are high in some of the sampled farms, this is an important information for the zoosanitary campaigns and farmers interested in the impact on import-export of bovine and byproducts. The finding of serological evidence against *B. burgdorferi*, is transcendent because this agent never has been reported in Mexico, therefore confirmatory studies are required in the population at risk. The herd immunity against paralytic rabies was low and require to review the vaccination programs in endemic areas because strong outbreaks of rabies in Chiapas. The importance of this study was to be a precedent and to mark the transcendence of monitoring and epidemiological surveillance, for control of diseases being Chiapas a border at risk due to import-export of animal products to Mexico; this represents a zoosanitary and public health hazard, each time greater due to the international trade and globalization.

Keywords: Seroepidemiology, Zoonosis, Bovine, Chiapas.

SEROEPIDEMIOLOGÍA DE CINCO AGENTES ZONÓTICOS QUE AFECTAN AL GANADO BOVINO EN EXPLOTACIONES DE LA REGIÓN FRAILESCA EN EL ESTADO DE CHIAPAS, MÉXICO.

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes: En todo momento, cada país o región es escenario de padecimientos persistentes o de nuevas incursiones de procesos de enfermedad: Mientras unas residen permanentemente o emergen repentinamente en las poblaciones otras, afectan por igual a los animales domesticados y salvajes así como al hombre. Algunas acompañan a las importaciones tanto legales como ilegales; y finalmente están las que viajan con los elementos naturales y que no respetan fronteras. La relación entre lo que se describe y lo que realmente ocurre depende de la infraestructura veterinaria de cada país. Por ello resulta de gran importancia el establecimiento de sistemas de predicción basados en la epidemiología y el laboratorio, que permitan prevenir la aparición de focos de enfermedades existentes o emergentes. La epidemiología genera conocimientos sobre los procesos de enfermedad mediante el estudio de la frecuencia y distribución de las mismas, logrando de esta manera dilucidar mecanismos causales, describir la historia natural de una enfermedad, y características locales de las ocurrencias, así como planear y administrar los servicios de salud ¹.

La atención de la agricultura y la ganadería como principales actividades del sector primario y base de la economía chiapaneca, juega un papel muy importante en el desarrollo social, económico y cultural de la entidad. Chiapas es un estado que se caracteriza por ser eminentemente agropecuario y enfrenta grandes retos; entre ellos destacan los aspectos de

salud animal y sus implicaciones en la salud pública. Por esto, todos los esfuerzos por conocer la magnitud y distribución de los padecimientos con el fin de promover estrategias para la resolución y prevención de los mismos, continuarán siendo el camino a seguir por aquellas instancias involucradas, en el ámbito agropecuario.

1.2 Situación geográfica.

El Estado de Chiapas localizado en el sureste de México, se sitúa en sus límites extremos al norte a 17° 59' de latitud, al sur a 14° 32', al este 90° 22' y al oeste a una longitud de 94° 14'. Sus colindancias son al norte con los Estados de Veracruz y Tabasco, al sur con el país de Guatemala y el Océano Pacífico, al este con Guatemala y al oeste con el Estado de Oaxaca y nuevamente con el Océano Pacífico. La extensión territorial del Estado representa el 3.7% de la superficie de nuestro país (Figura 1). Actualmente, el Estado de Chiapas está conformado por 112 municipios. Para fines económicos se divide en nueve regiones: Región I Centro, Región II Los Altos, Región III Frontera, Región IV Frailesca, Región V Norte, Región VI Selva, Región VII Sierra, Región VIII Soconusco y Región IX Istmo - Costa ^{2,3}.

La superficie estatal aproximada que ocupa la actividad ganadera es de 2,859,123 hectáreas en 84,730 unidades de producción (27.5%) de las 307,742 existentes. De estas, 1,450,098 hectáreas corresponden a praderas inducidas y 1,408,225 son praderas naturales, por lo que la superficie dedicada a la ganadería, representa el 38% de la extensión territorial de Chiapas. El Estado se compone en un 16.9% de pastizales; las principales especies son los pastos estrella africana (*Cynodon plectostachyus*), pangola (*Digitaria decumbens*), guinea (*Panicum maximum*) y sorgo (*Sorghum vulgare*). Un 15.8% de la superficie se utiliza en la agricultura, principalmente en cultivo de maíz (*Zea mays*), frijol

(*Phaseolus vulgaris*), plátano (*Musa paradisiaca*), cacao (*Theobroma cacao*) y café (*Coffea arabica*); el 34.6% es de selva, en donde predominan principalmente el guapaque (*Dialium guianense*), el capomo u ojoche (*Brosimum alicastrum*), la guácima (*Guazuma ulmifolia*) y el copal (*Bumelia bipinnata*); la superficie de bosque asciende a un 29.1%, manglar 1.7%, popal 0.4% y otros en un 1.4% ⁴.

1.3 Ganadería bovina en el Estado de Chiapas.

De acuerdo a la información reportada por el Centro de Estadística Agropecuaria (CEA) de la S.A.G.A.R. ⁵, el inventario estatal de ganado bovino en 1998 fue de 2,534,514 cabezas entre bovinos productores de carne y doble propósito y 32,670 bovinos lecheros. En términos generales, se estima que la población bovina del Estado se compone en un 46% por hembras mayores de 3 años, 25.3% son machos y hembras de 1 a 3 años, 20.9% son machos y hembras menores de un año y el 7.9% son machos mayores de 3 años. El promedio estimado de cabezas por unidad de producción asciende a 20 animales ^{2,3,6}. La ganadería bovina presenta un excelente potencial para desarrollarse bajo sistemas acordes con su realidad productiva, siendo el sistema de doble propósito el más utilizado, por su amplia capacidad de adaptación a las diferentes regiones agroclimáticas, las circunstancias socioeconómicas de los productores y las condiciones del mercado ^{2,4}. La cría de bovinos es la actividad ganadera más importante en el Estado de Chiapas, y significa el 89.1% del valor total de la producción ganadera del Estado ocupando el tercer lugar a nivel nacional; de hecho, Chiapas ocupó en 1998 el tercer lugar nacional por sus existencias en ganado bovino ⁵. En 1991 generó el 58.6% del valor total del subsector pecuario ⁵. La producción de carne de bovino se ubicó durante 1997 alrededor de 73,560 toneladas y en cuanto a la producción de leche se ha mantenido a un ritmo de crecimiento constante

aproximado al 6% alcanzándose en 1997, una producción de 201,649 litros de leche. En 1993, el Producto Interno Bruto de la ganadería estatal ascendió a 700,961 (miles de pesos) de un P.I.B. de la ganadería nacional de 17,828,586 (miles de pesos), lo cual representó el 3.93% de participación nacional; además, se estima que el estado aporta cerca de 200,000 bovinos que van a repasto y finalización a los Estados de Veracruz, Tamaulipas, Nuevo León y Morelos, de los cuáles se exporta el 15% a los Estados Unidos de América (en 1997, 162,954 cabezas, 138,480 machos y 24,474 hembras) ^{3,4,5,6}. A decir del programa de desarrollo agropecuario 1995 - 2000, los bovinos del Estado son animales muy cotizados debido a sus características genéticas (140-160 Kg. al destete que es de 8 a 10 meses), alcanzan muy buena conversión alimenticia y rendimiento en canal ⁶. Adicionalmente, el Estado abastece de carne de bovino para consumo humano a otras entidades como Oaxaca, Guerrero y el Distrito Federal; para el año de 1996, 212,270 cabezas fueron comercializadas hacia fuera del Estado y en 1997 el número de cabezas se incrementó a 252,235 mientras que las cabezas sacrificadas para consumo estatal fue de 333,420 en 1996 y 367,800 en 1997 ^{2,3,4,6}.

De manera muy importante, las deficiencias en la aplicación de la legislación sanitaria, de acuerdo con la normatividad de la S.A.G.A.R., no permiten establecer un control definitivo a enfermedades comunes que afectan a la ganadería del Estado, y que provocan grandes pérdidas y dificultades para la comercialización local, regional, nacional e internacional. Además, la apertura de rastros clandestinos, que comercializan productos riesgosos y que fomentan el abigeato, no permite aprovechar en su capacidad los frigoríficos y rastros municipales existentes. La venta de leche "bronca" y sus derivados, también representan un riesgo de diseminar enfermedades contagiosas, como la

brucelosis y la tuberculosis bovina ⁶. Es importante mencionar que la necesidad de repoblar el hato ganadero estatal ante el incremento del índice de extracción, así como el posible paso de animales de contrabando de países vecinos de América Central, representan factores de riesgo adicionales y que están latentes ⁶.

1.4 Características de la región IV Frailesca, Chiapas.

La región IV Frailesca se encuentra enclavada en la porción central del Estado de Chiapas y consta de cuatro municipios (Figura 1). El municipio de Villaflores que se localiza a 16° 14' latitud norte y a 93° 17' de longitud oeste y a una altura de 540 m.s.n.m. El municipio de Villa Corzo, está a una latitud norte 16° 11' y a 93° 16' de longitud oeste a una altura sobre el nivel medio del mar de 580 m. La Concordia (16° 07' norte y a 92° 41' oeste, 540 m.s.n.m.) y el municipio de Angel Albino Corzo, situado a una latitud de 15° 52' norte y a una longitud de 92° 43' oeste, a una altura de 540 m.s.n.m. En la actualidad esta región es una de las más importantes después de las regiones Istmo - Costa y Selva en cuanto a la explotación de ganado bovino se refiere. La región Frailesca está enclavada entre la depresión central del Estado de Chiapas y la discontinuidad de la llanura del Istmo; además, se encuentra irrigada por la cuenca hidrológica del río Grijalva, el cual a su vez es almacenado por la presa de la Angostura (Belisario Domínguez) que tiene la capacidad de 19,736,000 m³ con un volumen anual utilizado de 8,502 millones de m³. De estos, 70 millones de m³ son utilizados en riego. El clima de la región es cálido húmedo (Acm) ^{2,3,6}.

La superficie dedicada a la ganadería en la región es de 313,058 hectáreas (10.9% estatal) de las cuales 102,981 (33%) son praderas inducidas y 210,077 hectáreas (67%) son praderas naturales. La región contaba para

el año de 1995 con un inventario bovino de 257,873 cabezas (8.9% inventario estatal) ².

El volumen de producción de la región Frailesca fue, en el año de 1997, de 38,830 cabezas (10.5% estatal), destinada al sacrificio, la producción de carne fue de 7,766 toneladas (10.5% estatal) y la producción de leche, de 14,502 litros (7.2% de la producción estatal).

Una descripción amplia de aspectos importantes de la salud pública así como de la salud animal del Estado de Chiapas, se realiza más adelante en la justificación.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

A continuación, se hace una breve revisión bibliográfica de algunos aspectos de las cinco zoonosis en estudio, con la finalidad de establecer un marco teórico que sustente la investigación:

2.1 Brucelosis

El género *Brucella* fue descubierto por el médico y anatomopatólogo David Bruce en 1887. Se cree que esta enfermedad era ya conocida desde los tiempos de Hipócrates, 400 años antes de Cristo, pero las primeras descripciones claras del padecimiento fueron hechas por Cleghorn en 1751 ⁷. La brucelosis, también denominada fiebre ondulante, fiebre de Malta, enfermedad de Bang, fiebre mediterránea y fiebre de las cabras es una enfermedad infectocontagiosa, de curso agudo o crónico que afecta a la mayoría de las especies de animales domésticos, silvestres y al hombre. De acuerdo a su reservorio, se considera una antropozoonosis y en cuanto a su mecanismo de transmisión, es considerada una zoonosis directa ⁸.

el año de 1995 con un inventario bovino de 257,873 cabezas (8.9% inventario estatal) ².

El volumen de producción de la región Frailesca fue, en el año de 1997, de 38,830 cabezas (10.5% estatal), destinada al sacrificio, la producción de carne fue de 7,766 toneladas (10.5% estatal) y la producción de leche, de 14,502 litros (7.2% de la producción estatal).

Una descripción amplia de aspectos importantes de la salud pública así como de la salud animal del Estado de Chiapas, se realiza más adelante en la justificación.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

A continuación, se hace una breve revisión bibliográfica de algunos aspectos de las cinco zoonosis en estudio, con la finalidad de establecer un marco teórico que sustente la investigación:

2.1 Brucelosis

El género *Brucella* fue descubierto por el médico y anatomopatólogo David Bruce en 1887. Se cree que esta enfermedad era ya conocida desde los tiempos de Hipócrates, 400 años antes de Cristo, pero las primeras descripciones claras del padecimiento fueron hechas por Cleghorn en 1751 ⁷. La brucelosis, también denominada fiebre ondulante, fiebre de Malta, enfermedad de Bang, fiebre mediterránea y fiebre de las cabras es una enfermedad infectocontagiosa, de curso agudo o crónico que afecta a la mayoría de las especies de animales domésticos, silvestres y al hombre. De acuerdo a su reservorio, se considera una antropozoonosis y en cuanto a su mecanismo de transmisión, es considerada una zoonosis directa ⁸.

Taxonomía.- El género *Brucella* está constituido por cocobacilos aerobios Gram negativos de 0.5 a 1.5 μm de largo, no móvil y no esporulado, posee seis especies que pueden distinguirse por su capacidad oxidativa y por su sensibilidad a bacteriófagos, incluye diferentes especies importantes para la patología humana: *Brucella melitensis* que afecta preferentemente cabras, pero puede infectar bovinos y cerdos; es el agente responsable de la mayoría de los casos humanos diagnosticados bacteriológicamente, se conoce como la especie más patógena e invasiva, cualidades que han permitido su gran persistencia y amplia distribución en el país. *Brucella abortus*, es la principal responsable de la brucelosis bovina, aunque se ha aislado también de otras especies animales; por ser menos patógena que *B. mellitensis* para el ser humano, se ha relacionado hasta ahora con infecciones leves y con un alto porcentaje de casos asintomáticos, característicos de individuos profesionalmente expuestos. Otras especies conocidas, pero que con poca frecuencia producen enfermedad son *B. suis* y *B. canis* así como *B. ovis* ^{7,9}.

Epidemiología.- La brucelosis es una de las zoonosis de mayor importancia a nivel mundial para la salud pública y la economía; de hecho, la existencia de la enfermedad ha sido reconocida en 94 países del mundo ^{10,11}. En los animales la enfermedad ocasiona graves problemas reproductivos como aborto, infertilidad y esterilidad, la disminución en la producción de leche, alargamiento del período interparto en el ganado y rompimiento de las líneas genéticas por concepto de desecho de animales ⁹. Además de las pérdidas, el animal permanece infectado de por vida ^{11,12,13}. En México, la brucelosis humana se presenta con más frecuencia en individuos entre los 20 y 60 años de edad, preferentemente en mujeres (Razón de momios = 1.48) de acuerdo a las seroprevalencias reportadas en México por Merino ⁷, como sucede en otros países en donde las mujeres y

los niños atienden y ordeñan a los animales de las explotaciones de traspatio, y son ellas las encargadas de elaborar los quesos; no obstante los casos pediátricos constituyen menos de 10% del total ⁷. La transmisión de humano a humano teóricamente no existe, excepto por el reporte de la posibilidad de transmisión en un caso, por vía sexual ¹⁴. Otros mecanismos de transmisión reportados han sido a través de la transfusión sanguínea, y el transplante de médula ósea ¹⁵. La seroprevalencia en la población mexicana, por Estados, tiene un rango de 0.2% en Morelos hasta 13.5% en el Estado de México. El promedio nacional se estima en 3.4%. y en Chiapas la seroprevalencia fue de 0.53%⁷.

Diagnóstico.- En el ser humano, la forma aguda se caracteriza por debilidad, escalofríos, fiebre nocturna elevada y con frecuencia, produce alteraciones del sistema nervioso central, astenia y adinamia, dolores articulares, diaforesis y aborto. La forma crónica de la enfermedad es difícil de diagnosticar, porque los síntomas son imprecisos y muy variables. Sin embargo, en casi todos los casos aparece fiebre remitente y alteraciones del sistema nervioso central. Para llevar a cabo el diagnóstico de la brucelosis humana, como pruebas oficiales se utilizan los hemocultivos y mielocultivos, además de los estudios serológicos como la reacción de Huddleson en donde títulos de 1:80 se consideran como positivos; aglutinación en tubo estándar donde títulos de 1:160 o mayores son positivos; también se llevan a cabo otros tipos de pruebas como la de microaglutinación en placa y ELISA ^{8,16}.

Tratamiento.- Este se realiza a base de antibióticos como las tetraciclinas, la rifampicina, la doxiciclina y las sulfas con trimetoprim, así como las quinolonas. En el ser humano, dicho tratamiento se

recomienda por un período mínimo de 6 semanas junto con la combinación de los fármacos anteriormente citados e incluso con el uso de inmunomoduladores como el levamisole ¹⁶.

La brucelosis es una zoonosis de gran extensión e importancia en la ganadería mexicana y que afecta a la población humana con una magnitud considerable de acuerdo a lo anteriormente descrito. La técnica de ELISA en padecimientos como la brucelosis ha demostrado ser capaz de distinguir animales vacunados de infectados, poseer una alta sensibilidad y especificidad y ser relativamente sencilla de estandarizar, ^{12,13,16,17,18,19} en comparación con otras pruebas serológicas como Rivanol y fijación de complemento; en ellas se han reportado reacciones falsas positivas debidas a la antigenicidad cruzada con *Yersinia enterocolitica* serotipo 0:9 ²⁰.

2.2 Borreliosis

La borreliosis o enfermedad de Lyme es causada por una espiroqueta denominada *Borrelia burgdorferi* y transmitida principalmente al ser humano, equinos y perros, por garrapatas de los géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor* y *Amblyomma* ^{21,22}. Esta enfermedad se identificó por primera vez en Lyme, Connecticut E.U.A. en 1975.

Epidemiología.- Esta enfermedad ha sido encontrada en Norteamérica, Europa y Australia; en México se considera exótica y la transmisión al hombre por el bovino no se considera epidemiológicamente importante. Sin embargo, este microorganismo es capaz de infectar al ganado, principalmente a los bovinos menores de dos años, de acuerdo a lo encontrado en estudios serológicos ^{23,24}. Existen reportes de que el bovino posee receptores en sus granulocitos afines a *Borrelia burgdorferi*,

principalmente la fracción A ²⁵; además, se han reportado otras especies de borrelias que afectan al ganado bovino como es el caso de *Borrelia theileri*, transmitida por garrapatas del género *Boophilus* ^{26,27}. Se ha visto que el ganado bovino posee una baja susceptibilidad a la borreliosis clínica. Esta enfermedad es considerada de acuerdo a su reservorio, como una antropozoonosis y de acuerdo a su mecanismo de transmisión como una metazoonosis. Existen otras borrelias que afectan a los bovinos y que presentan reacciones serológicas cruzadas con *B. burgdorferi*, tal es el caso de *Borrelia theileri* que ocasiona aborto epizoótico y *B. coriaceae* que es menos patógena ^{28,29}.

Signología.- Los primeros signos comprenden un exantema rojo circular y liso que aumenta de tamaño y recuerda un “ojo de buey”; es indoloro y no pruriginoso y, como puede desaparecer espontáneamente, pasa muchas veces inadvertido. Varios días o semanas después de la infección, el paciente puede experimentar un cuadro parecido al de la gripe, con fiebre, cefaleas, rigidez de cuello, dolor articular y muscular y fatiga intensa. Cuando la enfermedad de Lyme no es tratada, provoca artritis en más de la mitad de los casos, y puede causar inflamación crónica de las articulaciones, casi siempre de la rodilla. El 15% de los enfermos sin tratar sufre lesiones del sistema nervioso central y el 8%, alteraciones del ritmo cardíaco. Síntomas como rigidez del cuello, pérdida de la memoria, confusión, fiebre y sensibilidad a la luz, sugieren meningitis y encefalitis ^{30,31,32}.

Diagnóstico.- La técnica de ELISA ha reportado sus bondades en el diagnóstico epidemiológico de este agente, en comparación con otras técnicas como serían las pruebas de anticuerpos fluorescentes y la aglutinación; no obstante, los resultados obtenidos por ELISA o con otras

pruebas, deben ser confirmados por Western blot, con la finalidad de descartar reacciones cruzadas ³³. Las características de la técnica de ELISA se traducen en la facilidad para procesar un gran número de muestras en un período relativamente corto ^{22,30,31,32,34,35,36,37}. En el ser humano es un padecimiento difícil de diagnosticar, pues la combinación de mordedura indolora del artrópodo con la variedad de síntomas, sugieren a menudo otras enfermedades.

2.3 Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad de amplia distribución en México. Esta enfermedad tiene un impacto importante en la salud pública debido a su carácter zoonótico, y es además de importancia económica ya que en bovinos produce infertilidad, abortos, nacimiento de becerros débiles y baja en la producción de leche. El género *Leptospira* está constituido por dos especies claramente definidas: *Leptospira interrogans*, que incluye las formas patógenas y *Leptospira biflexa*, que incluye microorganismos saprofitos clasificados en 4 serotipos; el complejo *Leptospira interrogans* comprende más de 200 serotipos que se agrupan en 23 serogrupos; las más frecuentes de este complejo en México son *Leptospira icterohemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. pomona* y *L. hardjo*, que son identificadas por medio de microaglutinación en serovares ^{38,39,40}. Weil hizo la primera descripción de la leptospirosis en 1886.

Epidemiología.- Las infecciones en huéspedes accidentales son más comunes en zonas tropicales y subtropicales, ocurriendo durante todo el año, aunque la mayor presentación es en las épocas de lluvia ^{36,37,41}. La leptospirosis es considerada como una zooantropozoonosis de acuerdo a su reservorio y como una saproozoonosis por su mecanismo de transmisión. La transmisión puede ser directa por contacto con orina,

sangre o carne de animales infectados o indirecta, mediante agua o desechos contaminados. La puerta de entrada es la piel erosionada y las mucosas conjuntival, nasal y oral. El bajo índice de sospecha de esta enfermedad, junto con la diversidad e inespecificidad de su presentación, explica el número significativo de casos que pasan desapercibidos ^{38,39}. En México, la leptospirosis humana es una enfermedad endémica. El Instituto Nacional De Referencia Epidemiológica (INDRE) reportó un porcentaje nacional de muestras de suero, positivas para *Leptospira*, de 2.7% en 1991, de 7.9% en 1992, de 9.8% en 1993, de 23.1% en 1994 y de 7.7% en 1995 ⁴⁰. Aunque la incidencia de la leptospirosis se estima como relativamente baja en varios países del mundo, esta enfermedad catalogada dentro de la lista "B" de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), donde es considerada como la zoonosis más ampliamente distribuida en el mundo; basta señalar los recientes brotes acontecidos en la población de Centroamérica posteriores al paso del huracán Mitch, así como en Perú y Ecuador durante 1998. De igual forma, se estima que en los Estados Unidos de América, se presentan de 100 a 200 casos humanos por año, de acuerdo a lo notificado por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention), además de los focos que de manera cotidiana se presentan en la población animal. De acuerdo al "Informe Epidemiológico Regional" publicado mensualmente por el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), correspondiente al mes de abril de 2000, hasta el mes de marzo del presente año se reportaron la aparición de focos en bovinos, ovinos, équinos y porcinos en Costa Rica, El Salvador y Honduras.

Signología.- En el humano, ocasiona fiebre generalizada, mialgias, meningitis, vómito e ictericia; sin embargo, la mayoría de los casos son subclínicos. La leptospirosis se caracteriza por ser una enfermedad

bifásica: en la primera fase los microorganismos se encuentran en sangre y líquido cefalorraquídeo; y en la segunda fase, los microorganismos se encuentran solamente en la orina; sin embargo, lo más importante de esta fase es la aparición de anticuerpos de tipo IgM ³⁸.

Diagnóstico.- Este puede establecerse mediante la búsqueda de leptospiras con microscopio de campo oscuro en muestras de orina, sangre, líquido cefalorraquídeo y biopsias o a través de la titulación en muestras serológicas pareadas con técnicas como la aglutinación microscópica en campo oscuro; además del cultivo bacteriológico. La técnica de ELISA ha demostrado ser una técnica altamente sensible y específica en el diagnóstico de la leptospirosis, además de ser una técnica sencilla de realizar, haciéndola accesible para su uso en los laboratorios de salud pública, así como los de salud animal ^{42,43,44,45,46}.

Tratamiento.- El tratamiento de elección contra la leptospirosis es la penicilina sódica cristalina más estreptomycin, pudiendo utilizar la amoxicilina, ampicilina, doxiciclina, tetraciclina, cefatoxina y ceftriaxona ^{38,39}.

2.4 Tuberculosis

La tuberculosis de origen bovino es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso crónico y progresivo, causada por *Mycobacterium bovis*, microorganismo resistente a una gran gama de desinfectantes y variaciones del pH que se ha identificado en los animales domésticos, en casi todos los ungulados, lobos marinos, primates y al hombre, por lo que se considera una zoonosis; se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos, que merman la condición física y productiva, causando pérdidas económicas de consideración ⁴⁷. El

nombre de tuberculosis deriva de la formación de unas estructuras celulares características denominadas tuberculomas, donde los bacilos quedan encerrados. El microbiólogo alemán Roberto Koch descubrió el agente causal en 1882 ⁴⁸.

Epidemiología.- Es una zoonosis clasificada por su reservorio como antropozoonosis (tuberculosis bovina causada por *Mycobacterium bovis*), así como una zooantropozoonosis (tuberculosis humana ocasionada por *Mycobacterium tuberculosis*). De acuerdo a su modo de transmisión la tuberculosis se considera una zoonosis directa que afecta a diferentes especies animales en las que ocasiona lesiones granulomatosas de pulmones, intestino, huesos y otros tejidos. La importancia del ganado bovino en la transmisión al hombre, se debe principalmente al riesgo de contraer la infección a través de la leche y sus derivados contaminados, por lo cuál las lesiones se presentan principalmente a nivel de aparato digestivo ^{48,49,50,51,52}. Sobre la epidemiología de la enfermedad en los bovinos, se sabe que más del 90% de las infecciones son de origen respiratorio; aunque la ingestión de alimento contaminado también puede causar la infección y los becerros llegan a adquirir la infección al consumir leche o calostro contaminados. Se sabe de infecciones en ganado por contacto con secreciones (orina, tos) de personas tuberculosas ⁵¹. Actualmente, la tuberculosis humana de origen bovino sigue considerándose por la Organización Mundial de la Salud un grave problema sanitario que representa grandes retos, entre los cuales se pueden mencionar: que aún afecta al humano, pero se desconoce el porcentaje real; se subestima la capacidad de *Mycobacterium bovis* de producir tuberculosis humana; los laboratorios para el diagnóstico de tuberculosis no siempre utilizan medios diferenciales para *M. bovis* y *M. tuberculosis* ⁵³. Es importante también mencionar que la infección persiste

en los humanos después de haber erradicado la enfermedad en los bovinos (reactivación de infecciones viejas en ancianos o positivos al virus de inmunodeficiencia humana) ^{48,49}.

La importancia del ganado bovino en la transmisión del bacilo tuberculoso continúa siendo latente ya que aún existe riesgo de adquirir la infección por consumo de leche o lacticios no pasteurizados. La tuberculosis en el ganado bovino tiene también grandes repercusiones, tomando en cuenta que el estatus de tuberculosis bovina representa una limitante sanitaria para la exportación y que en los bovinos lecheros afectados, la producción disminuye hasta en un 17% ⁴⁷.

La prevalencia de tuberculosis bovina en México es del 16% ^{50,51} y el Estado de Chiapas se encuentra todavía en la fase de control dentro de la Campaña Nacional ⁴. Además, tomando en cuenta que de los 7 mil millones de litros de leche que se producen en México, solamente el 50% de la producción se pasteuriza y que lo demás se consume sin este proceso o se transforma en derivados lácteos, esta situación implica un riesgo para la salud pública ⁴⁷. En México se ha instrumentado la Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*), que se fundamenta en la Norma Oficial Mexicana correspondiente ⁴⁷.

Diagnóstico.- Además de la histopatología y el aislamiento bacteriológico, una de las herramientas más poderosas en el estudio de la epidemiología de este padecimiento es la diferenciación de la cepa, sin embargo este tipo de diagnóstico es laborioso y tardado. Las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sondas de DNA y análisis de restricción de la endonucleasa (RFLP) resultan costosas y el serodiagnóstico como la ELISA, el interferón gamma y la

inmunoperoxidasa han demostrado un éxito dudoso para confirmar diagnóstico, aunque son útiles en la investigación epidemiológica **52,54,55,56,57,58,59,60**.

2.5 Rabia

La rabia es una de las enfermedades más antiguas y recurrentes, ya que su conocimiento se remonta aproximadamente al siglo 23 antes de Cristo ⁶¹. Desde 1885 cuando Pasteur introdujo la vacunación contra la rabia se han seguido presentado casos tanto en humanos como en otras especies domésticas y silvestres. Se trata de una enfermedad infecciosa, transmisible de curso agudo y mortal, única por su capacidad de afectar a todos los mamíferos, con una letalidad del 100%. Está clasificada como una zoonosis.

Taxonomía.- El virus de la rabia pertenece a la familia *Rhabdoviridae* (incluidos en el orden de los Mononegavirales) al igual que las familias *Paramixoviridae* y *Flavoviridae* son familias que agrupan a virus ARN no segmentado, de cadena simple y polaridad negativa. Los rhabdovirus de los mamíferos se dividen en base a sus diferencias antigénicas y bioquímicas en tres géneros: 1) *Vesiculovirus* (virus de estomatitis vesicular) 2) *Lyssavirus*, (virus de la rabia) y 3) *Ephemerovirus* (Fiebre efímera de los bovinos de Australia). Con base en su reactividad a anticuerpos monoclonales, los *Lyssavirus* se han subdividido en cuatro serotipos numerados más otros tres no numerados, que son: 1) Rabia clásica (existe en casi todo el mundo) 2) Lagos Bat (Africa) 3) Mokola (Africa) 4) Duvenhage (Africa), mientras que los no numerados son: European Bat Lyssavirus 1 (Europa), European Bat Lyssavirus 2 (Europa) y finalmente el Lyssavirus Australiano (Australia) ^{62,63}.

Propiedades físicoquímicas.- El genoma se transcribe de la extremidad 3' a la extremidad 5' en un ARN corto "líder" y en 5 ARN mensajeros que codifican sucesivamente para las proteínas N (nucleocápside), M1 (fosfoproteína asociada a la nucleoproteína del virus de la estomatitis vesicular), M2 (proteína matriz), G (glicoproteína sobresaliente de la membrana viral que es el más importante antígeno responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes); y L (transcriptasa que participa directamente con la patogenicidad en combinación con la M1) . Las propiedades físicoquímicas del virión son: peso molecular 1000 millones de daltones, velocidad de sedimentación 1000S, densidad en CsCl de 10 a 19 en 1.20 g/ml y en sacarosa de 1.17 sa 1.19. La infectividad viral es estable a pH entre 5 a 10 e inestable a pH 3. Se inactiva rápidamente a 56 C, con luz ultravioleta, rayos X, éter, cloroformo, detergentes, así como hipoclorito de sodio. ⁶¹

Epidemiología.- Desde el punto de vista epidemiológico hay dos formas de rabia, la urbana que se propaga sobre todo entre los perros, y la silvestre que se asienta en diferentes especies vectores de la enfermedad dependiendo de la zona geográfica involucrada. En las regiones tropicales de América Latina el vector silvestre es el murciélago hematófago que muere también a consecuencia de la rabia aunque la pueden transmitir por períodos largos de tiempo sin que se observen manifestaciones clínicas ⁶⁴. En México, la plaga de este quiróptero se extiende a lo largo de la Costa occidental desde Sonora hasta Chiapas y en la Oriental desde el sur de Tamaulipas hasta Quintana Roo ⁶⁵. Como estos murciélagos se alimentan exclusivamente de sangre se han multiplicado en las regiones tropicales donde hay cría de ganado vacuno, en quienes encuentran su alimento con facilidad, causando graves pérdidas económicas. Cabe aclarar que los verdaderos vectores de la rabia, son aquellas especies que

la pueden transmitir de manera activa por sus hábitos de morder, como los perros y otros predadores (coyotes y murciélagos hematófagos, entre otros). Sin embargo, existen una gran variedad de especies susceptibles que constituyen un fondo de saco epidemiológico, pues si bien estas son víctimas de la rabia, es poco frecuente que la transmitan a su vez a otros animales de la misma o diferente especie. Tal es el caso de los rumiantes, equinos domésticos y del humano ⁶².

3. JUSTIFICACIÓN

Los problemas de tipo sanitario ocupan un lugar primordial en la ganadería chiapaneca, cabe señalar que la situación geográfica del Estado define al mismo como una puerta de entrada al país de bienes y servicios ya sea de manera legal o por medio del contrabando; los productos pecuarios como el ganado en pie, es introducido al país en donde puede establecerse con los mismos productores estatales, llegar a otros estados del país e incluso ser exportados a los Estados Unidos de América. El control zoonosario encargado de regular y sancionar dicho tránsito es ineficiente y en algunos casos inexistente ²; además, la vinculación entre las autoridades de salud pública y las pecuarias es también pobre e ineficiente ^{1,4}, por lo que se hace necesario mejorar las acciones de vigilancia epidemiológica activa y pasiva, así como el monitoreo a través de técnicas de diagnóstico tamizaje que permitan la identificación rápida y eficaz para el control de enfermedades que afectan al ganado bovino mexicano ^{42,43,44,45, 66,67,68,69,70,71}.

En el año de 1996 debido al incremento de casos con signología nerviosa en ganado bovino de la región Frailesca del Estado de Chiapas, se estableció contacto con los productores de la misma, los cuales mostraron

la pueden transmitir de manera activa por sus hábitos de morder, como los perros y otros predadores (coyotes y murciélagos hematófagos, entre otros). Sin embargo, existen una gran variedad de especies susceptibles que constituyen un fondo de saco epidemiológico, pues si bien estas son víctimas de la rabia, es poco frecuente que la transmitan a su vez a otros animales de la misma o diferente especie. Tal es el caso de los rumiantes, equinos domésticos y del humano ⁶².

3. JUSTIFICACIÓN

Los problemas de tipo sanitario ocupan un lugar primordial en la ganadería chiapaneca, cabe señalar que la situación geográfica del Estado define al mismo como una puerta de entrada al país de bienes y servicios ya sea de manera legal o por medio del contrabando; los productos pecuarios como el ganado en pie, es introducido al país en donde puede establecerse con los mismos productores estatales, llegar a otros estados del país e incluso ser exportados a los Estados Unidos de América. El control zoonosario encargado de regular y sancionar dicho tránsito es ineficiente y en algunos casos inexistente ²; además, la vinculación entre las autoridades de salud pública y las pecuarias es también pobre e ineficiente ^{1,4}, por lo que se hace necesario mejorar las acciones de vigilancia epidemiológica activa y pasiva, así como el monitoreo a través de técnicas de diagnóstico tamizaje que permitan la identificación rápida y eficaz para el control de enfermedades que afectan al ganado bovino mexicano ^{42,43,44,45, 66,67,68,69,70,71}.

En el año de 1996 debido al incremento de casos con signología nerviosa en ganado bovino de la región Frailesca del Estado de Chiapas, se estableció contacto con los productores de la misma, los cuales mostraron

interés y disponibilidad para que se llevaran a cabo estudios epidemiológicos de diversas enfermedades de su ganado. Cabe señalar que estos se encuentran organizados y poseen registros adecuados y de calidad de sus animales, lo que garantiza la validez de la información recabada. Es por ello que se decidió realizar el análisis seroepidemiológico en esta zona con la finalidad de que este sirva como fuente de información que se complementará con estudios que se realicen en un futuro en el Estado, y que a su vez podrá enriquecer la información de las Campañas Oficiales de tuberculosis y brucelosis que se realizan en el Estado de Chiapas.

3.1 Aspectos importantes en la salud pública chiapaneca

Es importante señalar que existen padecimientos que afectan a los bovinos y que repercuten de manera trascendente en la salud pública, enfermedades como la brucelosis, la tuberculosis, la leptospirosis y la rabia, son padecimientos que se han reportado en la ganadería bovina así como en la población humana del Estado de Chiapas de acuerdo con el boletín epidemiológico semanal de la Secretaría de Salud ^{2,4,11,72,73}. Considerando además que el Estado es uno de los más castigados por problemas sociales como la pobreza extrema, conflictos político-sociales y culturales, falta de servicios de salud y analfabetismo, la transmisión de padecimientos zoonóticos puede ser importante. Algunas cifras que revelan los agudos problemas de la población chiapaneca son por ejemplo, los niveles de analfabetismo que según cifras de 1995, había 198,074 hombres y 344,141 mujeres mayores de 15 años analfabetas. De una población de 3,065,494 habitantes, el 8.9% no hablan español. En cuanto a la educación básica, en la población de 6 a 14 años del Estado el 15.6% no asiste a la escuela, el 22.5% de la población mayor de 15 años no recibe instrucción y el 31.9% de esta población tiene estudios de primaria

incompletos ². En los aspectos de vivienda y servicios, de un total de 689,848 viviendas que da cobijo a 3,560,258 habitantes, el 12.8% no cuentan con energía eléctrica, agua entubada ni drenaje, el 17.3% no cuentan con instalaciones de cocina y el 27.6% no cuentan con instalaciones de baño; además de las viviendas existentes en el Estado, el 38.8% poseen piso de tierra y el 52.4% están construidas con materiales ligeros, naturales y / o precarios. En los aspectos de servicios de salud del Estado según cifras de 1997, el 85.5% de la población se considera sin derechohabencia a los sistemas de salud del país.

Además, es importante mencionar que el Estado de Chiapas ha ocupado desde hace 10 años el primer lugar en mortalidad por tuberculosis en el país; durante 1995 se presentaron 325 muertes, lo que constituye el 9.4% del total de muertes por esta causa ⁷⁴; en 1992 se informaron 866 casos de tuberculosis en todas sus localizaciones, con lo que se alcanzó una tasa de 25.3 por cada 100,000 habitantes ⁷⁵. Así mismo, en el Estado de Chiapas durante el año de 1997 se presentaron 362 defunciones a causa de la tuberculosis y aunque la gran mayoría fueron presentaciones pulmonares, se presentaron 7 casos de tuberculosis meníngeas y de sistema nervioso central, 2 defunciones por tuberculosis intestinal y mesentérica, 1 defunción por tuberculosis ósea y en articulaciones y 19 casos diversos más ^{76,77}. Durante 1999 y hasta agosto de 2000, se han presentado 151 casos de tuberculosis no pulmonares en Chiapas.

En el caso de la brucelosis se han presentado 93 casos en la población chiapaneca desde 1998 y hasta el mes de agosto de 2000 ⁷⁵. En cuanto a la leptospirosis, debido a su carácter multivariado, existe un problema importante de falta de diagnóstico por los servicios de salud además de tomar en cuenta que la gran mayoría de los casos se presenta de manera

asintomática ³⁸ y por ello no se cuentan con reportes de la enfermedad en la población. No se han presentado casos de rabia humana en Chiapas durante 1999 y lo que va de este año, sin embargo, se presentaron 5 casos en México en 1999 y 3 más se han reportado durante este año ⁷⁵.

Por todo esto, se requiere de un monitoreo constante que permita recabar más información sobre estas enfermedades en forma primaria en áreas de alta prevalencia e incidencia, o en donde exista una transmisión activa del agente infeccioso por lo que se deben instrumentar estrategias para intentar cambiar la frecuencia de enfermedades que pueden ser controladas considerando el costo - beneficio de estos padecimientos ^{42,43,44,45,66,67,69,70,71,78,79}. Estudios previos en el Estado de Chiapas, han reportado datos acerca de prevalencias generales aparentes en el ganado bovino, como en el caso de *Brucella abortus* que se ha estimado alrededor del 8% ¹¹ y de *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* entre un 12.2% y 14% ⁷³. En el caso de la tuberculosis bovina, se había reportado al Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica (SIVE), 18 focos hasta el mes de junio de 2000, mientras que en el caso de rabia parálitica bovina, se notificó la aparición de 103 casos en el Estado en el mismo periodo ⁸⁰.

En este estudio se realizó el análisis seroepidemiológico de estas zoonosis debido a su importancia e impacto en la salud animal y salud pública. Se determinaron las seroprevalencias de la brucelosis, borreliosis, tuberculosis y leptospirosis. En el caso de la borreliosis se buscó evidencia serológica en el ganado a pesar de ser esta una enfermedad considerada como exótica en México^a y de ser el bovino una especie que aparentemente no contribuye epidemiológicamente de manera importante en la

^a ACUERDO mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. SAGAR. Publicado en el D.O.F. 5 de marzo de 1999.

transmisión del agente. En el caso de la rabia paralítica bovina se obtuvo el antígeno “extracto proteínico viral” con objeto de estandarizar la técnica de ELISA, con la finalidad de llevar a cabo un monitoreo de la inmunidad de hato en el ganado vacunado contra derriengue, esto es debido a que la técnica de ELISA se ha considerado como una herramienta útil en la determinación del contenido antigénico de las vacunas antirrábicas ⁸¹.

La epidemiología estudia la distribución de las enfermedades en las poblaciones y la utilidad que tiene el uso de la técnica de ELISA indirecta en los estudios de “escrutinio” es la de una herramienta importante en la detección de los agentes infecciosos así como de los factores predisponentes y desencadenantes que interactúan en los distintos procesos de enfermedad en las poblaciones. Estas actividades se deben complementar posteriormente con la confirmación del diagnóstico de las enfermedades de manera particular, es decir sobre los animales detectados previamente por serología. Los beneficios de este tipo de pruebas de escrutinio se ven reflejados en una mayor eficiencia de las actividades de vigilancia de los padecimientos; además de que se garantiza una mayor certeza en el diagnóstico definitivo ^{3,43,44,45,66,67,68,69,70,71,73,78,82}. Esta forma de realizar el diagnóstico se está practicando en los sistemas de vigilancia epidemiológica en México ya que el realizado por medio de cultivos y aislamientos utilizando medios sintéticos, cultivos de tejidos o animales vivos así como reactivos para la identificación del agente etiológico resultan ser sumamente costosos, de poca disponibilidad en términos económicos en función de llevar a cabo las actividades de vigilancia y diagnóstico epidemiológico por los laboratorios existentes en México; además los diagnósticos se hacen con base en el individuo que presenta signos clínicos y no en las poblaciones que la padecen en un nivel subclínico ^{42,43,44,45,66,67,68,69,70,71,79}.

4. HIPÓTESIS

- 1.- Se afirma que no existe una diferencia verdadera entre las variables de seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos (*Brucella abortus*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* y *Mycobacterium bovis*) en bovinos de acuerdo a su sexo, edad o ambos, y presencia o ausencia de gestación de la población de la que se extrajo la muestra.
- 2.- Se afirma que no existe una diferencia verdadera entre las variables de porcentaje de ELISA ≥ 80 que se definió como protector (seroconversión), contra el virus de rabia en bovinos vacunados y no vacunados contra derriengue, de acuerdo a su sexo, edad o ambos, y presencia o ausencia de gestación de la población de la que se extrajo la muestra.
- 3.- Se afirma que no existe una adecuada inmunidad de hato ($\geq 65\%$ de bovinos protegidos contra el virus de la rabia), provista por la vacunación en las explotaciones muestreadas.
- 4.- Se afirma que no existe una diferencia verdadera entre las variables de seroprevalencia y porcentaje de ELISA contra cinco agentes zoonóticos en el seguimiento prospectivo longitudinal de 35 bovinos de la región Frailesca

5. OBJETIVO GENERAL

Conocer la seroepidemiología de cinco agentes zoonóticos (*Brucella abortus*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *Mycobacterium bovis*, Virus de rabia paralítica bovina), que afectan a la ganadería bovina de explotaciones localizadas en la región Frailesca del Estado de Chiapas, mediante la utilización de la técnica inmunoenzimática de ELISA indirecta, con el objeto de conocer los efectos de sexo, edad y estado de gestación en la seroprevalencia e inmunidad de la población mustrada.

4. HIPÓTESIS

- 1.- Se afirma que no existe una diferencia verdadera entre las variables de seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos (*Brucella abortus*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* y *Mycobacterium bovis*) en bovinos de acuerdo a su sexo, edad o ambos, y presencia o ausencia de gestación de la población de la que se extrajo la muestra.
- 2.- Se afirma que no existe una diferencia verdadera entre las variables de porcentaje de ELISA ≥ 80 que se definió como protector (seroconversión), contra el virus de rabia en bovinos vacunados y no vacunados contra derriengue, de acuerdo a su sexo, edad o ambos, y presencia o ausencia de gestación de la población de la que se extrajo la muestra.
- 3.- Se afirma que no existe una adecuada inmunidad de hato ($\geq 65\%$ de bovinos protegidos contra el virus de la rabia), provista por la vacunación en las explotaciones muestreadas.
- 4.- Se afirma que no existe una diferencia verdadera entre las variables de seroprevalencia y porcentaje de ELISA contra cinco agentes zoonóticos en el seguimiento prospectivo longitudinal de 35 bovinos de la región Frailesca

5. OBJETIVO GENERAL

Conocer la seroepidemiología de cinco agentes zoonóticos (*Brucella abortus*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *Mycobacterium bovis*, Virus de rabia paralítica bovina), que afectan a la ganadería bovina de explotaciones localizadas en la región Frailesca del Estado de Chiapas, mediante la utilización de la técnica inmunoenzimática de ELISA indirecta, con el objeto de conocer los efectos de sexo, edad y estado de gestación en la seroprevalencia e inmunidad de la población mustrada.

5.1 Objetivos específicos

1. Determinar y buscar diferencias significativas entre las seroprevalencias generales contra *Brucella abortus*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* y *Mycobacterium bovis* en bovinos muestreados.
2. Conocer y comparar las seroprevalencias por sexo, edad y presencia de gestación contra los cuatro agentes zoonóticos anteriormente citados a partir de muestras de suero de bovinos de la región Frailesca obtenidas en 1996 y 1998.
3. Calcular la prevalencia real para cada uno de los cuatro agentes zoonóticos a partir de las tasas de seroprevalencia general aparente, y de la sensibilidad y la especificidad de la técnica inmunoenzimática de ELISA reportada.
4. Calcular el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, así como la precisión o certeza a partir de las tasas de seroprevalencia general aparente, así como de la sensibilidad y la especificidad de la técnica inmunoenzimática de ELISA reportada.
5. Determinar el grado de concordancia entre la técnica de ELISA indirecta y las pruebas de tarjeta y Rivanol en el diagnóstico epidemiológico de *Brucella abortus*.
6. Establecer el grado de concordancia entre la técnica de ELISA indirecta y la prueba de aglutinación microscópica en el diagnóstico epidemiológicos de la leptospirosis en el ganado bovino.
7. Purificar un extracto proteínico del virus rábico a partir de la vacuna antirrábica cepa ERA obtenida de virus vivo modificado en cultivo de tejido de origen porcino con el uso de un gradiente de sacarosa para su posterior utilización como antígeno en la técnica de ELISA indirecta.

8. Titular y cuantificar el extracto proteínico del virus rábico para su uso posterior como antígeno en el proceso de estandarización de la técnica de ELISA indirecta.
9. Estandarizar la técnica de ELISA indirecta con el fin de aplicarse en el análisis de la respuesta vacunal contra la rabia paralítica en bovinos.
10. Obtener los valores de porcentaje de ELISA contra el virus de la rabia y compararlos entre todas y cada una de las explotaciones muestreadas, del mismo modo comparar dichos valores tomando en cuenta la presencia de vacunación, la edad de los animales y el año en el que se llevó a cabo el muestreo.
11. Determinar y comparar los valores de porcentaje de ELISA contra los cinco agentes zoonóticos así como las seroprevalencias contra cuatro agentes zoonóticos en el grupo de 35 bovinos que se muestrearon durante los 3 años del estudio (1996, 1998 y 1999) con el fin de conocer la dinámica de la respuesta serológica de estos animales y la tendencia observada a través del tiempo en comparación con el muestreo general realizado en la población bovina de la región Frailesca, Chiapas.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Sitio del estudio.- Este se realizó con ganado bovino en un total de 19 explotaciones localizadas en la región Frailesca del Estado de Chiapas, México a través de un estudio transversal o de corte, durante los años de 1996 y 1998. De manera simultánea se llevó a cabo un estudio prospectivo longitudinal en 35 animales provenientes de 7 de los 19 ranchos incluidos anteriormente y muestreados en 1996, 1998 y 1999. Estos también fueron probados contra los cuatro agentes zoonóticos bacterianos (*Brucella abortus*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* y *Mycobacterium bovis*) y para los porcentajes de ELISA contra el virus de la rabia.

6.2 Determinación del tamaño mínimo de la muestra.- Se definió utilizando la fórmula recomendada por Kish y Leslie.⁸³

$$n' = \frac{\hat{p}(1-\hat{p})(Z_{1-\alpha/2})^2}{e^2}$$

En donde: n' = Tamaño de la muestra.

e = Límites deseados de error. (05)

p = Prevalencia (08)

$Z_{1-\alpha/2}$ = Valores críticos normales bilaterales. (1.96)

En $n' / N > 10\%$, entonces $n = \lfloor n' / \{ 1 + (n' - 1) / N \} \rfloor$

En $n' / N < 10\%$, entonces $n = n'$

Desarrollando:

$$\begin{aligned} & \frac{.08 (.92) (1.96)^2}{(.05)^2} \longrightarrow \frac{(.0736) (3.8416)}{.0025} \longrightarrow \frac{.2827417}{.0025} \\ \longrightarrow & \quad \mathbf{113.09668} \geq \quad \mathbf{113.} \end{aligned}$$

Sabiendo que el inventario bovino de la zona correspondió a 257,873 cabezas entonces $113/257,873 = 0.043\%$. Como 0.04% es menor que 10%, el tamaño mínimo de la muestra fue de al menos **113 animales**.

Se calculó a partir de una población de 257,873 animales, ² con un nivel de confianza del 95% y una estimación de prevalencia de 8% correspondiente a la reportada de la brucelosis bovina en estudios previos realizados en el Estado de Chiapas. ¹¹ Esta tasa se consideró de manera general para la determinación del tamaño mínimo de la muestra para los cinco agentes debido a que esta fue la mas baja conocida en la región de las zoonosis contempladas en este estudio, ya que en el caso de la borreliosis no se cuenta con estimación alguna, debido a que es considerada como exótica en México y se pretendió evaluar hallazgos serológicos con la técnica de ELISA. Los cálculos se realizaron a través del paquete estadístico Epistat.¹¹

6.3 Selección de la muestra y tipo de muestreo.

El muestreo fue de tipo no probabilístico, por conveniencia, es decir, aquellas explotaciones incluidas en este estudio fueron seleccionadas producto del interés de algunos de los productores de la región; sin embargo, es importante mencionar que los estratos de los animales muestreados en cada explotación y de cada edad y sexo, fueron seleccionados totalmente al azar por un método de lotería sin reemplazo, además de que las explotaciones que constituyeron este estudio se encontraban distribuidas en los cuatro municipios que conforman la región Frailesca y poseían características zootécnicas similares a la mayoría de los ranchos de la región; por esto, se consideró como marco

¹¹ True Epistat © (Database processing program). Epistat Services, 1987. version 6.02. Center for disease Control and Prevention (CDC), U.S.A. 1994.

muestral a la totalidad de la población registrada por censo oficial del INEGI ² para la región.

Previo al muestreo de los animales se formularon preguntas a través de una encuesta a los encargados o propietarios de las explotaciones, las cuales fueron contestadas con fundamento en los registros de cada bovino muestreado. (Figura 2)

6.4 Toma y conservación de las muestras de suero.- Las muestras sanguíneas fueron obtenidas mediante punción en la vena coccígea, colectándose aproximadamente un volumen de 10 ml. por medio de sistema vacutainer; posteriormente se separó el suero por centrifugación a 650 g y se le añadió un crioprotector (glicerol 50%) para evitar la acción mecánica de los cristales de agua sobre las inmunoglobulinas al momento de su congelación. Los sueros se almacenaron en envases de plástico y se congelaron a -20 °C hasta el momento de su uso en el laboratorio ^{84,85}.

Se realizaron 3 muestreos que se llevaron a cabo en los años de 1996 (Octubre), 1998 (Julio) y 1999 (Mayo). Durante el primer muestreo (1996) se utilizaron 344 sueros de bovinos colectados y almacenados en el banco de sueros del programa de vigilancia epidemiológica estatal, correspondientes a 16 explotaciones que se encontraban dispersas en la región Frailesca. Se realizó además un segundo muestreo en el mes de julio de 1998 en 13 explotaciones, de las cuáles 10 fueron las mismas de las 16 explotaciones muestreadas dos años antes, obteniéndose un total de 294 muestras, de las cuáles 52 correspondían a animales muestreados en 1996 y por último, en 1999 se realizó un tercer muestreo con el objetivo de conformar un estudio prospectivo longitudinal en donde el criterio de selección fue el de muestrear a aquellos animales que fueron considerados

en los dos muestreos anteriores y de los cuáles solamente se lograron coleccionar 35 muestras, por lo que el estudio prospectivo longitudinal de estos tres años se realizó con dicho número de animales.

6.5 Selección y características de los animales muestreados.- Se anotó la identificación del animal, edad, sexo, raza y presencia o no de gestación en las hembras en edad reproductiva. El criterio de inclusión de los animales se orientó hacia el objetivo de identificar las enfermedades de acuerdo a su etapa productiva, es por ello que se utilizaron los sueros de animales: becerros (≤ 4 meses de edad), animales en desarrollo - destetados (> 4 a 36 meses de edad), y finalmente animales adultos mayores de 36 meses, ^{5,42,43,44,45,66,67,68,69} de esta manera para todas las enfermedades. Los sueros obtenidos en los tres muestreos provenientes de hembras mayores de 6 meses correspondieron a animales que fueron vacunados contra la brucelosis con vacuna cepa 19 con dosis clásica o reducida tal y como lo marca la Norma contra la brucelosis.* Los animales fueron vacunados también contra la diarrea viral bovina, parainfluenza 3, virus herpes bovino tipo 1, *Haemophilus somnus*, clostridiasis y derriengue, (con vacuna de virus vivo modificado cepa ERA). Estos fueron vacunados después de los tres meses de edad. Además, el 37.2% de los animales seleccionados en 1996 fueron vacunados contra leptospirosis, esta misma característica se presentó en el 5.8% de los bovinos muestreados en 1998. Las características de los muestreos realizados se exponen en el Cuadro 1.

6.6 Antígenos utilizados

Para la realización de las pruebas, se utilizaron los siguientes antígenos:

- *Brucella abortus* (**B. abortus**).- Se utilizó un antígeno celular completo a una concentración ajustada de 5 µg de proteína/ml, en una dilución de 1:500, obtenido mediante cultivo en caldo thiol y posterior centrifugación y sonificación en el Laboratorio de Servicios Nacionales Veterinarios del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América. **36,37,56,57,60,69**.
- *Borrelia burgdorferi* (**B. burgdorferi**) Se manejó un antígeno celular completo de *B. burgdorferi* cepa B31 a una concentración ajustada de 5 µg de proteína/ml, en una dilución de 1:50, obtenido mediante cultivo en medio de células de riñón de hámster (BHK) y posterior centrifugación y sonificación en el Departamento de Epidemiología y Medicina Preventiva de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Davis, California, E.U.A. **36,37,56,57,60,69**.
- *Leptospira interrogans* serovar *hardjoprajitno* (**L. hardjo**).- Se empleó un antígeno celular completo a una concentración ajustada de 5 µg de proteína/ml, en una dilución de 1:200, obtenido en los laboratorios Difco, P.O. Box 1058 A, Detroit, MI. 48232, E.U.A. **36,37,56,57,60,69**.
- *Mycobacterium bovis* (**M. bovis**).- Se usó un derivado proteínico purificado de *M. bovis* cepa AN5 a una concentración ajustada de 5 µg de proteína/ml, en una dilución de 1:640 ⁴².
- Virus de rabia (**VR**).- Se empleó un extracto proteínico viral obtenido por purificación en un gradiente de sacarosa a partir de una vacuna contra derriengue cepa ERA de virus vivo modificado en cultivo de tejido de origen porcino **30,35,55,56,58,71**.

NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. México (DF): SAGAR, 1996.

En este caso, el antígeno de rabia fue purificado, titulado y cuantificado en los laboratorios de Seroepidemiología y Biología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como en el laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., para su uso en estudios epidemiológicos mediante la técnica de ELISA indirecta con las siguientes características: dilución 1:200 con una concentración de 255 µg/ml, es decir 12.75 µg por pozo.

6.7 Preparación del antígeno de rabia (Extracto proteínico viral)

A partir de 6 vacunas contra derriengue cepa ERA, producida por los laboratorios de investigación médica Connaught, se centrifugaron estas a 220 g por 20 minutos, para posteriormente rescatar el sobrenadante y desechar el sedimento. Luego se centrifugó a 18,000 g durante 2 horas, para rescatar el sedimento y eliminar sobrenadante. Se adicionó al sedimento obtenido 0.5 ml de solución amortiguadora Tris NT^{***} y se dejó reposar durante la noche a 4°C. Se procedió a elaborar el gradiente de sacarosa formado por 6 diferentes concentraciones: 50%, 44%, 38%, 32%, 26% y 20% (5.7 ml por gradiente), se centrifugó el gradiente a 220 g durante 20 minutos para después colocar la muestra resuspendida en el tubo con los gradientes y centrifugar nuevamente a 21,000 g durante 1 hora. Posteriormente se procedió a tomar la banda de virus, la cual midió aproximadamente 1.5 mm de espesor, perforando la pared del tubo con una aguja. Se centrifugó nuevamente la muestra obtenida a 21,000 g durante una hora eliminando posteriormente el sobrenadante, para luego resuspender en 1 ml de solución amortiguadora Tris NT.

^{***} Solución amortiguadora compuesta por NaCl 100Mm, Tris 50 Mm, pH 7.5 ajustado con HCl.

La titulación del extracto proteínico viral se realizó a través del método de tablero de ajedrez (checkerboard) utilizando cantidades constantes de suero y conjugado diluidos en contraparte con distintas diluciones del antígeno, para posteriormente realizar la prueba de ELISA como lo establece el protocolo general. El título que se obtuvo por este método fue de 1:200.

Posteriormente se procedió a cuantificar el extracto proteínico viral obtenido a partir del gradiente de sacarosa. Esto se realizó mediante 2 métodos. El primero fue la técnica colorimétrica de Bradford ⁸⁶ y el segundo se llevó a cabo mediante espectrofotometría ⁸⁷.

6.7.1 Método de Bradford para la cuantificación de proteínas

Se utilizaron 0.5 mg/ml de albúmina sérica bovina. (ASB), NaCl 0.15 M y solución colorante Azul de Coomasie.

En ocho tubos para microcentrífuga se depositaron por duplicado 0.5 mg/ml de ASB (5, 10, 15 y 20 μ l) y con NaCl se completó un volumen de 100 μ l. Del mismo modo, en 2 tubos para microcentrífuga se depositaron 100 μ l de NaCl 0.15 M; estos se utilizaron como testigos.

Posteriormente se adicionó 1 ml del colorante Azul de Coomasie, se agitaron y se dejaron reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente para que el colorante se uniera a la proteína existente en la muestra. Después, se procedió a la lectura por medio de un espectrofotómetro. Primero se determinó la curva de absorbancia a 595 nm utilizando una microcubeta (1 ml) y se definió una curva estándar a 595 nm contra la concentración de la proteína ASB, para después definir la absorbancia para la proteína problema y utilizar la curva estándar para conocer la concentración de la misma, mediante la graficación de los valores de

absorbancia y las diluciones de ASB y el valor de absorbancia de la proteína problema.

Ya habiendo definido las diluciones óptimas determinadas tanto de los sueros, los antígenos y el conjugado, se procedió a realizar la técnica de ELISA indirecta de acuerdo al siguiente protocolo.

6.8 Técnica de ELISA (Figura 3).

Se realizó la fijación del antígeno con la placa de fondo plano, para lo cual se preparó la dilución óptima (predeterminado por titulación específica para cada antígeno) con una solución fijadora amortiguada carbonato / bicarbonato pH 9.6. Posteriormente, se añadieron 50 µl de antígeno en cada pozo en una microplaca de fondo plano usando una pipeta de 12 canales y se cubrieron las placas con cinta o tapas de plástico y se dejaron a 4°C por 18 horas. Posteriormente, se eliminó el exceso de antígeno utilizando durante dos ocasiones una solución lavadora, la cuál estuvo compuesta por 8.5g de NaCl y 0.5 ml de detergente tween₂₀ en 1000 ml. de agua destilada. Luego se diluyeron 1:40^a los sueros a monitorearse así como los sueros testigos positivos y negativos con una solución amortiguadora Tris^b pH 7.4 en una placa de fondo oval y se transfirieron a la placa fijada con el antígeno. Se depositaron 50µl de los sueros testigos en las placas fijadas de la siguiente forma: a) Columna 1 (A-H) fue la columna de control sin suero. b) Columna 2, contenía los sueros testigos: pozos 2A y 2B fuertes positivos. Pozos 2C y 2D débiles positivos. Pozos 2E, 2F, 2G y 2H negativos. Después se colocaron 50 µl de los sueros a monitorearse por duplicado, (fueron 40 en una placa). La distribución de estos inició con el suero número uno en los pozos 3A y 3B, seguidos del

^a Dilución óptima predeterminada para estudios epidemiológicos, con esta dilución se evita el efecto de prozona en la interpretación de los resultados (Kurstak E. 1986.)

suero número 2 en los pozos 3C y 3D continuando con el suero número 3 (3E y 3F) para seguir con el 4 en los pozos 3G y 3H, y así consecutivamente, de tal forma que el comando de lectura del programa ELISA pudiera identificar los sueros específicos de cada animal por el patrón de lectura. (Figura 4). Después, se agitaron las placas por un minuto. Posteriormente, se colocaron las placas con su cubierta de plástico en una estufa a 37 °C durante una hora para luego aplicar la solución lavadora en 3 ocasiones y después retirar el exceso de humedad con un lienzo. Se agregaron 50 µl de conjugado IgG de conejo anti IgG de bovino marcado con peroxidasa de rábano picante (diluido 1:8000 en solución amortiguadora Tris). Se cubrieron con su tapa, se agitaron por un minuto, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Nuevamente a las microplacas se les aplicó 3 veces la solución lavadora y se secaron en un lienzo. Por último, se agregaron 100 µl por pozo de substrato el cuál estuvo compuesto por ABTS^c mezclado con peróxido de hidrógeno al 30% en una solución citrato con pH 4 que estuvo formada por ácido cítrico, agua destilada y NaOH. Previamente con una cantidad mínima de conjugado sobrante, se verificó el correcto funcionamiento del substrato asegurándonos que este hubiese reaccionado en menos de 2 minutos con la aparición de un color verde. Se agitaron las placas por 15 minutos (tomando como criterio el cambio de color de los sueros testigos positivos). Para detener la reacción enzimática, se agregaron 100 µl por pozo de solución paradora (0.1 M de ácido fluorhídrico al 48%) usando una pipeta de 8 o de 12 canales.

^b Solución comercial con Tris base y albúmina sérica bovina al 1%

^c 2,2' Azino-Di-(3 Ethylbenz-thiazoline sulfonic acid).

6.8.1 Interpretación de la técnica de ELISA

Inicialmente, los resultados de la prueba de ELISA fueron expresados en valores de absorbancia. La lectura de densidad óptica obtenida se relaciona con la actividad de anticuerpos; debido a esto, el suero fue diluido a una concentración que permitiera una evaluación objetiva del mismo. En este caso el título apropiado se determinó a una dilución de 1:40.

Los resultados se compilaron y almacenaron en una computadora conectada en interfase con la lectora mediante un programa de computación elaborado para este propósito; este programa realizó la evaluación del control de calidad de cada prueba mediante el análisis de las lecturas, la transformación a porcentajes de ELISA, el cálculo de la media de absorbancia de los sueros analizados y el cálculo de la desviación estándar del valor promedio de absorbancia de los sueros analizados por duplicado.

Se realizó la conversión de los valores de densidad óptica (valor crudo obtenido por el lector de ELISA) a unidades de medida que pudieran interpretarse más fácilmente (valor procesado). Para esto se utilizaron los *porcentajes de ELISA*, los cuales además de facilitar la interpretación, permitieron estandarizar y definir en una escala de 0 a 100 los resultados obtenidos ^{82,88,89,90}. Los porcentajes de ELISA se obtuvieron dividiendo los resultados de la densidad óptica de cada suero analizado entre los valores de la densidad óptica de los sueros testigos positivos en una escala de 0 a 100% y así pudieron proveer un indicador correspondiente a la concentración de IgG en el suero problema ^{42,91,92}.

Con el objeto de establecer un control de calidad de la técnica de ELISA que a su vez garantizara la confiabilidad de que los resultados obtenidos para cada agente, así como que las comparaciones realizadas entre antígenos y estratos de la población fueran confiables, en cada muestra procesada se llevó a cabo el cálculo de los siguientes indicadores:

Valor discriminatorio. Es aquel que se obtiene a través del cálculo de la media de la densidad óptica de cada muestra analizada por duplicado en la microplaca, de esta se obtiene además la desviación estándar del promedio (DE). En aquellos casos donde la desviación estándar excedió un valor de 0.05, se observó un asterisco en los valores de la lectura lo que indicó la necesidad de repetir la prueba en esa muestra ^{42,69,91,92}. El valor de la diferencia correspondió a una prueba *t de estudiante*, considerando la técnica descrita ⁹¹.

Razón Positivo/Negativo. Es la razón que se obtuvo al dividirse el promedio de la densidad óptica de los sueros testigos positivos entre el promedio de la densidad óptica de los sueros testigos negativos. Esta razón se considera como una medida de poder discriminatorio de la prueba y en el caso de que el resultado fue menor de 5, se repitió la prueba con diferentes sueros testigos, con el fin de garantizar la confiabilidad de los resultados ^{91,92,93,94,95}.

La determinación de los *puntos de corte* en valores ya transformados a porcentajes de ELISA se estableció tomando como criterio el valor correspondiente a tres veces la desviación estándar hacia la derecha de la media observada en los sueros negativos representados por medio de un histograma, de la población probada contra cada agente infeccioso ^{42,43,44,45,66,67,68,69,91,92,93,94,95}.

La expresión de los resultados se realizó con un lector automático de ELISA* a una onda de absorbancia de 405/450 nm. Los resultados se registraron y almacenaron en una computadora conectada en interfase con el lector mediante un programa de computación elaborado para este propósito, que realizó la evaluación del control de calidad de cada prueba mediante el análisis de las lecturas, la transformación a valores de porcentaje de ELISA, el cálculo de la media de absorbancia de los sueros trabajados por duplicado y el cálculo de la desviación estándar del promedio. El reporte por placa individual mostró las lecturas de densidad óptica y sus valores transformados a porcentaje de ELISA, así como un histograma de resultados por microplaca además del final acumulado, con el objeto de tener una representación gráfica de los resultados de cada placa y por agente o estrato de la población analizada. Finalmente, por medio del programa de ELISA se elaboraron los informes finales de seroprevalencia con la información de los animales muestreados y los resultados obtenidos en porcentaje de ELISA, así como el porcentaje de animales positivos de acuerdo al punto de corte establecido. Estos resultados generales y específicos permitieron el análisis estadístico de la seroprevalencia general así como de la seroprevalencia en función de la edad, del sexo, presencia o ausencia de la gestación y sus diversas combinaciones. Para este propósito, se realizó la inclusión de estos datos a un programa de DataBase III Plus** para obtener los informes finales en los que se incluyó la especie animal, sexo, raza, función zootécnica, gestación y sitio de muestreo, además de otras variables de prevalencia general, así como el resultado individual por antígeno de cada suero procesado y los valores de puntos de corte para la interpretación de cada respuesta a determinado antígeno. Estos resultados globales e

* Dynatech modelo MR580.

** dBASE III PLUS versión 1.1 Ashton - Tate 1985-1986.

individuales permitieron el análisis y evaluación epidemiológica de la información. Se realizaron informes de la prevalencia (estudios de corte de sección estáticos), usando paquetes estadísticos como <<Epi Info>> (Epi6), *** <<Epistat>> y <<Statgraf >>. Las gráficas y hojas de cálculo fueron generadas usando <<Excel 2000>>.**** Se llevó a cabo el cálculo de los intervalos de confianza a los resultados obtenidos de seroprevalencia aparente utilizando el paquete estadístico <<Epistat>>.

6.9 Análisis estadístico de los datos

Se determinó la seroprevalencia general y específica; a los resultados obtenidos se les realizó un análisis estadístico de frecuencias, con la prueba de Ji cuadrada, utilizando un nivel de confianza del 95% ⁸³.

6.10 Cálculo de la seroprevalencia real y valores predictivos.

Se realizó el cálculo de la seroprevalencia real para cada agente a partir de la seroprevalencia aparente, así como de la sensibilidad y especificidad; de la misma manera se determinaron los valores predictivos positivo y negativo para cada agente con el uso de cuadros de doble entrada a partir de los valores de sensibilidad y especificidad reportados por la literatura. En el caso de *B. abortus*, la sensibilidad reportada fue de 99.6% y la especificidad fue de 98.6% ⁹⁶. Para *B. burgdorferi* la sensibilidad reportada fue del 84.8% y la especificidad fue del 100% ^{31,97}. En *L. hardjo* se usó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99.4% ⁹⁸ y para *M. bovis*, la sensibilidad se reportó de 56.4% y la especificidad de 65.6% ⁶⁰. Se utilizaron cuadros de contingencia para llevar a cabo los cálculos de las características de la prueba de escrutinio (ELISA indirecta) utilizada.

*** Epi Info, versión 6 A word-processing Database and statistics Program for Public Health on IBM Compatible Microcomputer, 1994.

**** Microsoft ® Excel 2000 (9.0.2812) Copyright © 1985 - 1999 Microsoft Corporation.

6.11 Análisis de la concordancia entre pruebas serológicas

Se llevaron a cabo las concordancias entre las técnicas de ELISA indirecta y de tarjeta así como con la prueba de Rivanol, en el caso de *B. abortus*. Para realizar la concordancia entre estas técnicas se utilizaron 31 muestras de suero (aproximadamente el 10% de las que se colectaron por año). A aquellos sueros que fueron positivos a la prueba de tarjeta se les realizó la prueba de Rivanol. En el caso de *Leptospira* se compararon los resultados de algunos sueros por ELISA indirecta con los obtenidos por aglutinación microscópica utilizando 42 muestras de suero colectadas en 1998.

6.12 Prueba de tarjeta

Se requirieron muestras de suero no hemolisado y antígeno autorizado (cepa 1119-3 de *B. abortus*, teñido con Rosa de Bengala en ácido láctico, pH de 3.65 ± 0.05 , concentración celular del 8%).

Se colocaron los sueros y el reactivo 30 a 60 minutos a temperatura ambiente y pH de 3.65 con el fin de favorecer la aglutinación. Se colocó 30 μ l de suero en cuadros sucesivos de la placa siguiendo un orden de izquierda a derecha y de arriba abajo. Posteriormente, se depositaron 30 μ l de antígeno al lado de cada gota de suero, para evitar que la reacción antígeno-anticuerpo se inicie. Se procedió a mezclar al momento de la lectura, considerando que es importante lograr una mezcla homogénea. Los resultados de la prueba de tarjeta solamente arrojaron dos clasificaciones: positivos o negativos, dependiendo de la presencia o ausencia de aglutinación, según sea el caso.

6.13 Prueba de Rivanol

Los sueros y el reactivo se dejaron de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, con pipetas de 1 ml, con punta diferente para cada

7. RESULTADOS

7.1 Seroprevalencia general

Las tasas de seroprevalencia general aparente observadas durante el año de 1996, se exponen en la Figura 5. Estos resultados mostraron que *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* (*L. hardjo*); se encontró con la más alta seroprevalencia (31.1%), seguido por *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*); que presentó una seroprevalencia de 12.5%. Del mismo modo, se observó para *Brucella abortus* (*B. abortus*); 9.3% y en el caso de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) una seroprevalencia del 7.3%.

Para el año de 1998, los resultados de seroprevalencia general aparente también representados en la Figura 5, mostraron una seroprevalencia de 17.0% contra *L. hardjo* y que en comparación con la seroprevalencia obtenida en 1996, fue catorce puntos porcentuales menor, de tal manera que se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre estos valores. En el caso de *B. burgdorferi*, la seroprevalencia contra este agente se incrementó al 15.6% y contra *B. abortus* la seroprevalencia fue de 9.5% mientras que para *M. bovis* 5.8% (Cuadro 2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las seroprevalencias generales de 1996 y 1998, en los casos de *B. abortus*, *B. burgdorferi* y *M. bovis* (Cuadro 3).

7.2 Seroprevalencia por sexo

Al llevarse a cabo la estratificación de la población tomando en cuenta el sexo de los animales, en la población muestreada en 1996, la seroprevalencia por sexo fue generalmente mayor en el caso de las hembras: en el caso de *L. hardjo*, estas presentaron una seroprevalencia de 32.7%; *B. burgdorferi*, 13.6%; *B. abortus*, 9.9% y *M. bovis*, 7.8%, mientras

que para los machos, se obtuvo una seroprevalencia de *L. hardjo* de 19.5%, *B. burgdorferi*, 5.9%; *B. abortus*, 4.9% y *M. bovis*, 3.9% (Cuadro 4).

Para el año de 1998, la seroprevalencia por sexo fue también mayor en el caso de las hembras, de tal modo que para *L. hardjo* la seroprevalencia fue de 17.3%; para *B. burgdorferi*, 16.2%, y para *M. bovis*, 6.0%; mientras que para los machos, se obtuvo una seroprevalencia de *L. hardjo* de 13.8%; contra *B. burgdorferi* igual a 10.3%, y para *M. bovis*, 3.4%. Sin embargo en el caso específico de *B. abortus* la seroprevalencia en machos fue mayor (13.8%) que en hembras (9.0%) (Cuadro 5).

Nuevamente, en el Cuadro 3 se observa que las únicas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) que se encontraron, fueron al comparar las seroprevalencias contra *L. hardjo* entre los estratos de hembras (1996 y 1998), mientras que para los tres agentes restantes no se encontraron diferencias al compararse entre sí los estratos de machos y hembras así como el año de realización del muestreo.

7.3 Seroprevalencia por edad

El criterio adoptado para llevar a cabo la estratificación de la población muestreada conforme a estratos de edad fue el de dividir a los animales de acuerdo al manejo regional en 3 grupos (animales jóvenes ≤ 4 meses, desarrollo >4 a 36 meses, y adultos > 36 meses, época promedio al primer parto), En la Figura 6 que representa al año de 1996, se observa que contra *B. abortus* hubo una seroprevalencia en el caso de los animales jóvenes de 5.9%, en los animales en desarrollo la seroprevalencia fue de 9.5% y en los adultos fue de 10.2%. Contra *B. burgdorferi*, los becerros tuvieron una seroprevalencia de 9.8%; los animales en desarrollo, 6.0% y en los adultos, 24.3% (Figura 7). En el caso de *L. hardjo*, la seroprevalencia

en becerros fue de 25.5%, de 34.5% en los bovinos en desarrollo y de 30.5% en los adultos (Figura 8). Por último, contra *M. bovis*, la seroprevalencia en becerros fue de 5.9%, en animales en desarrollo fue de 4.3% y de 9.6% en los adultos (Figura 9).

Durante el año de 1998, en el caso de los animales jóvenes, se encontró una seroprevalencia contra *B. burgdorferi* del 13.6%, *L. hardjo*, 11.4%, *B. abortus* 6.8% y en el caso de *M. bovis* 6.8%. En los animales en desarrollo, se encontró una seroprevalencia contra *B. burgdorferi* de 18.5%, *L. hardjo* 16.3%, *B. abortus* 13.0% y contra *M. bovis* 2.2%. En los animales en producción (adultos), la seroprevalencia contra *L. hardjo* fue de 19.0%, para *B. burgdorferi* fue de 14.5% para *B. abortus* 8.2% y en el caso de *M. bovis* 7.8% (Figura 10).

En el Cuadro 6 y 7 respectivamente, se muestran y se comparan las tasas de seroprevalencia por edad, con sus respectivos intervalos de confianza (95%), de 1996 y 1998.

Al realizar las comparaciones estadísticas entre los diferentes estratos de edad y año de muestreo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), en el caso de *L. hardjo* entre los estratos de animales en desarrollo de 1996 y el mismo estrato de 1998, de la misma manera, para *L. hardjo* se observaron diferencias significativas estadísticas entre los animales en producción muestreados en 1996 y 1998.

En el caso de *M. bovis* se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las seroprevalencias presentadas por los becerros y los animales en producción en 1998 (Cuadro 3).

7.4 Seroprevalencia por sexo-edad

En la Figura 11 se resumen y se comparan las seroprevalencias por sexo y edad que presentó la población muestreada en 1996, y en la Figura 12, 1998.

Del mismo modo, en el Cuadro 6, se muestran el número de animales por cada estrato de sexo-edad, así como año de muestreo y las tasas de seroprevalencia observada en cada uno de ellos.

Análisis estadístico de los estratos “sexo – edad”.

En el Cuadro 8 se muestran los resultados del análisis estadístico de cada uno de los estratos tomando en cuenta los diferentes grupos de sexo y edad. Al llevarse a cabo las contrastaciones entre los diferentes grupos se encontró que:

- La tasa de seroprevalencia contra *L. hardjo* observada en los bovinos machos en desarrollo, contra la tasa encontrada en los sementales en el muestreo realizado en 1996, fue estadísticamente diferente ($P = 0.035$).
- Existieron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.013$) al comparar la seroprevalencia contra *L. hardjo*, entre machos y hembras en producción muestreados en 1996.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar algún otro estrato de sexo y edad, ni tampoco en ninguno de los tres agentes zoonóticos restantes diferentes a *L. hardjo*.

7.5 Seroprevalencia en función de la gestación.

En función de la *presencia o ausencia de la gestación en las hembras en edad reproductiva*, se observó lo siguiente: durante 1996, se observó que algunas hembras gestantes en desarrollo (vaquillas de primer parto),

tuvieron las siguientes seroprevalencias: contra *L. hardjo*, 47.0%; *B. burgdorferi* 11.8% y 5.9% contra *B. abortus*; mientras que contra *M. bovis* 5.5%. En las hembras gestantes adultas las seroprevalencias fueron: *B. abortus*, 21.3%; *L. hardjo*, 20.5%; *B. burgdorferi*, 14.7% y *M. bovis*, 9.3%. En las hembras en desarrollo no gestantes se encontraron anticuerpos contra *L. hardjo* en el 34.9%, contra *M. bovis* 9.3%; y contra *B. abortus* y *B. burgdorferi*, la seroprevalencia fue de 4.6%, mientras que en las vacas adultas no gestantes, las tasas fueron: *L. hardjo*, 31.6%; *B. burgdorferi*, 18.9%; *M. bovis*, 9.5% y contra *B. abortus*, 6.3% (Figura 13).

En la Figura 14 se observa que durante 1998 se encontró que las hembras en desarrollo gestantes tuvieron una seroprevalencia de 27.3.% contra *L. hardjo*, y en el caso de *B. abortus* y *B. burgdorferi*, 9.1%; mientras que el mismo estrato fue seronegativo a *M. bovis*. Las vacas adultas gestantes tuvieron 14.5% de seropositivas contra *L. hardjo*, 11.5%, *M. bovis* 9.8% y contra *B. burgdorferi* y *B. abortus* 6.5%, mientras que en las hembras en desarrollo no gestantes se encontraron anticuerpos contra *B. burgdorferi* en el 21.6% de las vaquillas, 16.2% contra *L. hardjo*; *B. abortus*, 13% y para *M. bovis*, la seroprevalencia fue de 5.4%. En el caso de las hembras adultas no gestantes las seroprevalencias contra *B. burgdorferi* y *B. abortus* decrecieron en relación a las encontradas en las hembras en desarrollo aunque no de manera dramática (17.0% y 9.1% respectivamente), mientras que la seroprevalencia contra *L. hardjo*, se incrementó en estas hembras a 25.0% y a 5.7% contra *M. bovis* (Cuadro 9).

El análisis estadístico de este estrato se muestra en el Cuadro 10 y arrojó los siguientes resultados:

- En el caso de *B. abortus*, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.027$) entre las hembras adultas gestantes y las

hembras adultas no gestantes muestreadas en 1996. De la misma manera, en este agente la seroprevalencia encontrada en hembras adultas gestantes en 1996 fue estadísticamente diferente ($P = 0.046$), a la seroprevalencia encontrada en 1998 en el mismo estrato.

- Hubo diferencias estadísticamente significativas, ($P = 0.003$) entre las seroprevalencias contra *L. hardjo* observadas en hembras en desarrollo no gestantes durante 1996 y 1998.
- Se observaron diferencias estadísticas significativas ($P = 0.0001$), en las seroprevalencias contra *M. bovis*, al comparar a las hembras en desarrollo gestantes contra las hembras adultas gestantes en los años 1996 y 1998.

7.6 Seroprevalencia por explotación muestreada.

De la misma manera se calculó la seroprevalencia aparente contra los cuatro agentes zoonóticos bacterianos en cada explotación incluida en este estudio donde se pudo observar que efectivamente hubo variaciones importantes en las tasas de seroprevalencia entre ranchos y años de muestreo. (Cuadro 11)

7.7 Resultados de la seroprevalencia general real y valores predictivos de la técnica de ELISA indirecta

Se obtuvieron las seroprevalencias generales reales, las cuales fueron para 1996, en el caso de *B. abortus* de 10.5%, y de 10.9% en 1998, para *B. burgdorferi* en 1996, la seroprevalencia real fue de 10.5%, y en 1998 fue de 13.3%. La tasa para *L. hardjo* en 1996 fue de 31.7% y de 17.7% en 1998, mientras que para *M. bovis*, la seroprevalencia real fue de 38.9% en 1996 y de 35.7% en 1998. Se calcularon también los valores predictivos positivo y negativo, así como la certeza o precisión en cada uno de los agentes zoonóticos estudiados, los cuáles se muestran en el Cuadro 12.

7.7.1 Resultados del análisis de concordancia entre pruebas serológicas

En el caso del muestreo serológico para el diagnóstico epidemiológico de *B. abortus*, se compararon los resultados arrojados por la técnica de ELISA indirecta con los obtenidos por la prueba de tarjeta y rivanol. La concordancia calculada fue baja o pobre de acuerdo con el criterio de interpretación.

Para el diagnóstico epidemiológico de *L. hardjo*, se calculó la concordancia entre los resultados reportados por la técnica de ELISA indirecta y aglutinación microscópica. El valor de concordancia calculado fue también bajo (Cuadro 13).

7.8 Evaluación de la respuesta vacunal contra la rabia por la técnica de ELISA

7.8.1 Resultados de 1996

Los resultados en el ganado muestreado en el año de 1996 fueron los siguientes:

Al realizar la técnica de ELISA indirecta en los sueros de animales vacunados contra derriengue, se encontró que 38 (11.0%) obtuvieron un porcentaje de ELISA ≥ 80 . Este valor se consideró como suficiente para denominar a un animal como “protegido” obedeciendo a que este porcentaje es análogo al título de seroconversión de anticuerpos contra la rabia. Este resultado general muestra una baja e inadecuada “inmunidad de hato” en las poblaciones incluidas en este estudio.

En los resultados obtenidos tomando en cuenta el sexo de los animales muestreados, se encontró que en los machos, el porcentaje de bovinos protegidos fue del 7.8%, mientras que el de las hembras fue del 11.6%. No se encontró diferencia estadísticamente significativa tomando en cuenta el sexo de la población muestreada.

La frecuencia de animales protegidos en 1996, estratificando a la población en función de la edad de los mismos se pudo observar de la siguiente manera: En los animales jóvenes hubo un 7.1%, en los animales en desarrollo se encontró un 11.3% y en los animales adultos o en producción, el porcentaje de protegidos fue del 12.0% (Figura 15).

De igual manera, tomando en cuenta el sexo y la edad de los animales se observó que las becerras tuvieron un 8.1% y los becerros un 5.3%; en las hembras en desarrollo hubo un 9.3% de bovinos protegidos, mientras que en los machos en desarrollo el porcentaje fue de 27.3% y por último, en las hembras en producción hubo un 13.5%, y de los 21 sementales muestreados ese año, no se encontraron protegidos.

De la misma forma, se definieron los porcentajes de animales con un valor de ELISA ≥ 80 "protegidos" y en los cuales se puede apreciar que ninguna de las 16 explotaciones incluidas en ese año alcanzaron un porcentaje del 65% de protección tal y como se observa en el Cuadro 14.

Por último, tomando en cuenta la presencia o no de gestación en las hembras en edad reproductiva, se observó una frecuencia de hembras protegidas del 11.7% en vacas gestantes y del 12.2% en hembras no gestantes. No obstante, la edad de estos animales también puede representar un sesgo en los valores citados previamente, por lo cuál se

realizó el análisis citando estas dos variables (edad y gestación) de manera simultánea, obteniéndose en aquellas hembras en desarrollo, que además estaban gestantes, no se encontraron hembras protegidas, mientras que en las hembras en producción – gestantes, la tasa de animales protegidos fue de 14.7%. En el caso de las hembras en desarrollo “vacías”, la tasa de protegidas fue de 9.3%, mientras que para las adultas no gestantes fue de 13.5%.

En el análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos, solamente se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.015$) entre los estratos de becerros y bovinos adultos en el año de 1996.

7.8.2 Resultados de 1998

En el ganado muestreado en 1998, los resultados fueron los siguientes: Se encontró al 10.5% de los bovinos con un porcentaje de ELISA ≥ 80 , al igual que en 1996, la “inmunidad de hato” en las poblaciones incluidas en este estudio fue baja e inadecuada.

En ninguna de las 13 explotaciones incluidas en ese año, el número de animales con un porcentaje de ELISA ≥ 80 (protegidos) fue igual o mayor al 65% (Figura 16).

Tomando en cuenta el sexo de los animales muestreados, se observó que de los 29 machos estudiados, ninguno tuvo un porcentaje de ELISA ≥ 80 , mientras que el de las hembras fue del 11.7%

Nuevamente, la Figura 15 muestra la frecuencia de animales protegidos tomando en cuenta la edad de los mismos, y esta mostró que en los animales jóvenes se presentó el 8.9% de protegidos, en los animales en

desarrollo hubo un 17.6% y en los animales adultos o en producción, el porcentaje de bovinos protegidos fue del 9.5%.

De igual manera, tomando en cuenta el sexo y la edad de los animales se encontró que en las becerras el porcentaje de protegidos fue de 10.5% y los becerros fueron seronegativos, en las hembras en desarrollo hubo un 20.8%, mientras que los machos en desarrollo fueron también seronegativos y por último, en las hembras en producción hubo un 10.0%, y los sementales al igual que los becerros y toretes fueron seronegativos.

Al realizar el análisis de la población tomando en cuenta la presencia o no de gestación en las hembras en edad reproductiva, se observó una frecuencia de hembras protegidas del 6.9% en vacas gestantes y del 15.2% en hembras no gestantes. En las hembras en desarrollo gestantes, se observó un 9.1% de hembras protegidas, mientras que en las hembras en producción gestantes, la tasa de animales protegidos fue de 6.5%. Del mismo modo, en las hembras en desarrollo no gestantes hubo un 21.6% de protegidas y en las adultas el porcentaje fue de 12.5.

En el caso específico de Rv se puede apreciar que el número de animales con un porcentaje de ELISA ≥ 80 tendió a disminuir durante los 2 años en que se realizó el estudio.

7.9 Seguimiento prospectivo longitudinal de 35 animales 1996 - 1999

En este estudio se llevó a cabo el seguimiento particular de 35 animales existentes al inicio del estudio en 1996 y que se encontraban vivos al final del estudio en 1999 con la finalidad de estudiar la dinámica de la respuesta serológica en los mismos animales a través del tiempo (Cuadro 1).

En la Figura 17 se representan los resultados de seroprevalencia general de los 35 animales muestreados contra los cuatro agentes zoonóticos bacterianos. En 1996 dichos animales tuvieron una seroprevalencia contra *B. abortus* del 20.0%, contra *B. burgdorferi* 51.4%, *L. hardjo* 22.9% y contra *M. bovis* de 15.7%.

En 1998, las seroprevalencias generales fueron las siguientes: *B. abortus* 14.3%; *B. burgdorferi* 22.9%, *L. hardjo* 22.9% y *M. bovis* 17.1%. Por último, en 1999, *B. abortus* se encontró en el 2.8%, contra *L. hardjo*, 22.8%, mientras que contra *B. burgdorferi* y *M. bovis*, los animales muestreados fueron seronegativos

La composición de la muestra en cuanto a la edad de los animales al inicio del estudio (1996), dejó ver que había un becerro, 6 animales en desarrollo y 28 animales adultos de acuerdo al criterio de clasificación señalado anteriormente. Las seroprevalencias encontradas se representan en el Cuadro 15, donde se puede observar que tiende a incrementarse en los animales en desarrollo respecto a los becerros y después se aprecia un ligero descenso cuando los animales son adultos.

Las seroprevalencias observadas en las hembras tomando en cuenta la presencia o ausencia de la gestación fueron las siguientes:

En el año de 1996, las vacas gestantes tuvieron una seroprevalencia contra *B. abortus* de 30.8%; *B. burgdorferi* 46.1%, *L. hardjo* 23.1% y contra *M. bovis* 7.7%. En las hembras no gestantes la seroprevalencia contra *B. abortus* fue 20.0%; *B. burgdorferi* 53.3%, contra *L. hardjo* 33.3% y *M. bovis* 13.3%.

En 1998 las hembras gestantes tuvieron contra *B. abortus* 17.7%; *B. burgdorferi* 29.4%, *L. hardjo* 35.3% y *M. bovis* 17.6%. En las no gestantes, contra *B. abortus* 16.7%; *B. burgdorferi* 25.0%, *L. hardjo* 8.3% y contra *M. bovis* 16.7%.

Finalmente, en 1999 los resultados fueron: *B. abortus* 5.3%; *B. burgdorferi* 26.3%. En las hembras no gestantes, contra *B. abortus* fueron seronegativas; contra *B. burgdorferi* 33.3%. En los casos de *L. hardjo* y *M. bovis*, tanto las hembras gestantes como vacías fueron seronegativas en este año (Figura 18 y 19).

En el caso de la seroprevalencia por sexo, no se llevaron a cabo comparaciones debido a que solamente se muestrearon 2 sementales en relación a 33 hembras seleccionadas en este estudio; sin embargo, el semental No. 44 de cinco años de edad en 1996 fue seropositivo a *B. burgdorferi* durante los tres años del estudio y el semental No. 24 de 6 años de edad en 1996, fue seronegativo a los cuatro

En el caso de rabia parálitica, se obtuvieron los resultados generales de animales protegidos; en 1996, 37.1%, en 1998, 22.9% y en 1999 el 8.6% de animales protegidos. También se definieron los resultados de cada uno de los ranchos muestreados en este año.

Al igual que en el estudio transversal realizado en 1996 y 1998, no se encontró en ninguno de los 7 ranchos muestreados el 65% o más de animales que hubieran presentado seroconversión, a excepción del rancho Argentina, el cuál no fue considerado pues solamente se muestreó un animal en esa explotación en ese año.

En el análisis estadístico se encontraron diferencias estadísticamente significativas al contrastar los resultados de *B. burgdorferi* ($P = 0.030$) y *L. hardjo* ($P = 0.048$) entre los estratos de becerros, desarrollo y producción en 1996.

suero, se colocaron 0.4 ml de solución de Rivanol en cada tubo de ensayo. Se procedió a mezclar de inmediato por agitación y dejar reposar por 20 a 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 200 g por 5 minutos, para luego extraer con la ayuda de una micropipeta o pipeta serológica 0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 ml (80, 40, 20 y 10 μ l respectivamente) del sobrenadante. Cada una de las cantidades se depositaron en un cuadro de la placa de vidrio de izquierda a derecha de arriba abajo, dejando un cuadro limpio entre cada una de las gotas. Junto a cada una de las gotas, se depositaron 0.03 ml de antígeno e inmediatamente se mezclaron con un palillo diferente, extendiendo la muestra en un área de 2 cm de diámetro, las diluciones se empezaron de la más alta a la más baja. Las equivalencias se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Equivalencias de las diluciones para la Prueba de Rivanol.

Volumen de suero bovino	Dilución
0.08	1:25
0.04	1:50
0.02	1:100
0.01	1:200

Se completó la homogenización de las muestras por la rotación de la placa inclinándola suavemente de un lado a otro unas cuatro veces y se dejó reposar por 6 minutos, se volvió a rotar la placa y nuevamente se dejó reposar durante 6 minutos. De acuerdo a la NOM contra la brucelosis, la interpretación de la prueba de Rivanol se realizó de la siguiente manera:

Positivo. Cuando existió aglutinación y los grumos estuvieron separados por un líquido claro.

Negativo. No hay aglutinación.

Fueron positivos los sueros de animales no vacunados que presenten aglutinación en cualquier dilución desde 1:25 a 1:200.

En ganado vacunado, la dilución 1:50 se consideró como positivo.

De la misma manera se llevó a cabo la concordancia entre las técnicas de ELISA indirecta y de aglutinación microscópica, en el caso de *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Para realizar la concordancia entre estas técnicas se utilizaron 41 muestras de suero bajo el mismo criterio que en el caso de la brucelosis. Cabe señalar que las muestras fueron probadas contra 12 serovariedades distintas de *Leptospira* (*L. hardjo*, *L. canicola*, *L. pyrogenes*, *L. hebdomatis*, *L. grippityphosa*, *L. icterohemorrhagiae*, *L. canicola* Portland Vere, *L. pomona*, *L. wolffi*, H89 “*L. hardjo* aislamiento nacional”, *L. tarassovi* y *L. icterohemorrhagiae* aislamiento Palo Alto).

6.14 Prueba de aglutinación microscópica

Se depositaron 0.1 ml de suero en un tubo de ensayo; se agregaron 2.4 ml de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) y se mezclaron para obtener una dilución de 1:25. A las microplacas, se les adicionó 50 µl de SAF al segundo y tercer pozo. Posteriormente, al segundo pozo se le agregó la dilución 1:25, obteniéndose una dilución 1:50. Los 50 µl obtenidos de la dilución 1:50 se mezclaron con los 50 µl de SAF del tercer pozo obteniéndose una dilución 1:100. Posteriormente, se agregaron 50 µl de cada antígeno, lo que finalmente dio un total de 100 µl por pozo y diluciones finales de 1:50, 1:100 y 1:200.

Se incluyó un control negativo con SAF y antígeno de los 12 diferentes serovares de *Leptospira*, uno por pozo; después, se dejó incubar por 60 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente para luego proceder a la lectura utilizando un microscopio con un condensador de

campo oscuro y un objetivo de 10X. Con la finalidad de llevar a cabo la interpretación de esta prueba se tomó en cuenta la siguiente Tabla:

Tabla 2. Grado de aglutinación en cruces y su equivalencia en porcentajes con la desaparición de células libres cuando se realiza la observación microscópica, en la prueba de aglutinación microscópica ¹⁹.

AGLUTINACION	CELULAS LIBRES
(---) 0%	100%
(1+) 25%	75%
(2+) 50%	50%
(3+) 75%	25%
(4+) 100%	0%

La muestra se consideró positiva cuando un título de 1:100 o mayor y el título final de anticuerpos correspondió a la dilución más elevada en la que se encontró el 50% de células.

6.15 Prueba de Kappa

La prueba utilizada para establecer la concordancia entre las diferentes técnicas fue la de el valor de Kappa, que se generó de la fórmula:

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde Po: Proporción de concordancia observada.
Pe: Proporción de concordancia esperada.

Criterio de interpretación: k < 0.5 Baja
k ≥ 0.5 - < 0.7 Moderada
k ≥ 0.7 Buena a Excelente ⁷⁰

6.16 Evaluación de la respuesta serológica provista por la vacunación antirrábica

Para llevar a cabo la evaluación de la respuesta serológica contra la rabia en el ganado muestreado en los tres años, se incluyeron tanto aquellos

animales que habían sido vacunados contra derriengue, así como becerros que aún no habían sido inmunizados, con la finalidad de identificar anticuerpos de origen calostrado en los mismos. El punto de corte para definir a los animales con un “adecuado nivel de inmunidad” (animal protegido), se tomó a partir de los bovinos que obtuvieron un valor de porcentaje de ELISA igual o mayor a 80, por lo tanto aquellos animales que tuvieron un porcentaje de ELISA menor se consideraron como “no protegidos”, esto tomado en cuenta las consideraciones del Comité de expertos de la rabia de la OMS que refieren la actividad viricida inespecífica y natural del suero de animales no vacunados contra la rabia; dichos sueros al ser analizados frente a un suero de referencia, se observó que siempre alcanzaron títulos menores a 0.5 UI/ml, por lo cual se declaró que un título igual o mayor a 0.5 UI/ml indica “seroconversión”. Es imposible asegurar que un título determinado indique protección, pues ésta dependerá de la cepa y cantidad del virus inoculada, de la cercanía al sistema nervioso central, así como del estado fisiológico de la víctima en el momento de la agresión.

Con la finalidad de establecer una equivalencia real entre los resultados obtenidos por la técnica de ELISA y el título de anticuerpos del suero, se realizó en un laboratorio particular la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes en cultivo de tejidos de riñón de hámster (BHK) a uno de los sueros utilizados en este estudio con la finalidad de establecerlo como suero de referencia y así contar con las unidades equivalentes (UE/ml) de cada una de las muestras procesadas por ELISA indirecta.

Del mismo modo, en el análisis que se realizó por explotación muestreada, se valoró como una “buena inmunidad de hato” a aquellos ranchos donde al menos el 65% de los animales muestreados tuvieron un porcentaje de

ELISA \geq 80, tomando en cuenta que la difusibilidad del agente es prácticamente nula. Se llevó a cabo el análisis de la respuesta a la vacuna tomando en consideración también la edad, el sexo y la presencia o ausencia de la gestación de los animales inmunizados contra la rabia.

6.17 Seguimiento prospectivo longitudinal en 35 animales seleccionados.

Con la finalidad de estudiar de una mejor manera la dinámica de la respuesta serológica contra los cuatro agentes zoonóticos, así como la respuesta a la vacunación antirrábica en los mismos animales muestreados a través del tiempo, se seleccionaron muestras de suero de 35 animales existentes al principio del estudio en 1996 y que se encontraban vivos en las explotaciones en el año de 1999. Se determinaron las seroprevalencias aparentes y frecuencia de animales protegidos en cada uno de los tres años y se hicieron las comparaciones así como el análisis estadístico con la prueba de Ji cuadrada entre los resultados de los tres años, tomando en cuenta la edad y el sexo de los animales, así como el estado de gestación, analizando además las variaciones en la respuesta serológica contra estos agentes a través del tiempo.

8. DISCUSIÓN

8.1 Determinación del tamaño mínimo de la muestra

El tamaño mínimo de muestra calculado para este estudio se obtuvo a partir de una seroprevalencia estimada previamente en la región. En este caso, con el objeto de diseñar una muestra representativa para los cinco agentes se tomó la seroprevalencia estatal de *B. abortus* que es del 8% ¹¹ esta es la más baja reportada de entre estas cuatro zoonosis puesto que en el caso de *Leptospira*, este agente ha sido reportado con una seroprevalencia de entre 12 y 14% en ganado bovino del Estado ⁷³ y en los casos de *M. bovis* y *B. burgdorferi* no se ha reportado la seroprevalencia en la región ni en el Estado. Es importante recalcar que el sentido de este estudio no es diagnóstico sino epidemiológico en el que el análisis de las variaciones de las diferentes tasas de seroprevalencia obtenidas a través de la serología permitió sugerir el comportamiento de estos agentes durante tres diferentes años a través de la seroprevalencia general aparente y la seroprevalencia por estrato de edad, sexo y gestación de la población muestreada.

8.2 La técnica de ELISA indirecta

La técnica inmunoenzimática de ELISA utilizada en este estudio es similar a la descrita por varios autores como Behymer y colaboradores, ⁹¹ y Barajas-Rojas y colaboradores ^{42,43,44,45,46}.

Para llevar a cabo la técnica serológica, los sueros obtenidos durante los diferentes muestreos fueron diluidos 1:40 para ser probados contra cada uno de los cinco antígenos. Se utilizó la misma dilución con el objeto de analizar dichos sueros bajo un mismo criterio de concentración de anticuerpos. La justificación de una dilución 1:40, se avala para estudios epidemiológicos de tamizaje para conocer perfiles, variaciones y

tendencias, ya publicados nacional e internacionalmente. Esta dilución se determinó debido a que se ha encontrado una concentración adecuada de IgG al estandarizar la técnica inmunoenzimática, además de evitarse los efectos inmunológicos conocidos como “prozona y postzona” al realizar un ensayo inmunológico como ELISA ^{42,43,44,90,91}. Otra ventaja de analizar diferentes antígenos con una dilución estándar de suero es la eficiencia de la prueba misma, es decir, el mayor número de muestras posibles, a menor costo y tiempo, puesto que el hecho de utilizar una dilución diferente de suero para cada antígeno requiere de mayor tiempo, material y por tanto costo, además de dificultar la comparación de los resultados en función de la interpretación epidemiológica que se pueda obtener de los mismos, puesto que cuando las muestras son probadas a una dilución única, la técnica de ELISA indirecta provee de una medida “semicuantitativa” de la actividad de anticuerpos ya que la dilución única permite estimar un título a través de curvas estándar al asumir el paralelismo que existe en una relación dosis / respuesta (a mayor cantidad de anticuerpos, se asume una mayor actividad de los mismos) ⁹⁰.

8.3 Cálculo de la seroprevalencia real y valores predictivos de la técnica de ELISA

Es importante mencionar que la sensibilidad y la especificidad de la técnica de ELISA que se utilizó en este estudio no se determinó, debido a que no se conoce el “estándar dorado” representado por el aislamiento del agente, o pruebas de referencia suficientemente rigurosas, avaladas por un diseño del tamaño de muestra necesario para considerarse un estándar como tal para validar una prueba diagnóstica. Sin embargo, se debe recordar también que estos parámetros son utilizados principalmente de manera demostrativa y que representan un factor crucial en estudios con un objetivo diagnóstico más que de escrutinio, que es el objetivo real de

este estudio, además de tomar en cuenta que el aislamiento es generalmente costoso y dada la variabilidad de la respuesta de los animales muestreados tendría que hacerse en particular para el estudio de cada agente y con la población específica en la que se realiza dicha investigación. Sin embargo, los sueros testigos positivos y negativos utilizados fueron los mismos evaluados con pruebas comparativas entre la Universidad de California Davis y el laboratorio de referencia en Ames, Iowa USDA.

Como patrón de referencia, se utilizó un suero testigo fuertemente positivo así como un débil positivo de comportamiento conocido, procedentes del Estado de Chiapas con la finalidad de conferir primeramente confiabilidad a la técnica de ELISA, así como para establecer una escala confiable de 0 a 100% en la cuál el valor máximo correspondiese al presentado por el suero testigo fuertemente positivo y en donde el suero débil positivo y los testigos negativos ocuparan los porcentajes correspondientes en dicha escala, por tanto los valores de absorbancia conferidos por los sueros de la población muestreada, fueron convertidos a un porcentaje de ELISA en una escala de 0 a 100% establecida por los sueros testigos positivos. Esta forma de presentar los resultados de la técnica de ELISA indirecta facilitó la comprensión y comparación de los mismos al expresar los resultados en una escala continua de 0 a 100%, además de que esta requirió de una dilución única del suero para llevarse a cabo. Esta es una ventaja en estudios epidemiológicos, tomando en cuenta que existen problemas de interpretación de los resultados obtenidos (uso únicamente de valores de absorbancia, ausencia de sueros testigos confiables, punto de corte sobre o sub-estimado, etc); así como de la validación internacional de este tipo de técnicas ya que de los métodos empleados en la expresión de la actividad de los anticuerpos, ningún criterio se ha adoptado

universalmente para este tipo de técnicas ^{82,88,89,90}. Otra manera de expresar la actividad de anticuerpos de manera totalmente cuantitativa, puede ser a través del establecimiento de un logaritmo con el fin de convertir los resultados obtenidos en porcentaje de ELISA a unidades que sean directamente proporcionales a la actividad de los anticuerpos.

Con relación al criterio de selección del punto de corte utilizado en la prueba de ELISA, es importante mencionar que este se define como el nivel de actividad de anticuerpos el cual determina el estado de positividad o negatividad de un individuo dado y que la selección del mismo en una prueba serológica depende de la intención y orientación de la prueba ⁹⁰. En el presente estudio, este se eligió tomando como base estudios previos realizados en el trópico de México en ganado bovino de doble propósito; este a su vez, fue considerado para cada uno de los agentes puesto que así se estandarizaron los valores obtenidos con la finalidad de evaluar a cada agente y así poder llevar a cabo comparaciones entre ellos en una población dada. De igual manera, los resultados obtenidos en función de las características de la población como sexo, estrato de edad y presencia de gestación en las hembras en edad reproductiva es posible y permite un mayor análisis de los resultados. Así, se pudo aplicar la técnica de ELISA para el análisis epidemiológico en la población muestreada ^{42,43}. Sin embargo, considerando que el punto de corte en la prueba de ELISA ha sido utilizado bajo un criterio de escrutinio o tamiz, en aquellos casos en los que la seroprevalencia obtenida presentó valores muy altos, existe la posibilidad de que pudiera haber una cierta influencia en estos valores de prevalencia por animales falsos positivos; por esto, se considera conveniente reafirmar estos resultados a través de técnicas de diagnóstico, principalmente a través del cultivo y aislamiento del agente, tomando en cuenta los resultados arrojados por la prueba de escrutinio, ya que la

función de estas es precisamente orientar los esfuerzos de diagnóstico sobre aquellos grupos en los que se presenta una mayor probabilidad de encontrar individuos realmente infectados. Esto reduciría en gran parte el costo de un estudio, lo cual representa una de las principales limitantes dentro de los programas de salud animal para los productores de las explotaciones pecuarias. Además, permite entonces llevar a cabo acciones encaminadas de vigilancia, control y erradicación de acuerdo a la situación particular de cada agente y población afectada.

El éxito de la prueba de ELISA depende de factores como la calidad del antígeno, la calidad del conjugado y la calidad de los sueros testigos, aunados a una interpretación correcta de los resultados, además de su evaluación epidemiológica. Como medidas de control de calidad tendientes a garantizar que los resultados obtenidos son confiables, precisos, comparables y reproducibles, se puede citar que la preparación y mantenimiento de los antígenos y demás reactivos utilizados en la técnica de ELISA, se realizó de acuerdo a las recomendaciones internacionales **82,88,89,90**; de esta manera, los sueros testigos así como los sueros a probarse fueron resguardados en recipientes plásticos especiales y mantenidos en un congelador Revco a -70° C hasta el momento de su utilización en el laboratorio.

Los antígenos utilizados en la prueba de ELISA fueron generalmente preparaciones crudas; es decir, se utilizó el antígeno celular completo de tres de los cinco agentes con el objeto de llevar a cabo el estudio seroepidemiológico, puesto que con este tipo de antígeno, un suero puede ser monitoreado para detectar anticuerpos contra agentes de enfermedad dentro del nivel de género, abarcando las especies existentes dentro de este, no obstante que la aparición de reacciones cruzadas pueden interferir

con la confiabilidad de los resultados. Como ejemplo se puede citar el caso de la *Leptospira*, en la que se conoce que existen reacciones cruzadas entre diferentes serovares y aunque se sabe que este tipo de reacciones son mucho más frecuentes en humanos, también se presentan en los animales. ⁹⁹

En este estudio en los casos de los antígenos *B. abortus*, *B. burgdorferi* y *L. hardjo* se utilizó el antígeno celular completo para la técnica de ELISA indirecta; mientras que en el caso de *M. bovis* se utilizó un derivado proteínico purificado considerando que la respuesta inmunitaria que confiere dicho agente de manera primaria es la respuesta celular; por tanto, es necesario utilizar un antígeno adecuado que confiriera un mayor grado de especificidad a la prueba inmunoenzimática.

8.4 Concordancia de la técnica de ELISA indirecta con otras pruebas

La técnica de ELISA ha sido reconocida como una técnica altamente sensible y específica de gran utilidad en el diagnóstico y escrutinio de las enfermedades infecciosas ^{82,88,89,90}. A diferencia de otros estudios realizados en nuestro país, por ejemplo en el caso de *L. hardjo*, en donde los resultados obtenidos por la técnica de ELISA en comparación con los obtenidos por la prueba de aglutinación microscópica concuerdan en un 92% en un estudio realizado en ganado bovino del trópico de México ^{42,69}, la concordancia resultante entre la técnica de ELISA indirecta con la prueba de tarjeta, rivanol y aglutinación microscópica respectivamente fue baja. Esto puede explicarse tomando en cuenta el número de muestras utilizado para dicho análisis que fue de 30 para las pruebas de tarjeta y rivanol y de 42 para la concordancia con la prueba de aglutinación microscópica, además de no olvidar que esta prueba inmunoenzimática es mucho más sensible inmunológicamente hablando, ya que requiere de una

cantidad de anticuerpos significativamente menor para interpretar un resultado positivo a través de un lector de densidad óptica que en el caso de una prueba que necesariamente debe interpretarse a un nivel macroscópico como lo es una aglutinación y que requiere de experiencia para su correcta interpretación. Otra posibilidad que no debe dejar de mencionarse, es que la técnica de ELISA no haya podido identificar adecuadamente las muestras positivas y negativas debido al tipo de antígenos utilizados, aumentando así, el número de falsos positivos, principalmente.

8.5 Seroprevalencia general

Este estudio seroepidemiológico ha mostrado evidencia de exposición de estos animales a los antígenos de los agentes zoonóticos investigados.

Al momento de la realización de los muestreos durante los tres diferentes años no se presentaron casos clínicos que manifestaran estas enfermedades, por lo cual se asume que se muestrearon animales clínicamente sanos tratando de ponerse de manifiesto el carácter subclínico de estas zoonosis en la población, ya que a pesar de que los productores no notificaron casos de tuberculosis y brucelosis en sus animales y de que algunos de ellos poseen hatos libres; otros no están inscritos en la campaña de erradicación. Además, si han existido casos de rabia paralítica y varios problemas reproductivos como abortos, infertilidad y nacimiento de becerros débiles. Cabe señalar que en algunos ranchos muestreados se pudo observar la explotación de otras especies en conjunción con el ganado bovino tal como el ganado ovino principalmente así como equino, inclusive en algunas de las explotaciones, la presencia de perros que conviven libremente con el ganado pudiera llegar a ser un factor importante en la transmisión de agentes infecciosos; además, es conocido que la región tropical de nuestro país es endémica a la

infestación por garrapatas y a pesar de que el género *Boophilus* es el más importante, resultará recomendable en el futuro llevar a cabo más estudios sobre la borreliosis en México, ya que este trabajo ha mostrado evidencia de seropositividad en el ganado estudiado durante dos de los tres años en que se realizó el mismo, a pesar de que *Ixodes ricinus* no se encuentra en México, otras especies de Borrelias transmitidas por *Boophilus* si pudiesen existir, por lo cual es necesario concretar estas hipótesis a través de muestreos en humanos, equinos y perros de la región, con técnicas de escrutinio más específicas y con el uso de pruebas diagnósticas confirmatorias como Western blot.

Las implicaciones en la salud pública que tiene la presencia de estos agentes en la población bovina de la región revisten una serie de riesgos que resultan importantes de definir y analizar en estudios posteriores debido a que una buena parte de la población labora en este tipo de explotaciones por lo cuál tiene un contacto estrecho con estos animales, ya sea a través de la crianza y explotación en los diferentes ranchos de la región así como en los procesos de sacrificio y consumo de los productos y subproductos del ganado bovino. De ahí que la presentación de casos se vea reflejada en las estadísticas de los servicios de salud locales y estatales, sin tomar en cuenta todos aquellos casos que no se notifican o no se diagnostican.

Los resultados de seroprevalencia general mostraron que el mayor porcentaje de seroprevalencia encontrado fue en el caso de *L. hardjo* en el año de 1996; este resultado concuerda con estudios realizados en el Estado de Chiapas anteriormente, ⁶⁴ además con otros obtenidos en ganado bovino de doble propósito en el trópico mexicano ⁴². Los resultados de seroprevalencia general de este agente obtenidos durante 1998

muestran una disminución en la misma (17%); esto puede deberse a que a pesar de que la presentación de la leptospirosis es mayor en la estación lluviosa, lo cuál sugiere una estacionalidad (época de lluvias), la producción de anticuerpos identificables se presenta hasta después de uno a dos meses después de la infección. Tomando en cuenta que en 1996 los animales se muestrearon algunos meses después de la época de lluvias, a diferencia de 1998, en donde los animales fueron muestreados en plena estación lluviosa, este factor pudo haber influido en los resultados; esto aunado probablemente a cambios ambientales importantes en la región en los últimos años y a diferencias en el manejo de los animales en el manejo de los animales que los productores realizan, por ejemplo, la alimentación y el mejor manejo de potreros que se traducen en un mejor estado de salud de los animales. Las regiones tropicales son áreas endémicas de leptospirosis y las tasas más altas de casos corresponden a las zonas donde las precipitaciones son más abundantes y el mayor número de casos se presenta durante la estación de lluvias ¹⁰⁰. Es importante señalar que la región ha padecido durante los últimos tres años serios problemas por inundaciones y aunque no existen estudios que demuestren cambios en la frecuencia de la leptospirosis, dadas las dificultades respecto al diagnóstico, se han reportado la presencia de brotes epidémicos en humanos debido a cambios ambientales, tales como las mismas inundaciones, que ocasionan la migración de roedores. Un ejemplo lo constituyen las epidemias ocurridas en la ciudad de Recife, Pernambuco, Brasil en 1966 y 1970, con 181 y 102 casos respectivamente, además de los mencionados en Centroamérica y Estados Unidos recientemente ⁹⁹.

El papel de los animales silvestres y domésticos es esencial para el mantenimiento de las leptospiras patógenas en la naturaleza. La transmisión de la infección al hombre, se lleva a cabo generalmente de

manera accidental, la densidad de la población de los huéspedes y las condiciones del medio constituyen un factor importante. Las leptospiras requieren de un alto grado de humedad ambiental, un pH neutro o alcalino y temperaturas adecuadas; terrenos bajos, anegadizos, receptáculos naturales o artificiales de agua dulce (arroyos, embalses y otros) ^{73,99,100}, son las condiciones que caracterizan a la región Frailesca, lo que representa un ambiente ideal para el establecimiento de enfermedades como la leptospirosis, haciéndolas difíciles de controlar y erradicar. El pastoreo de los animales se realiza principalmente de manera rotatoria; sin embargo, el acceso de los animales al agua para beber es directo al afluente natural o en anegaciones formadas por las irregularidades del terreno; además, la rotación de potreros puede facilitar la transmisión del agente puesto que los animales infectados eliminan las leptospiras a través de la orina y estas a su vez contaminan el forraje y agua con los que otros animales tienen posterior contacto. En el caso de la transmisión al humano, esta se realiza a través de aguas, suelo y alimentos contaminados por orina de animales infectados. Bryan ¹⁰¹, menciona la posibilidad de la transmisión por el consumo de leche, carne y probablemente riñones contaminados o procedentes de animales infectados. Tomando en cuenta que las encuestas serológicas en poblaciones humanas indican que un gran número de infecciones son asintomáticas, aunado al bajo índice de sospecha de esta enfermedad, junto con la diversidad e inespecificidad de su presentación, se explica el alto número de casos que pasan desapercibidos ¹⁰². Por ello, la importancia de este tipo de estudios que ofrezcan un panorama acerca de la dinámica de estos agentes a través del tiempo y que permitan sugerir factores de riesgo. Thierman ¹⁰³, refiere que la leptospirosis es un padecimiento común y económicamente importante en la ganadería del mundo. En algunos trastornos como el aborto y la agalactia, mastitis,

anemia hemolítica y dermatitis necrótica entre otras, se han asociado con la presencia de *L. hardjo*. La leptospirosis es un padecimiento en donde la prevalencia es difícil de estimar y aunque usualmente se ha estimado una seroprevalencia cercana al 8%, prevalencias mayores han sido reportadas que aunque parecieran sobrestimadas, existen animales que retienen títulos de anticuerpos verificables por varios años, así como evidencias de infecciones activas que ocurren en la ausencia de títulos de anticuerpos que puedan ser detectados por técnicas como la aglutinación ¹⁰³. La técnica estándar de referencia para la detección de anticuerpos específicos contra la leptospira es la prueba de aglutinación microscópica; sin embargo, esta tiene algunas desventajas: por ejemplo, se utilizan leptospiras activas como antígeno en la prueba, lo cual ocasiona problemas en la estandarización del mismo y representa un riesgo para el personal; además, su tiempo de elaboración es prolongado y se cree que no provee un indicador en los casos de infecciones recientes. La prueba inmunoenzimática de ELISA es una técnica que ha sido utilizada en el diagnóstico de varias enfermedades, es altamente sensible, fácil de montar y estandarizar y es capaz de medir niveles de anticuerpos IgG o IgM en el suero, con el uso del conjugado apropiado, ya sea anti-IgG o anti-IgM. Sin embargo, Cho ⁹⁸ refiere que existe una mayor reactividad cruzada entre serovares heterólogos con el uso de la técnica de ELISA. También se ha considerado a esta prueba técnicamente más ventajosa que la aglutinación microscópica y de gran aplicación como prueba de escrutinio para encontrar anticuerpos contra leptospiras a partir de suero en ganado bovino ⁹⁸.

El control de la leptospirosis a través de la vacunación de los animales se realizó solamente en alrededor del 30% de las explotaciones en las que se llevo a cabo este estudio. En estos hatos, las vacunas utilizadas fueron

vacunas polivalentes contra diarrea viral bovina, parainfluenza 3, virus herpes bovino tipo 1 (IBR), *Haemophilus somnus* y los serovares de *Leptospira pomona*, *L. canicola*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippotyphosa*. Los productores de la región comentaron que estas no han provocado cambios aparentes en la salud de sus animales, además del costo que representan, debido a la frecuencia semestral con que se aplican y a que en varias ocasiones son obtenidas a través de la importación, lo que puede conferir una protección deficiente por vacunar con serovares distintos a los prevalentes y confundir la interpretación de las pruebas serológicas debido a la reactividad cruzada entre serovares. De hecho en este estudio se observó que un número extremadamente reducido de animales vacunados contra leptospirosis fueron positivos a *L. hardjo* probablemente porque las bacterinas no indujeron inmunidad o quizá la técnica de ELISA no detectó dichos anticuerpos. Es por ello que se ha recomendado que las bacterinas formuladas por un país no deben ser usadas en otras regiones donde no se conocen las serovares locales ¹⁰⁴.

Los resultados de seroprevalencia general aparente obtenidos a través de la técnica de ELISA en el caso de *B. burgdorferi*, confieren evidencia serológica del contacto con esta espiroqueta; lo cual deja abierta la posibilidad de nuevos estudios en el Estado. Es importante recordar que existen otras variedades de borrelias que infectan a los bovinos a través de garrapatas del género *Boophilus* principalmente y son menos patógenas, además de no infectar al hombre y que son capaces de provocar reacciones cruzadas en técnicas como la ELISA, ejemplos de estas son *B. coriaceae*, *B. theileri*, *B. garianni* y *B. afzelii* ^{27,28,29,33}.

Las seroprevalencias contra *B. burgdorferi* obtenidas por este estudio durante los muestreos realizados en 1996 y 1998 (12.5% y 15.6%

respectivamente) son similares, lo cual sugiere que el agente puede estarse manteniendo activo y relativamente estable en la población bovina de la región o que este induce una inmunidad duradera en los bovinos. Escasos son los estudios que se han realizado en México sobre este agente zoonótico, Carrillo ³⁶ y Esquivel ³⁷, citan la seropositividad contra este agente en ganado ovino del altiplano y trópico húmedo de México, con muy baja seroprevalencia en ambas regiones, lo cual sugiere que la espiroqueta es capaz de transmitirse tanto en climas fríos como en el trópico; sin embargo, mencionan que la presencia de este agente pudiese asociarse con animales importados y usados como pie de cría donde estos pudieran ser portadores o presentar una respuesta inmune recidivante contra el agente ^{36,37}. Tomando en cuenta que en algunas de las explotaciones se lleva a cabo también la crianza de ganado ovino, además de la presencia de equinos y perros, aunado a la presencia de infestaciones por garrapatas de diferentes géneros, la infección de los animales por este agente no debe ser descartada, y se deben realizar estudios que logren confirmar su existencia; en consecuencia, se debe buscar el agente a través del aislamiento o pruebas complementarias como la inmunohistoquímica y el Western blot. Cabe señalar que la técnica de ELISA con un antígeno celular completo y con antígenos recombinantes, se ha utilizado en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme en el ser humano con grandes beneficios, debido a que las manifestaciones clínicas de este padecimiento se confunden con otros síndromes, por lo que las pruebas serológicas representan un instrumento que colabora en gran medida con la identificación de este agente ³⁰. Gerber y Shapiro ³² reportaron acerca de la prueba de ELISA utilizando un antígeno celular completo, una sensibilidad del 28% y una especificidad del 100%, y utilizando como antígeno una proteína de superficie, reportaron una sensibilidad del 46% y una especificidad del 98%; de manera diferente a Miyamoto y

colaboradores ^{31,33} que reportaron una sensibilidad del 85% y una especificidad del 96%, por lo cual se define a la prueba de ELISA como una técnica conveniente, de lectura automatizada y sencilla de estandarizar, útil en el diagnóstico epidemiológico de la enfermedad de Lyme.

Los resultados arrojados por la técnica de ELISA en el caso de *M. bovis* indican que la seroprevalencia general de este agente mostró una disminución aproximada al 2% en el año de 1998. Estos resultados sugieren de cualquier manera una larga exposición de los animales al agente ya que la diferencia entre los dos años no fue estadísticamente significativa. El diagnóstico de *M. bovis* por medio de técnicas serológicas en estadios tempranos de infección en los animales puede dificultarse, esto se debe a que no es fácil la detección de anticuerpos, ya que el agente causante de la tuberculosis bovina induce de manera primaria una respuesta inmunomediada por células. El diagnóstico de la tuberculosis bovina se ha realizado desde el año de 1917 en los Estados Unidos con el uso de la prueba de tuberculina ^{52,54,56}. Sin embargo, existen problemas inherentes a esta prueba. Hay reportes en los que aproximadamente el 15% de los animales tuberculinizados presentan resultados falsos negativos y de un 2 a un 5% presentan resultados falsos positivos atribuidos generalmente a reacciones antigénicas cruzadas con otras micobacteriosis ⁶⁰. Pruebas serológicas como la inmunodifusión en gel agar y la técnica de ELISA han demostrado tener alta sensibilidad y especificidad para detectar infecciones crónicas y confirmar el diagnóstico en casos clínicamente detectables ^{58,59}. El método rotacional intensivo de pastoreo pudiese influir en la transmisión del agente a pesar de la parcial susceptibilidad de este al ambiente ya que aunque se ha reportado que *M. bovis* permanece viable entre 2 y 8 horas ante la exposición de la luz solar, se ha reportado también que en la oscuridad este agente puede

permanecer viable por varias semanas, contaminando los pastos y el agua de bebida ⁹⁹. Otra forma de transmisión que pudiera ser importante es a través de la entrada de nuevos animales al hato, ya que a pesar de las medidas cuarentenarias que se toman, la tuberculosis es una enfermedad altamente infecciosa y de baja patogenicidad, cualidad que confiere un carácter crónico, así como la característica de presentarse de manera subclínica en los animales, y pueden desempeñar un importante papel en la diseminación del agente ⁵⁶.

Garborick ⁶⁰, menciona que la utilización de las técnicas serológicas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina es insuficiente, si estas se utilizan de manera única; sin embargo cuando los resultados de las técnicas de ELISA y de la prueba de tuberculina son interpretados en serie, la especificidad se incrementa de manera importante. De la misma manera, si los resultados de ambas pruebas son interpretadas en paralelo, la sensibilidad de esta combinación es significativamente mayor que la sensibilidad que presentan las dos diferentes técnicas de manera individual.

Los valores “crudos de densidad óptica” de los sueros probados contra muestran el comportamiento de la población muestreada y se puede observar que efectivamente es posible distinguir dos poblaciones en una gráfica (positivos y negativos). Con estos resultados se puede concluir que en el ejercicio del escrutinio la técnica de ELISA puede representar una valiosa herramienta para la detección de anticuerpos contra *M. bovis*.

En el caso de *B. abortus*, la seroprevalencia general aparente fue de alrededor del 9% en los años 1996 y 1998; este resultado es muy similar a los encontrados por Mejía, García y Díaz ¹¹, en su estudio realizado en la región norte del estado de Chiapas, donde encontraron un 8% de animales

seropositivos. Por otro lado Guiris ⁷³, reporta en su estudio sobre la brucelosis en hembras con problemas reproductivos del municipio de Villaflores, Chiapas; que estos animales fueron seronegativos con el uso de la prueba de Rosa de Bengala. La presencia de animales seropositivos en las diferentes explotaciones de la región, representan un factor de riesgo debido a que la transmisión del agente y por lo tanto, los esfuerzos dedicados al control y la erradicación de la brucelosis se ven limitados. De acuerdo a la información obtenida a través del cuestionario aplicado y tomando en cuenta las características de las explotaciones así como los resultados de la serología, se puede inferir que la transmisión semental - vaca continúa siendo importante ya que la práctica de la inseminación artificial no se lleva a cabo en todas las explotaciones e incluso, la monta directa es utilizada como recurso en aquellos casos de vacas repetidoras a la inseminación artificial; también se ha reportado la transmisión madre - feto y a través de los pastos, el agua, placentas y otros tejidos infectados. También es importante destacar que la práctica del ordeño en la gran mayoría de las explotaciones muestreadas se lleva a cabo de manera manual, así como otros manejos realizados a los animales, como la palpación y procesos quirúrgicos menores, sin las medidas sanitarias y de seguridad suficientes por personal que labora en las explotaciones; estas prácticas representa un factor de riesgo para quienes tienen un contacto estrecho con animales posiblemente infectados y fomites contaminados, así como con la elaboración y consumo de productos lácteos en los que la ebullición y/o pasteurización de la leche no se lleva a cabo, siendo un riesgo de diseminación del agente con la subsecuente presentación de casos humanos de brucelosis, que en el estado de Chiapas han sido 77 casos durante los últimos dos años ⁷⁵.

La técnica de ELISA utilizada en este estudio se llevó a cabo con un antígeno celular completo, a pesar de que algunos trabajos ¹⁰⁵ señalan que el antígeno proteínico de extracción salina es el más recomendado en técnicas serológicas como la inmunodifusión doble en agar y la ELISA para el diagnóstico de la brucelosis en el ganado. Sin embargo, debido a la disponibilidad del antígeno celular completo en el laboratorio de seroepidemiología y a que con este mismo se han llevado a cabo estudios seroepidemiológicos previos en ganado bovino tanto del trópico como del altiplano de México, la confiabilidad de la prueba de ELISA realizada es suficiente para estudios seroepidemiológicos ^{42,44,45,67,68}; es importante llevar a cabo estudios complementarios que permitan desechar la posibilidad de reacciones cruzadas con otros agentes como *Yersinia enterocolitica*, reacción que se ha reportado en ganado bovino ²⁰ y con otras pruebas confirmatorias como la de rivanol y fijación de complemento, basados en los resultados conferidos por la técnica de ELISA indirecta en la población muestreada ^{16,17,18}.

En el año de 1994, la técnica de ELISA indirecta fue validada internacionalmente y aceptada por la OIE como prueba en la detección de anticuerpos contra *B. abortus* en bovinos ⁸⁹. Uzal ¹⁷, menciona en un estudio realizado con la técnica de ELISA, utilizando como antígeno un lipopolisacárido liso en bovinos de Argentina, un 99.6% de especificidad y un 99.5% de sensibilidad en la detección de anticuerpos IgG₁ de bovino, lo que permite clasificar a esta técnica como muy útil en el diagnóstico de la brucelosis bovina, particularmente en regiones donde existe poca información epidemiológica acerca de este padecimiento y donde se requiere llevar a cabo el monitoreo de un gran número de muestras de suero con la finalidad de obtener información epidemiológica de este padecimiento en una población de interés ^{17,18}.

8.6 Seroprevalencia por sexo

En el caso de las seroprevalencias obtenidas en los dos muestreos, las hembras presentaron los mayores valores, a excepción del caso de *B. abortus* durante 1998 en donde los machos obtuvieron una mayor seroprevalencia con un 13.8% de animales seropositivos, es importante mencionar que la edad así como el manejo de los animales de acuerdo a su sexo pueden representar factores de confusión en los resultados obtenidos.

Hembras

B. burgdorferi obtuvo en el muestreo realizado durante el año de 1996 una seroprevalencia de 13.6% y en 1998 de 16.2%, lo cuál demuestra valores de prevalencia relativamente similares durante estos dos años que sugieren primeramente la existencia del agente en la población y en segundo lugar que este se ha mantenido estable en la misma.

La seroprevalencia de *L. hardjo* mostró una diferencia significativa entre las hembras muestreadas durante 1996 con una seroprevalencia de 32.7% y la población de hembras muestreadas en 1998 que presento un 17.3% de seropositivos; esta diferencia puede atribuirse a una tendencia estacional del agente, además de las prácticas de manejo instauradas por los productores con la finalidad de dar resguardo a los animales tras las contingencias ambientales propias de la región que se han vivido en los años recientes. Es importante señalar que los valores de seroprevalencia encontrados, concuerdan con estudios realizados en ganado bovino de la región, en los cuales se ha sugerido la presencia de problemas reproductivos en el ganado con la presencia de *Leptospira interrogans* de diversos serovares. ⁷³ Higgins y colaboradores ¹⁰⁶ mencionan que *L. hardjo* ocasiona aborto, mastitis y agalactia en el ganado por esto, se deben encaminar más estudios acerca de la participación y repercusiones de la

leptospirosis en la salud animal y en la salud pública, así como de las pérdidas económicas.

B. abortus en las hembras es otro agente en el que se encontró una seroprevalencia constante durante 1996 y 1998; esto puede atribuirse en parte a las acciones llevadas a cabo por el programa de control y erradicación de la brucelosis; por otro lado, las prácticas de manejo reproductivo adoptadas por algunos productores de la región, han logrado que la brucelosis no se haya incrementado; sin olvidar que la vacunación de estos animales puede estar interfiriendo con estos resultados. Es importante mencionar que una seroprevalencia del 9% en las hembras continúa representando un factor de diseminación así como un factor de riesgo para la población que consume la producción láctea y sus subproductos ¹⁰¹.

En el caso de *M. bovis* las seroprevalencias encontradas durante 1996 y 1998 pueden considerarse como bajas y similares, esta situación puede ser debida principalmente a las características patogénicas del agente, el cuál por su capacidad de evadir los mecanismos de fagocitosis del huésped puede ser encapsulado y posteriormente favorecer la formación de granulomas. Dichas propiedades no permiten que haya una formación suficiente en cantidad y cualidad de anticuerpos además de sumar la característica de cronicidad al padecimiento. ¹⁰⁷.

Machos

En el caso de *B. burgdorferi* se obtuvieron porcentajes de seroprevalencia durante 1996 de 5.9% y en 1998 de 10.3%; estos valores reflejan además de la presencia del agente, una cierta disposición a permanecer estable en la población, a pesar de las actividades de control de garrapatas llevadas a

cabo de manera rutinaria en todos los animales; también sería conveniente evaluar los efectos en la tasa de seroprevalencia dada por la respuesta inmune pasiva que pudiera presentarse en los becerros machos, lo que ha sido contemplado en otros estudios realizados en el ganado del altiplano y trópico de México ^{36,37}.

L. hardjo obtuvo una seroprevalencia de 19.5% en 1996 y durante 1998 una seroprevalencia menor (13.8%); estas tasas reflejan que el agente se ha mantenido también relativamente estable en la población de machos y son valores similares a los que se han reportado en el Estado ⁷³. Sin embargo, cabe señalar la necesidad de realizar nuevos estudios en bovinos machos de la región, por ejemplo estudios de caso control o de cohorte, con objeto de conocer de manera más profunda el comportamiento de la leptospirosis en estos animales, debido a que en este estudio, el número de bovinos machos muestreados fue significativamente menor.

B. abortus en los machos, mostró un incremento entre la seroprevalencia encontrada en 1996, la cual cambió del 4.9%, al 13.8% en 1998; este incremento en la seroprevalencia propone que el agente continúa siendo un reto importante en la salud animal en las explotaciones de la región, así como para la campaña contra la brucelosis de los animales. Es importante señalar que estos resultados denotan la presencia del agente y un incremento de animales infectados puesto que los bovinos machos no son vacunados por disposición propia de la campaña ⁹; por ello, se descarta que la respuesta de anticuerpos en los machos muestreados sea producto de la vacunación. El incremento en la seroprevalencia de la brucelosis en machos representa un foco de atención que debe conllevar a una revisión de las actividades de campaña, así como de las medidas de

prevención y control llevadas a cabo en las explotaciones, debido al impacto económico y de salud pública que representa este padecimiento. En el caso de *M. bovis* los resultados muestran regularidad en la seroprevalencia, ya que durante 1996 los machos tuvieron 3.9% de seropositivos y en 1998, 3.4%.

8.7 Seroprevalencia por edad

Becerras.

El valor de seroprevalencia más alto en estos animales lo presentó *L. hardjo*, que en 1996 se encontró 25.5% de animales seropositivos, mientras que en 1998, la seroprevalencia a este agente fue de 11.4%. A pesar de que la prevalencia de este agente disminuyó de manera importante, estos resultados se pueden deber a una interacción constante entre el agente y las madres de estos animales, por lo que se piensa puede ser una respuesta inmune pasiva.

B. burgdorferi se presentó en este estrato con una seroprevalencia en 1996 del 9.8% y en 1998 fue de 13.6%, estos resultados también indican una respuesta calostroal, así como su interacción con las madres de estos animales. Esta situación se presenta de la misma manera en *B. abortus*, que tuvo una seroprevalencia de 5.9% en 1996 y de 6.8% en 1998 y también en el caso de *M. bovis* que en 1996 se presentó con una seroprevalencia de 5.9% y de 6.8 en 1998.

Desarrollo.

El valor de seroprevalencia más alto lo presentó *L. hardjo*, que en 1996 se encontró 34.5% de animales seropositivos, mientras que en 1998, la seroprevalencia de este agente fue de 16.3%. A pesar de que los valores de este agente disminuyeron también de manera importante en este estrato,

estos resultados manifiestan que el agente se encuentra prevalente en las explotaciones y que los anticuerpos encontrados en estos animales difícilmente serán calostrales, tomando en cuenta que en esta etapa de crecimiento, estas inmunoglobulinas comienzan a declinar y el sistema inmunológico de los mismos ya es maduro y estos animales pueden comenzar a producir anticuerpos protectores.

Con valores de seroprevalencia importantes, *B. burgdorferi* se presentó en este estrato con una tasa en 1996 del 6.0% y en 1998 fue de 18.5%; estos resultados indican la presencia del agente en la población, así como su importante interacción con los animales de este estrato de edad, tomando en cuenta que no son sometidos a una vacunación, que los anticuerpos maternos han comenzado a declinar y que después del destete, los animales se ven sometidos a un cambio ambiental importante ⁹⁶. Del mismo modo, *B. abortus* que tuvo una seroprevalencia de 9.5% en 1996, 13% en 1998 y 2.8% en 1999,, muestra que los animales tienen contacto con el agente; sin embargo, hay que tomar en cuenta que las hembras entre 4 y 6 meses se vacunan contra la brucelosis con la dosis clásica conforme a la Norma Oficial ⁹, por lo que no debe descartarse que buena parte de estos valores se deban a una respuesta vacunal y no a una infección de campo.

Las seroprevalencias de *M. bovis* en animales en desarrollo fueron en 1996, 4.3% y en 1998, 2.2%. Estos resultados representan un importante hallazgo, ya que como se sabe, la tuberculosis bovina es un padecimiento crónico que induce una respuesta celular de manera primaria, por lo cuál la presencia de anticuerpos específicos en animales tan jóvenes, sólo se explica debido a una persistencia de anticuerpos calostrales o a una

reacción cruzada con otro tipo de micobacterias de las cuales alguna son apatógenas como *M. vaccae* y *M. phlei* ⁶⁰.

Adultos - Producción.

L. hardjo en 1996 se encontró en el 30.5% de los animales, mientras que en 1998, la seroprevalencia de este agente fue de 19.0% y en 1999, 22.8%. La seroprevalencia de este agente permaneció estable en este estrato, presentándose la misma variación en 1998 como en otros estratos e incluso con la seroprevalencia general. Nuevamente, estos resultados manifiestan que el agente se encuentra persistente en las explotaciones y que los anticuerpos encontrados son producto de infección ya que el agente es prevalente en la región; además, el sistema de explotación extensivo y semiextensivo permite la transmisión del mismo, a pesar de que se lleva a cabo la vacunación contra este serovar en el ganado; de hecho, solamente en algunas explotaciones se realiza la profilaxis con una vacuna multivalente la cual, a decir de los productores, no ha dado buenos resultados.

B. burgdorferi se presentó en este estrato con una tasa en 1996 del 24.3% y en 1998 fue de 14.5%; estos resultados sugieren la presencia del agente en la población, así como su interacción con los animales muestreados, tomando en cuenta que no son sometidos a una vacunación y que los anticuerpos maternos ya han desaparecido; además, de que en esta etapa vida los animales, ya han sufrido de más de una infestación por garrapatas, las cuáles pudieran transmitir la espiroqueta.

En el caso de *B. abortus*, se tuvo una seroprevalencia de 10.2% en 1996 y de 8.2% en 1998; la importancia de estos resultados radica en que la presencia del agente en la población, representa un factor de riesgo por la

transmisión a las hembras. En ellas se afectará la producción y la calidad de la leche, representando fuertes pérdidas. La presencia de animales infectados subclínicamente hace difícil su erradicación; además, problemas como el aborto y mastitis, pero sobre todo, en la salud pública ya que los productos y subproductos representan un riesgo potencial de infección para la población humana ¹¹.

La seroprevalencia de *M. bovis* en los animales adultos fue en 1996 de 9.6% y en 1998 de 7.8%, lo que representa la endemicidad de este agente en la población, así como el carácter crónico y progresivo. La presencia de anticuerpos identificables en la población marca un punto de atención importante ya que el riesgo de transmisión entre animales y al hombre, está latente.

8.8 Seroprevalencia por edad y sexo

Hembras.

En 1996 las seroprevalencias de *L. hardjo* encontradas en las becerras (27.5%), hembras en desarrollo (32.7%) y en hembras en producción (34%), durante 1996, se puede observar un ligero incremento en estos valores mientras los animales van teniendo mayor edad, esto se explica debido a que el agente es prevalente en la región, *L. hardjo* es el serovar más comúnmente identificado en el ganado bovino con problemas productivos y reproductivos en el mundo ¹⁰³. En esta región los animales tienen un contacto estrecho y constante con el agente, el ambiente es propicio para la existencia y viabilidad del mismo, así como para la transmisión a diferentes huéspedes; sin embargo, es importante mencionar que en el caso de las becerras es muy probable que los anticuerpos identificados por la técnica de ELISA indirecta sean procedentes del calostro suministrado por las madres. De la misma

manera, durante 1998 a pesar de que la seroprevalencia general de *L. hardjo* fue significativamente menor, el comportamiento de estos valores en las hembras en sus diferentes estratos de edad conserva una tendencia positiva conforme la edad de los animales se va incrementando, de tal forma que las becerras tuvieron una seroprevalencia de 10.8%, las hembras en desarrollo 16.7% y en las hembras en producción la seroprevalencia fue de 18.6%

En las hembras, la seroprevalencia de *B. abortus* durante 1996 fue de 7.5% para las becerras, 9.3% en hembras en desarrollo y 9.2% en vacas adultas; este comportamiento puede obedecer a una constante exposición de los animales con el agente en las hembras adultas, puesto que es probable que los anticuerpos de las becerras sean provenientes del calostro y en el caso de las hembras en desarrollo, que los anticuerpos encontrados sean debidos a la vacunación de estas, entre los 4 y 6 meses de edad, conforme la campaña de la brucelosis. Durante 1998, las becerras tuvieron un 8.1% de seroprevalencia, mientras que las hembras en desarrollo tuvieron un 11.5% y las vacas adultas un 8%. Estos valores son similares a los obtenidos dos años atrás; sin embargo, es importante recalcar que la seroprevalencia de las hembras en producción es prácticamente igual a la de las becerras: esto sugiere que la transmisión de anticuerpos se lleva a cabo a través del calostro y que la interpretación de los niveles de seroprevalencia en los becerros, nos puede dar una clara idea de la prevalencia en las madres a través de técnicas serológicas contra anticuerpos específicos ⁶⁷.

Los casos de las seroprevalencias encontradas de *B. abortus* y *M. bovis* durante 1996 y 1998, conservan un comportamiento similar al de *B. abortus*, a diferencia de lo que reportan algunos autores sobre la

disminución de la misma debido probablemente a eventos que comprometen al sistema inmunitario de las hembras adultas, por ejemplo, la gestación y la producción láctea ⁴⁵.

Machos.

En estos animales las seroprevalencias en 1996 y 1998 de *B. burgdorferi*, *B. abortus* y *L. hardjo* han tenido comportamientos similares a los de la población en general. Los machos en desarrollo presentaron las seroprevalencias más altas seguidas por las seroprevalencias de los becerros y por último las tasas más bajas las obtuvieron los sementales. Esto se debe muy probablemente a las medidas de manejo en los animales; sin embargo, cabe señalar que el análisis de este estrato posee algunas limitantes tomando en cuenta que el número de machos muestreados asciende aproximadamente al 12% de la población muestreada, y que de este porcentaje, el 73% de estos corresponde a animales adultos.

En el caso de *M. bovis* durante 1996 y 1998 los machos fueron seronegativos, a pesar de que en 1996 los becerros tuvieron una seroprevalencia de 5.3%. Estos valores se pueden deber a anticuerpos calostrales y en los animales en desarrollo, a anticuerpos recidivantes obtenidos también a través del calostro.

8.9 Seroprevalencia en hembras gestantes y no gestantes.

En esta estratificación se incluyen comparativamente a las hembras gestantes y no gestantes de entre los animales en desarrollo y producción. La seroprevalencia encontrada entre ambas, está influenciada por la misma gestación, la lactación, la edad y el número de gestaciones, ya que

estas condiciones producen diferencias en la respuesta inmunológica.
45,108

La seroprevalencia de los agentes zoonóticos estudiados controlando por edad en 1996 fue generalmente mayor en las hembras gestantes que en las hembras vacías; sin embargo, de *L. hardjo*, se tuvo una seroprevalencia en hembras gestantes de 30.2% mientras que en hembras no gestantes la seroprevalencia fue de 36.2%; esto sugiere un indicio de inmunosupresión en la hembra gestante que ha sido reportada en ganado bovino del trópico mexicano ⁴⁵. Thierman ¹⁰³, menciona que la infección por *Leptospira* puede persistir por más de 142 días en úteros grávidos de ovinos. Del mismo modo, en los resultados de seroprevalencia que se reportan en el muestreo de 1998, generalmente las hembras gestantes presentaron una menor seroprevalencia que las hembras no gestantes para los cuatro agentes zoonóticos estudiados. De este modo, en el caso de *B. burgdorferi* las hembras gestantes tuvieron una seroprevalencia del 10.4% y en las no gestantes la tasa fue de 18.4%; *L. hardjo* en gestantes (13.9%) y en no gestantes (21.1%); *M. bovis* en gestantes (7.8%), en no gestantes (5.6%) y por último, en el caso de *B. abortus*, la seroprevalencia en las hembras gestantes fue de 6.9% mientras que en las hembras no gestantes la seroprevalencia ascendió a 9.8%. En el caso de este agente se debe mencionar la importancia de animales positivos, por sus implicaciones sobre la gestación en las hembras.

8.10 Evaluación de la respuesta vacunal contra la rabia

El uso de la técnica de ELISA en el monitoreo realizado durante el proceso de producción de vacunas antirrábicas con la finalidad de evaluar el contenido de glicoproteínas en las mismas así como la predicción de su potencia se ha descrito por varios autores ^{81,109,110}. Los resultados

obtenidos utilizando la técnica de ELISA en los bovinos muestreados durante los tres años muestran variaciones mínimas en la frecuencia general de animales protegidos entre los años de 1996 y 1998. Lo anterior sugiere que la baja protección se puede deber a diversos factores tomando en cuenta las características de la población bovina y posibles fallas en el proceso de vacunación desde su producción, almacenaje y expendio hasta su transporte y la aplicación del biológico, situación que se ve reflejada en la presencia de casos de derriengue. No se perciben cambios significantes en la frecuencia de animales o explotaciones con un nivel adecuado de protección de un año a otro. Es importante recalcar que los hallazgos de becerros no vacunados que obtuvieron altos porcentajes de ELISA contra Rv, denotan que en aquellas vacas que presentan una respuesta serológica adecuada, la transmisión de anticuerpos colostrales se está llevando a cabo en cantidades suficientes.

Este tipo de estudios seroepidemiológicos son una útil y rápida herramienta de bajo costo mediante la cuál es posible llevar a cabo la verificación de la eficiencia de los programas de vacunación, no solamente en el caso de la rabia, sino de otras enfermedades que son prevenidas y/o controladas por medio de la vacunación.

Es importante en el futuro realizar más estudios sobre la utilidad de esta técnica serológica y el potencial que pudiese tener en las campañas contra el derriengue en nuestro país, así como trabajos tomando en cuenta los resultados obtenidos sobre la correlación entre los valores de porcentaje de ELISA y el título de anticuerpos neutralizantes existentes en una muestra de referencia. Estos análisis permitirán una mejor interpretación y uso de técnicas alternativas como lo es la ELISA indirecta en el monitoreo y vigilancia de esta enfermedad.

8.11 Estudio prospectivo longitudinal

Se realizó el análisis seroepidemiológico de una selección de 35 animales que fueron muestreados durante los tres años de duración del estudio. El número de animales en esta muestra se redujo de manera sustancial debido a que muchos de los animales muestreados en la primera ocasión (1996) fueron vendidos, llevados a rastro o murieron en los siguientes años y por lo cuál en el muestreo final (1999), solamente se pudieron coleccionar muestras de suero de 35 animales con los cuáles se realizó dicho análisis. En este estudio, las seroprevalencias generales y específicas contra los diferentes agentes zoonóticos aumentaron; sin embargo, esto pudo haberse debido a lo reducido de la muestra. En algunas seroprevalencias generales y de manera más clara en los resultados específicos por edad pudo observarse que las tasas de seroprevalencia tienden a incrementarse conforme los animales van creciendo y es específicamente en los animales en desarrollo donde las variaciones entre tasas fueron mayores, lo cuál puede deberse a que la infección de los animales se realiza en esta etapa, donde en los inicios de la misma, los anticuerpos transmitidos por el calostro comienzan a declinar; y el manejo así como la alimentación de los animales cambia drásticamente. También se observó en este estudio que en la mayoría de las seroprevalencias controlando por edad en los animales adultos, las tasas disminuyen en la mayoría de los casos pero sin embargo los animales continúan siendo positivos a los mismos por lo cual los procesos de infección tienden a estabilizarse en la población ya sea por el continuo contacto con dichos agentes, presencia de la vacunación en algunos casos o por cronicidad propia de la patogenia de dichas etiologías. Vale la pena señalar que aunque se muestrearon para este estudio solamente dos machos adultos, uno de ellos fue seropositivo a *B. burgdorferi*, por lo que será necesario en un futuro intentar el aislamiento del agente en esta población así como la realizar una prueba diagnóstica

como Western blot que ayude a confirmar la presencia de dicho agente en la población.

Por otro lado, estos resultados ponen de manifiesto la uniformidad en la realización e interpretación de la técnica de ELISA utilizada, que a pesar de que la cantidad de animales falsos positivos principalmente puede ser importante debido a las características de los antígenos utilizados, el sentido que este estudio tuvo fue el de realizar seroepidemiología a través del tamizaje en las poblaciones seleccionadas. Es importante mencionar que en la actualidad, la técnica de ELISA se ha ido modernizando y haciendo más eficiente con el uso de antígenos cada vez más purificados, así como anticuerpos monoclonales que confieren mayor especificidad a los resultados obtenidos con esta técnica.

9. LITERATURA CITADA

1. Kellar JA. El impacto de la infraestructura en los sistemas de muestreo y vigilancia. Informes de síntesis sobre los temas técnicos presentados al comité internacional o a las comisiones regionales 1996, Oficina Internacional de Epizootias; 1997, 175-206.
2. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario Estadístico del Estado de Chiapas. Edición 1997. México: Gobierno del Estado de Chiapas, 1997.
3. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario Estadístico del Estado de Chiapas. Edición 1998. México: Gobierno del Estado de Chiapas, 1999.
4. Gobierno del Estado de Chiapas. Programa de Desarrollo Agropecuario 1995-2000 del Estado de Chiapas. 1a. edición, 1995.
5. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Compendio Estadístico de la Producción Pecuaria 1989-1993., México (D.F.) Subsecretaría de planeación .1994.
6. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Atlas Agropecuario del Estado de Chiapas. VII Censo agropecuario 1991. México: Gobierno del Estado de Chiapas, 1997.
7. López-Merino A, Migranas-Ortíz R, Pérez-Miravete A, Magos C, Salvatierra IA, Tapia-Coyner R, et al: Seroepidemiología de la brucelosis en México. Salud Pub Mex 1992;34:230-240.
8. Eaglesome MD, García MM. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1997;6:215-225.
9. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. México (DF): SAGAR, 1996.

10. Manzano JR. Tratamiento de brucelosis humana. Rev Mex Ortop y Traum 1997;11:197-200.
11. Mejía EF, García VZ, Díaz AE, Velázquez QF. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en la región norte del Estado de Chiapas. Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría; 1997 Julio 9-12; Colima (Colima) México (D.F.). Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1997:1-2.
12. Kerby PJ, Quiroga JL, McGrane J. Field evaluation of an indirect ELISA for detection of brucellosis in lowland Bolivia. Trop Anim Health and Prod. 1997;29:65-72.
13. Nielsen K, Kwok A. Reuse of polystyrene 96 well plates for indirect enzyme- immunoassay for detection antibody to *Brucella abortus*. Arch Med Vet 1996;39-43.
14. Gossens H, Dekeyser P, Butler J. *Brucella mellitensis*: Person to person transmission. Lancet 1983;1:73.
15. Naparstek E, Block C, Slann S. Transmission brucellosis in bone marrow transplantation. Lancet 1982;1:1574-1575.
16. Grasa M, Leoz A, Gil A. Brucelosis: 50 casos. Estudio epidemiológico - clínico y valoración de métodos diagnósticos. Salud. Pub Mex 1992;34:59-63.
17. Uzal FA, Carrasco AE, Nielsen K, Echaide S, Cabrera RF. An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG, enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Microbiol. 1996;52:175-180.
18. Uzal FA, Carrasco AE, Nielsen K, Echaide S, Cabrera RF. Evaluation of a competitive ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Res Com. 1996;20:421-426.
19. López MJ, Psijas C, Riquelme F. Comparación de una técnica inmunoenzimática con la prueba de Rosa de Bengala y Rivanol en la

- detección de anticuerpos bovina contra *Brucella abortus*. Agro-Ciencia. 1995;11:63-69.
20. Weynants V, Tibor A, Denoel PA, Saegerman C, Godfroid J, Thiange P, Letteson J. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* 0:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Vet Microbiol* 1996;48:101-112.
 21. Madigan EJ, Teitler J. *Borrelia burgdorferi* borreliosis. En: Zoonosis Updates from the JAVMA. Schamburg, Illinois, 1990:20-24.
 22. Burgdorfer W, Barbour G, Hayes FS. Isolation of a cultivable Spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Current Microbiol* 1983;8:123-126.
 23. Cranwell MP, Cutler SJ. Lyme disease serology in cattle. *Vet Rec* 1996;138:551-552.
 24. Takahashi K, Isogai E, Isogai H, Takagi T, Sasaki K, Fujii N, et al. Serological survey for *Borrelia burgdorferi* infection in cattle in southern Hokkaido. *J Vet Med Sci* 1993;55:921-924.
 25. Grassmann B, Cop PA, Schmitt M, Blobel H. Adherence of *Borrelia burgdorferi* to granulocytes of different animal species. *Zentralbl Bakteriol* 1997;285:501-508.
 26. Trees AJ. The transmission of *Borrelia theileri* by *Boophilus annulatus* (Say, 1821). *Trop Anim Health Prod* 1978;10:93-94.
 27. Smith RD, Miranpuri GS, Adams JH, Ahrens EH. *Borrelia theileri*: isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves. *Am J Vet Res* 1985;46:1396-1398.
 28. Rogers AB, Smith RD, Kahoma I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi*, and *Borrelia coriaceae* in cattle. *Am J Vet Res* 1999;60:694-697.

29. Tuomi J, Rantamaki LK, Tanskanen R. Experimental infection of cattle with several *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains; immunological heterogeneity of strains as revealed in serological test. *Vet Microbiol* 1998;60:27-43.
30. Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. *Am J Epidemiol* 1988;127:818-825.
31. Sheets JT, Rossi CA, Kearney BJ, Moore GE. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Borrelia burgdorferi* exposure in dogs. *J AVMA* 2000;216:1418-1422.
32. Gerber MA, Shapiro ED. Diagnosis of Lyme disease in children. *J Pediatr.* 1992;121: 157-162.
33. Miyamoto S, Takemura Y, Hanba Y, Kitani A, Ishisuka T, Suzuki K, et al. Comparable evaluation of serological diagnostic test (ELISA, IFA and PA methods) for the detection of anti-*Borrelia burgdorferi* antibody. *Rinsho Byori* 1992;40:1204-1209.
34. Burgdorfer W, Barbour G, Hayes FS. Lyme disease - a tick -borne spirochetosis? *Science* 1982;216:1317-1319.
35. Magnarelli LA, Flavell RA, Piadula SJ. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:69-173.
36. Carrillo GD. Seroepidemiología de Enfermedades Infecciosas en Ganado Ovino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina CEIEPO (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Cd. Universitaria: UNAM, 1996.
37. Esquivel SH. Seroepidemiología de Enfermedades Infecciosas en Ganado Ovino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical CEIEGT (tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Cd. Universitaria: UNAM, 1998.

38. Mateo T, Pérez A, Peña R et al. Leptospirosis icterica (síndrome de Weil) en un niño con linfoma, Bol Med Hosp Inf Mex 1996;53:411-414.
39. Peter G: Leptospirosis: a zoonosis of protean manifestations. En: Nelson J, McCracken GH Jr, editores. Clinical reviews in pediatric infections disease. Toronto: BC Decker, 1985: 171.
40. Caballero A. Leptospirosis. Epidemiología. México: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica No. 20 1995;12:1-2.
41. De la Peña MA, Aluja SA, Hernández GE, Rodríguez REA et al. Detección de *Leptospira interrogans* en bovinos, estudios: serológico, microscópico, bacteriológico y molecular. Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría; 1997 Julio 9-12; Colima (Colima) México. México (D.F.): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1997:23-25.
42. Barajas-Rojas J.A., Riemann HP, Franti CE. Application of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of México. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1993;12:717-732.
43. Barajas-Rojas J.A., Riemann HP, Franti CE. Notes about determining the cut-off value in Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Letter to the editor. Prev Vet Med, 1993;15:231-233.
44. Barajas-Rojas J.A., Riemann HP, Franti CE. A study association between ELISA response to infectious disease agents and calving interval in cattle in the tropics of Mexico. Ciência Rural 1993;23:329-332.
45. Barajas-Rojas J.A., Riemann HP, Franti CE. Serological screening for infectious cattle diseases. I. Influence of reproductive status. Ciência Rural 1993;23:69-72.

46. Ribeiro M, Brandao A, Romero C. Evaluation of diagnostic tests for human leptospirosis, Braz J Med Biol Res 1996;29: 773-777.
47. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). México (DF): SAGAR, 1996.
48. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuber Lung Dis 1995;76:1-46.
49. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Tuber Lung Dis 1996;77:103-108.
50. Essey MA, Koller MA. Status of bovine tuberculosis in North America. Vet Microb 1994;40:15-22.
51. Kantor IN, Rittaco V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. Vet Microb 1994;40:5-14.
52. Thoen CO, Steele JH. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. 1th ed. U.S.A.: Iowa University Press, 1995.
53. Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis in the world estimated global incidence of smear-positive pulmonary tuberculosis. Unreliability of officially reported figures on tuberculosis. Bull Int Union Tuberc 1981;56:118-120.
54. Thoen CO, Thorlson KJ, Miller LD, Himes EM, Morgan RL. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in American bison. Am J Vet Res 1988;49:1861-1865.
55. Thoen CO, Quinn WJ, Miller LD, Stackhouse L. *Mycobacterium bovis* infection in North American elk (*Cervus elaphus*). J Vet Diag Invest 1992;4:423-427.
56. Thoen CO. Tuberculosis. J Am Vet Med Assoc 1988;193:1045-1088.

57. Thoen CO. Tuberculosis in wild and domestic mammals. En tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. 1th. Ed., Washington D.C.: American Society for Microbiology, De. B.R. Bloom, 1994.
58. Rittaco V, de Kantor N. Assesment of the sensivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. J Vet Med Res 1987;34:119-125.
59. Rittaco V, López B, Barrera L. Further evaluation of an indirect of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. J Vet Med Res 1990;37:19-27.
60. Garborick CM, Salman MD, Ellis RP. Evaluation of a five-antigen ELISA for diagnosis of tuberculosis in cattle and Cervidae. JAVMA. 1996;209:962-966.
61. Wilkinson L. Understanding the nature of rabies: An historical perspective. En: Campbell JB, Charlton KM (editors). Rabies. Boston: Kluwer Ac Press, 1988: 1-10.
62. The latest Disease Information on-line. Office Int des Epizooties. (serial online) 1999 (cited 1999 oct 10); Available from URL: http://www.oie.int/info/A_info.htm
63. Aguilar SA. Estudio de la variabilidad molecular del virus de la rabia en México. En: Moreno Chan R (ed). Ciencia Veterinaria 8:51-84, 1998.
64. Ramírez VM. Los mecanismos de exposición e infección rábica en el ciclo silvestre. En Simposio. La atención médica de las personas involucradas en un incidente de rabia. Organización Panamericana de la Salud-Instituto Mexicano del Seguro Social -Secretaría de Salud. México. 51-84, 1987.

65. Vargas GR, Cárdenas LJ. Epidemiología de la rabia: Situación actual en México. En: Moreno Chan R (ed). Ciencia Veterinaria 7:332-358, 1996.
66. Barajas-Rojas J.A., Riemann HP, Franti CE. Serological screening for infectious cattle diseases. II. Association between prevalence and level of ELISA response. *Ciência Rural* 1993; 23:193-196.
67. Barajas-Rojas J.A., Riemann HP, Franti CE. Serological screening for infectious cattle diseases. III. Choice of sentinel animals. *Ciência Rural* 1993;23:197-201.
68. Barajas-Rojas J.A., Riemann HP, Franti CE. Markov chain modeling of endemic cattle disease in the tropics of Mexico. *Ciência Rural* 1993;23:325-328.
69. Barajas-Rojas J.A. Aplicación de la técnica inmunoenzimática de ELISA para estudios epidemiológicos de enfermedades de ganado bovino en el trópico de México. En: Moreno ChR. *Ciencia Veterinaria*. 1a.Ed. México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 1998.
70. Martin SW, Meek AH, Willeberg P. *Veterinary Epidemiology, principles and methods*. 1th edition. U.S.A.: Iowa University Press, 1987.
71. MacMahon B, Pugh FT. *Principios y métodos de epidemiología*. 2a. de. México: La Prensa Médica Mexicana S.A., 1983.
72. Hernández GE, Rodríguez REA, Jiménez FF y De la Peña MA. Perfil del diagnóstico de leptospirosis en bovinos de 1990-1996. *Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría*; 1997 Julio 9-12; Colima (Colima) México. México (D.F.): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1997:53-54.
73. Guiris ADM, Milo AR, Cruz RJ, Vázquez CF y Samayoa OY. Estudio epizootiológico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR),

- Leptospirosis y Brucelosis en vacas con problemas reproductivos del Municipio de Villaflores, Chiapas. Memorias del XXII Congreso Nacional de Buiatría; 1998 Julio 20-25; Acapulco, Guerrero México. México (D.F.): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1998:78-80.
74. Alvarez-Gordillo GC, Halperin-Frisch D, Blancarte-Melendres L. Factores de riesgo para resistencia a drogas antifímicas en Chiapas, México, Salud Pub Mex 1995;36:59-63.
75. Secretaría de Salud. Boletín semanal de vigilancia epidemiológica semana 32, México (D.F), 2000.
76. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Información Estadística del sector Salud y Seguridad Social Cuaderno Número 15, México (D.F.): INEGI, 1999.
77. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Estadísticas Vitales del Estado de Chiapas, Cuaderno Número 6, México (D.F.): INEGI, 1999.
78. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Boletín Mensual de Salud Animal Noviembre - Diciembre. México (D.F.): Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Dirección General de Salud Animal. CPA; 1997.
79. Schwabe CW. Veterinary Medicine and Human Health. 3th. edition, U.S.A.: Waverly Press Inc, 1984.
80. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica.. Reporte Mensual de Enfermedades en Animales, junio de 2000.
81. Montañó HJA. A direct ELISA to evaluate the glycoprotein content of suckling mouse brain rabies vaccines. Arq Biol Tecnol 1986;29:413-421.

- 82.Desquesnes M. Estandarización internacional y regional de los ensayos inmunoenzimáticos: métodos, interés y límites. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1997;16:822-823.
- 83.Daniel WW. *Biostatistics: A foundation for Análisis in the Health Sciences*. 4th ed, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1987.
- 84.Moorehouse PD and Hugh-Jones ME. Serum banks. *Vet. Bull* 1981;51:277-290.
- 85.Grunberger D. Inhibition of spontaneous splitting of gamma-globulin preparations with ϵ -Amino-caproic Acid. *Nature* 1962;194:481-482.
- 86.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- 87.Vernon FK and Bernlohr WR. A new Spectrophotometric Assay for Protein in Cell Extracts. *Anal Biochem* 1977;82:362-371.
- 88.Argote E, López G. Pautas para evaluar la calidad de los juegos diagnósticos basados en la técnica de ELISA. *Rev Cub Cien Vet*. 1995;24:16-19.
- 89.Wright PF, Tounkara K, Lelenta M. International reference standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 1997, 16:824-832.
- 90.Wright PF, Nilsson E, Lelenta M. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1993, 12:435-449.
- 91.Behymer DE, Ruppanner R, Brooks D, Williams JC and Franti CE. Enzyme immunoassay for surveillance of Q fever. *Am J Vet Res* 1985;46:2413-2417.
- 92.Behymer DE, Riemann HP, Utterback W, D-Elmi C and Franti CE. Mass screening of cattle sera against 14 infectious diseases agents,

- using ELISA system for monitoring herd and livestock. Am J Vet Res 1991;52:1699-1705.
93. Voller A, Bidwell DE and Bartlett A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe Guernsey, 1979.
94. Ruppanner R, Meyer ME, Willeberg P and Behymer D. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with other tests for brucellosis, using sera from experimentally infected heifers. Am. J Vet Res 1980;41:1329-1332.
95. Granzer W. Quality control of enzyme immunoassay, particularly ELISA for bovine immunoglobulins. Berliner and Munch. Tierarztl. Wochenschr. 1986;99:267-272.
96. Vanzini VR. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle. Prev Vet Med 1998;36:211-217.
97. Lindenmayer J, Weber M, Bryant J, Marquez E, Onderdonk A. Comparison of indirect immunofluorescent-antibody assay, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western immunoblot for the diagnosis of Lyme disease in dogs. J Clin Microbiol 1990;28:92-96.
98. Cho HJ, Gale SA, Malkin KL Diagnostic Specificity, Sensitivity and Cross-reactivity of an Enzyme-linked immunosorbent Assay for the Detection of Antibody Against *Leptospira interrogans* serovars *pomona*, *sejroe* and *hardjo* in Cattle. Can J Vet Res 1989;53:285-289.
99. Asociación Americana de Salud Pública. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud Pub Científica No. 538. Washington, D.C. 1992.

100. Acha PN, Szyfred G. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Panamerican Health Organizations, Washington, D.C. 1980.
101. Bryan FL. Diseases transmitted by foods. 2nd ed., HHS publication CDC., Atlanta 1984.
102. Feigin R, Anderson D. Leptospirosis. En: Feigin R, Cherry J, editores. Textbook of pediatric infectious diseases. 3a. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992:1167-1183.
103. Thiermann AB. Leptospirosis. Current development and trends, JAVMA 1984;184:722-725.
104. Cousins DV, Robertson GM, Hustas L. The use of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *pomona* in cattle. Vet Microbiol 1996;10:439-450.
105. Nuñez TD, Díaz AE, Velázquez QF, Trigo TF, Suárez GF.: Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. Vet Méx 1997;28:241-245.
106. Higgins R.J., Harbourne J.F, Little T.W.A. and Stevens A.E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype *hardjo*. Vet Rec 1980; 107:307-310.
107. Carter G.R. Bacteriología y Micología Veterinarias. Aspectos Esenciales. 1^a. ed. México: Manual Moderno, 1985.
108. Morrison, I. The ruminant immune system in health and disease. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.
109. Atanasiu P. Titrage immunoenzymatique de la glycoprotéine, une technique "in vitro" pour l'appréciation de l'activité des vaccins antirabiques. J Biol Stand 1982;10:289-296.
110. Van Der Marel P, Van Wezel AL. Quantitative determination of rabies antigen by ELISA. J Biol Stand. 1981;50:267-276.

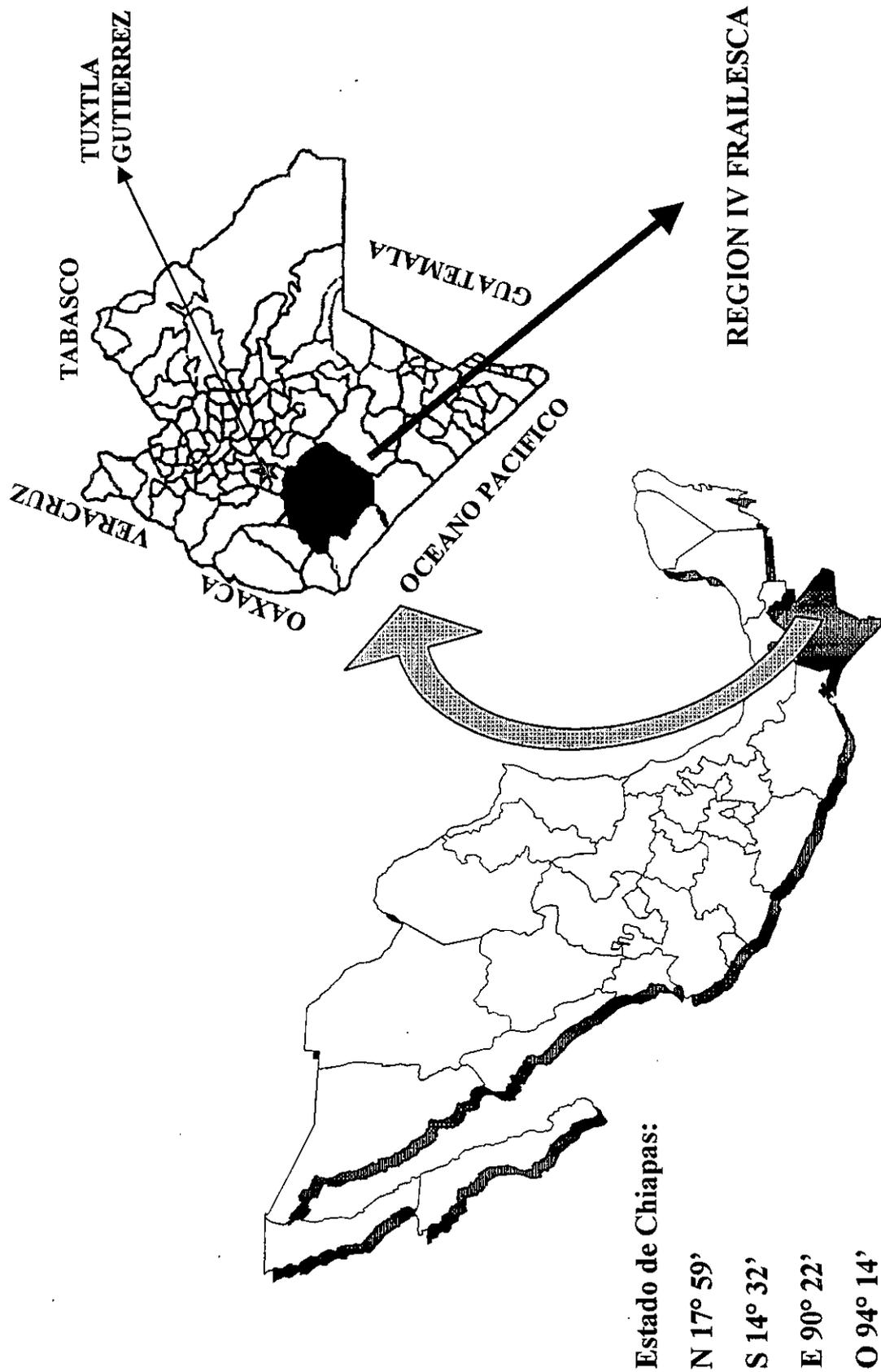


Figura 1. Situación geográfica de la región Frailesca en el Estado de Chiapas, México.

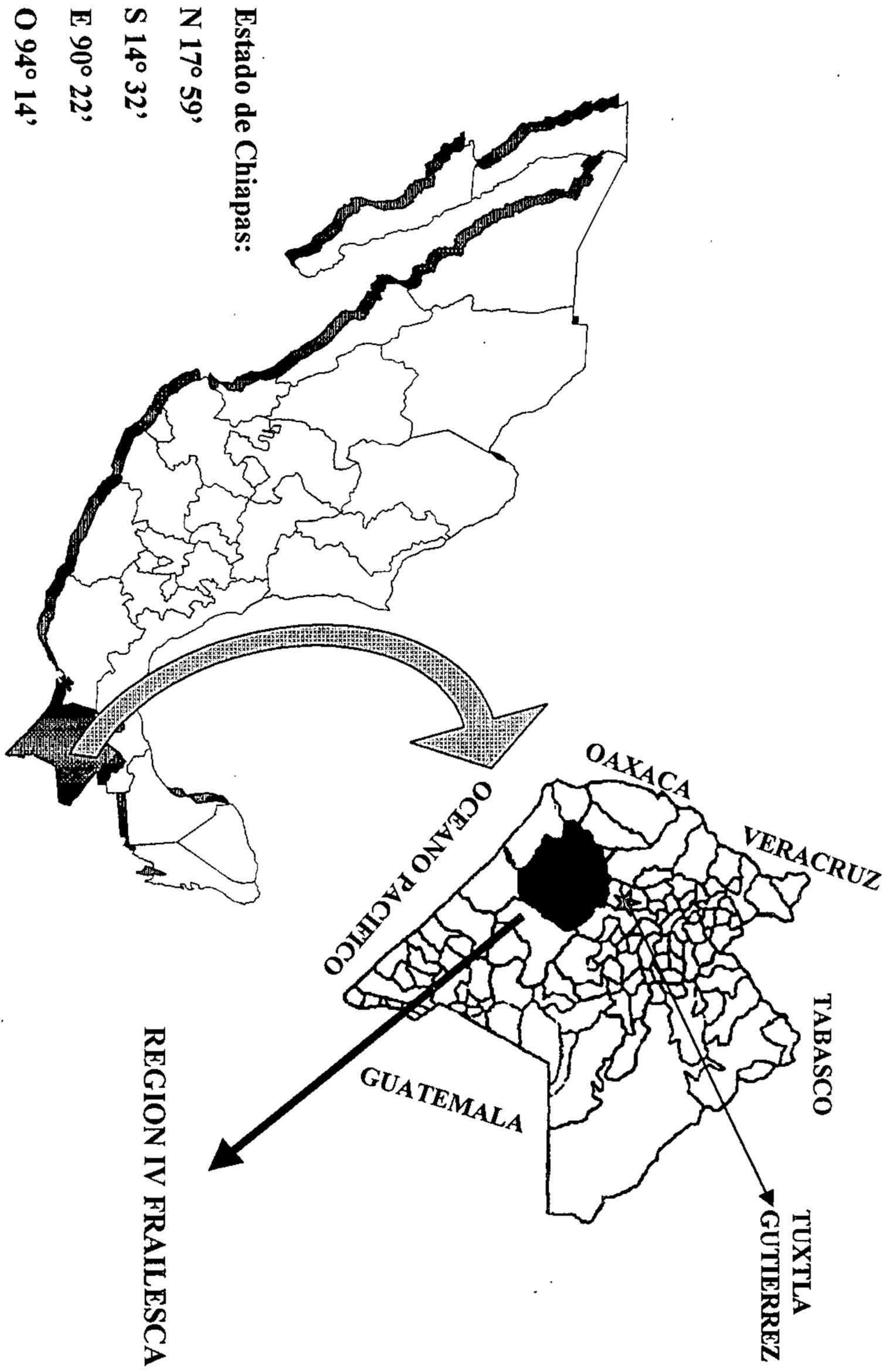


Figura 1. Situación geográfica de la región Frailesca en el Estado de Chiapas, México.

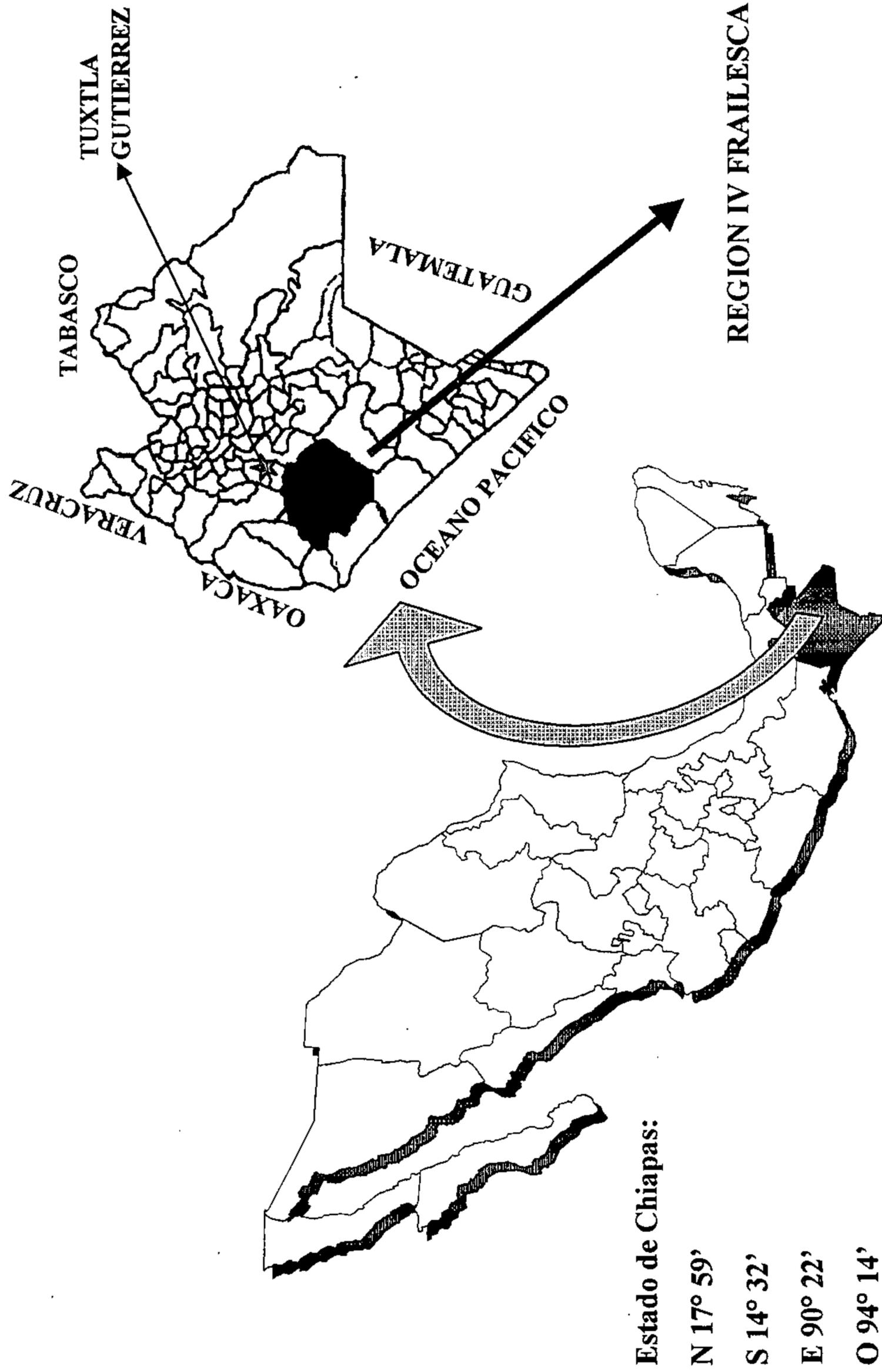


Figura 1. Situación geográfica de la región Frailesca en el Estado de Chiapas, México.

**PROYECTO SEROEPIDEMIOLOGIA DE ZONOSIS EN BOVINOS, LA
FRAILESCA CHIAPAS
ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA**

- FECHA _____
- NOMBRE DEL RANCHO _____
Has _____

LIMITES DEL RANCHO:
N _____ S _____
E _____ O _____

NUMERO DE ANIMALES EN LA EXPLOTACION _____
RAZA (S) DE SUS ANIMALES _____
LOTIFICA A SUS ANIMALES SI () NO ()
¿CÓMO? _____
CUENTA CON REGISTROS SI () NO ()

- INSTALACIONES _____
FUENTE DE AGUA: POZO () TUBERIA () CISTERNA () AFLUENTE
NATURAL () OTRO ()
- FUENTE DE ALIMENTO: FORRAJE DE CORTE () PASTOREO () CULTIVO ()
MIXTO ()
- UTILIZA CONCENTRADOS EN LA ALIMENTACION DE SUS ANIMALES
SI () NO ()

CARACTERISTICAS DEL MANEJO DE LOS ANIMALES.

- PESA A SUS ANIMALES SI () NO () ¿CADA CUANTO TIEMPO? _____
DESPARASITA SI () NO () PRODUCTO _____ DOSIS _____
¿CADA CUANTO TIEMPO? _____
- VACUNA A SUS ANIMALES SI () NO () ¿CADA CUANTO TIEMPO? _____
¿CONTRA QUE ENFERMEDADES? _____
¿A QUE ANIMALES? _____

FECHA DE LAS ULTIMAS VACUNACIONES _____
OTROS MANEJOS QUE REALIZA _____

MOVILIZACION DE LOS ANIMALES:

- ¿DE DONDE OBTIENE SUS REEMPLAZOS? _____
¿CÓMO LOS VENDE? A RASTRO () A PIE DE RANCHO ()
OTROS _____

¿CUÁLES SON LAS ENFERMEDADES QUE SE HAN PRESENTADO EN SUS ANIMALES
EN LOS ULTIMOS DOS AÑOS? _____

Figura 2. Formato de la encuesta epidemiológica aplicada a los productores previo al muestreo de los animales en cada una de las explotaciones seleccionadas para el estudio.

Etapa 1. Fijación del antígeno a la microplaca.

Etapa 2. Colocación del suero problema a evaluar e incubación.

Etapa 3. Depósito del conjugado marcado con una enzima e incubación.

Etapa 4. Adición del sustrato y agitación.

Etapa 5. Detención de la reacción enzimática y lectura de absorbancia.



Figura 3. Representación esquemática de la técnica de ELISA indirecta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Testigo positivo fuerte	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B		Testigo positivo fuerte	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C		Testigo positivo débil	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D		Testigo positivo débil	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E		Testigo negativo fuerte	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F		Testigo negativo fuerte	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G		Testigo negativo débil	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H		Testigo negativo débil	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40


{ Sueros problema }
 Columna en blanco (sin suero)

Figura 4. Esquema de la microplaca para el análisis de los sueros problema a procesarse por duplicado con la prueba de ELISA indirecta.



Figura 5. Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en bovinos de doble propósito de la región Frailesca Chiapas, 1996 y 1998.

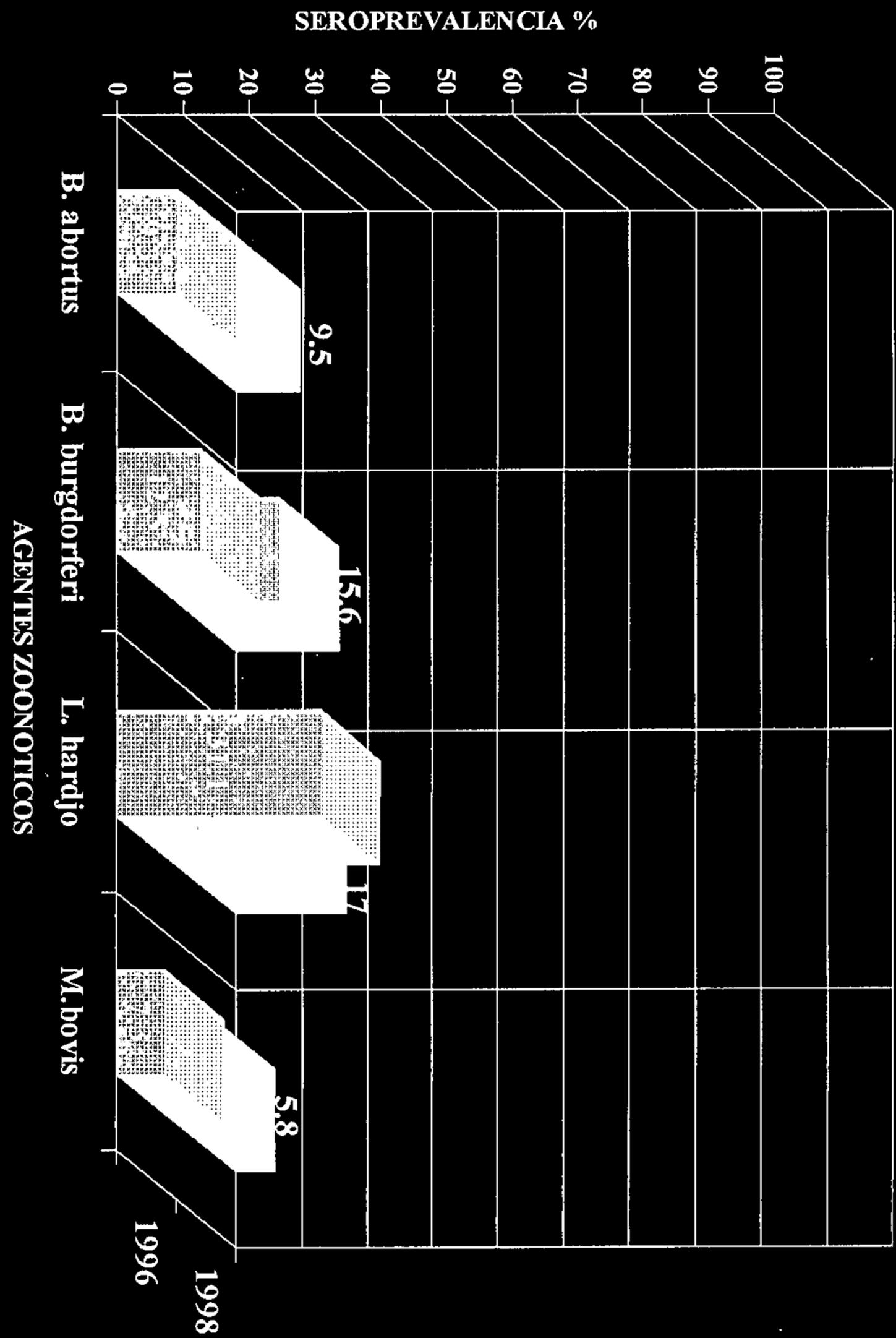


Figura 5. Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en bovinos de doble propósito de la región Frailesca Chiapas, 1996 y 1998.

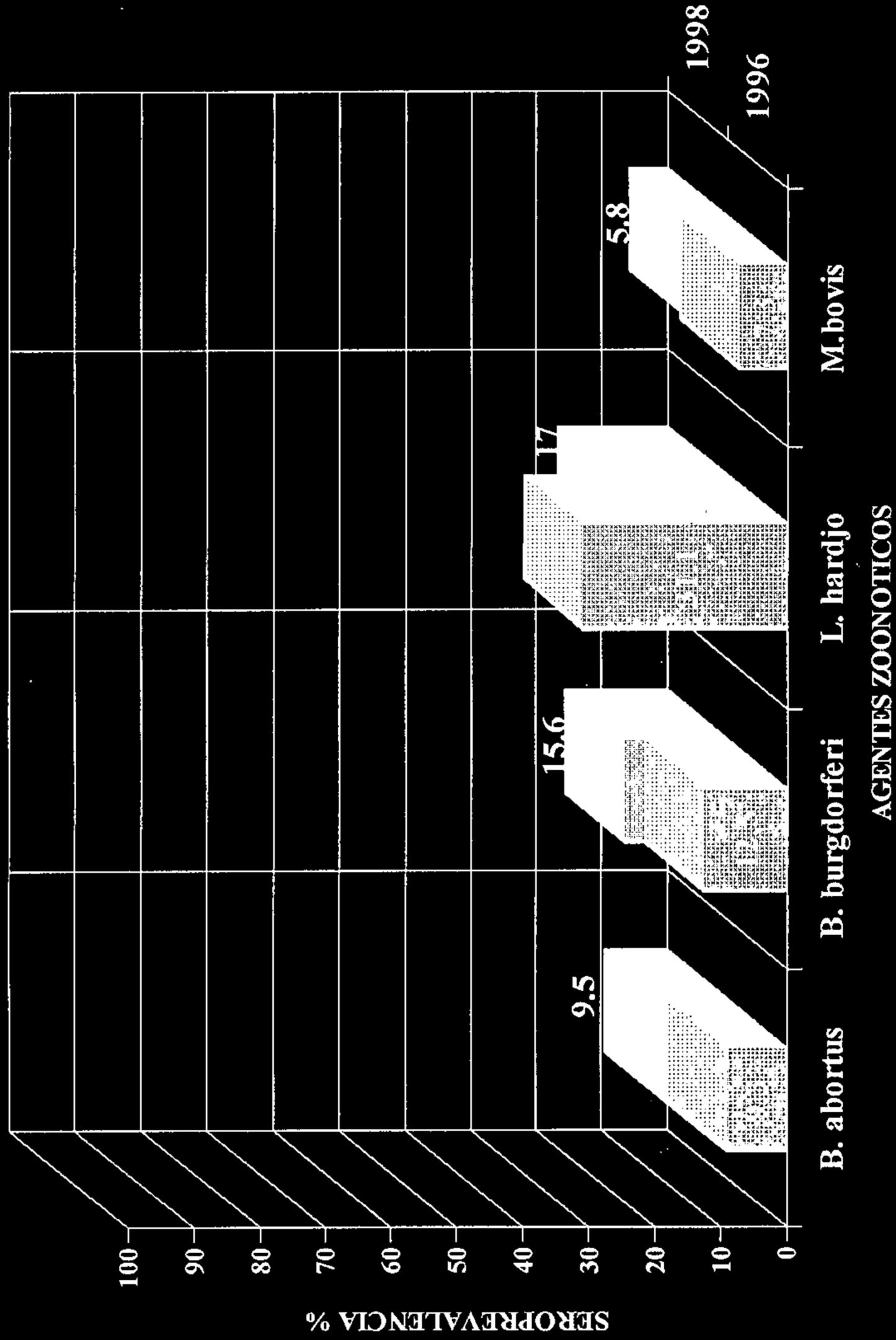


Figura 5. Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en bovinos de doble propósito de la región Frailesca Chiapas, 1996 y 1998.

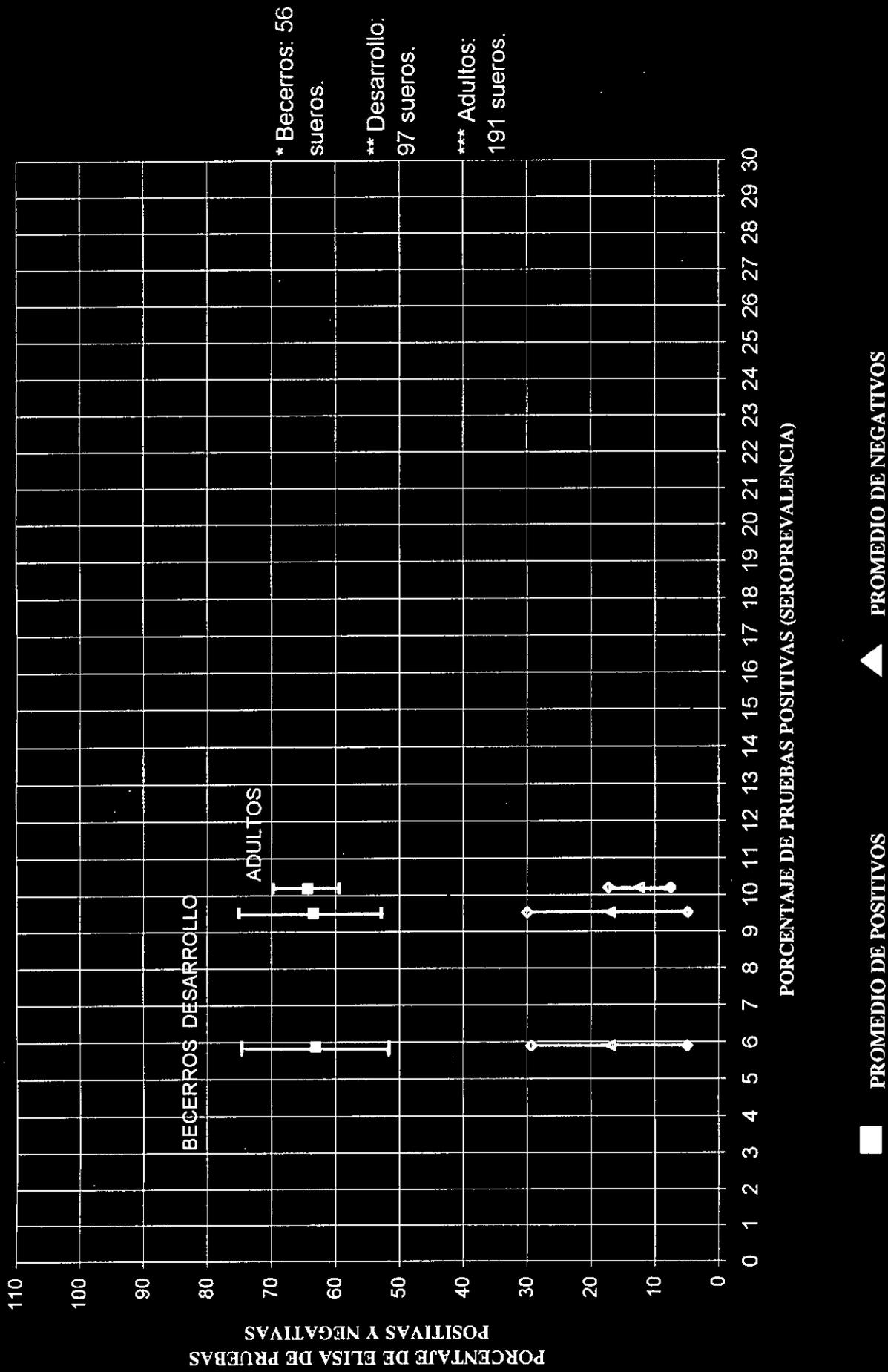
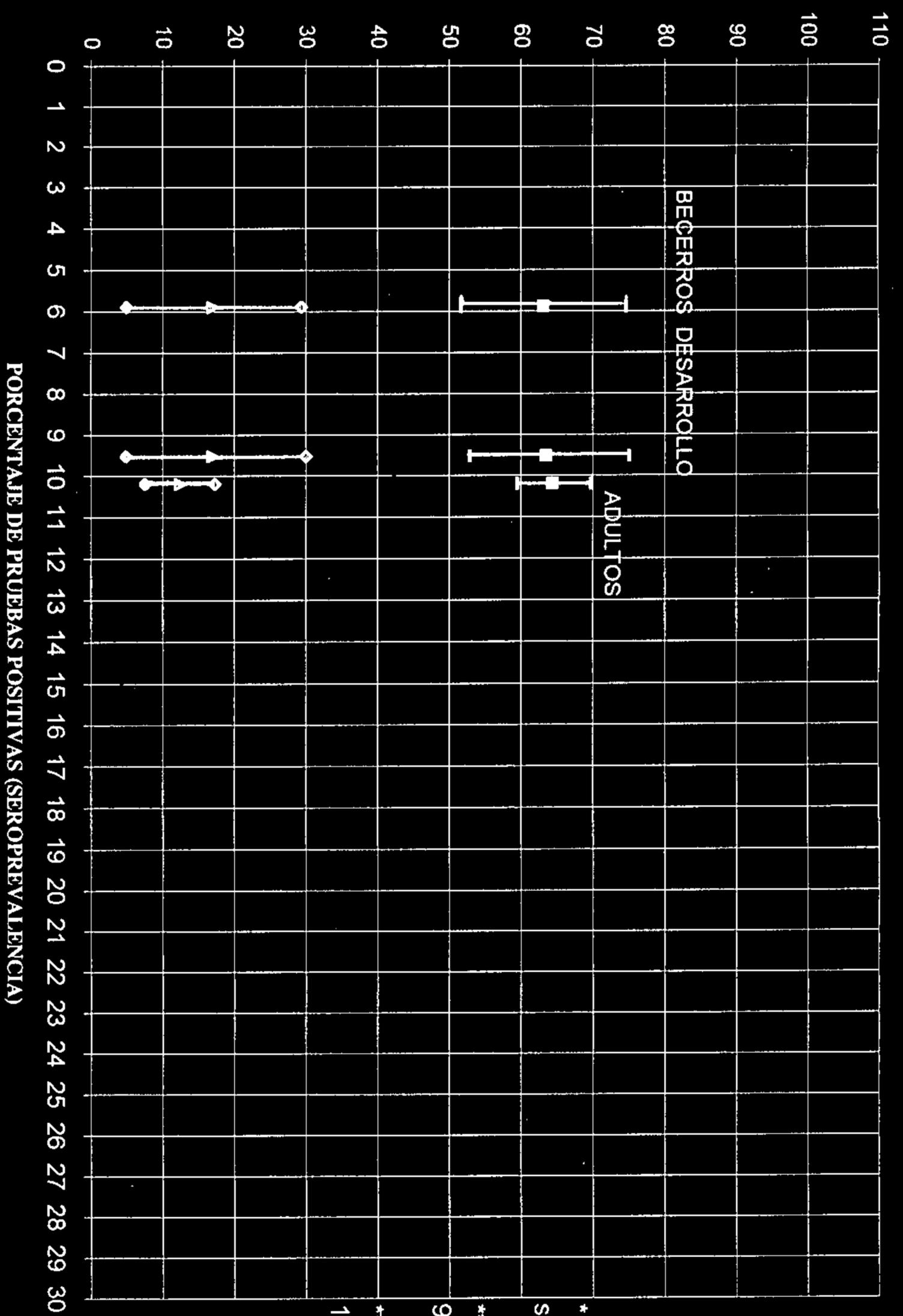


Figura 6. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *B. abortus* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

PORCENTAJE DE ELISA DE PRUEBAS POSITIVAS Y NEGATIVAS



* Becerros: 56 sueros.

** Desarrollo: 97 sueros.

*** Adultos: 191 sueros.

Figura 6. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *B. abortus* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

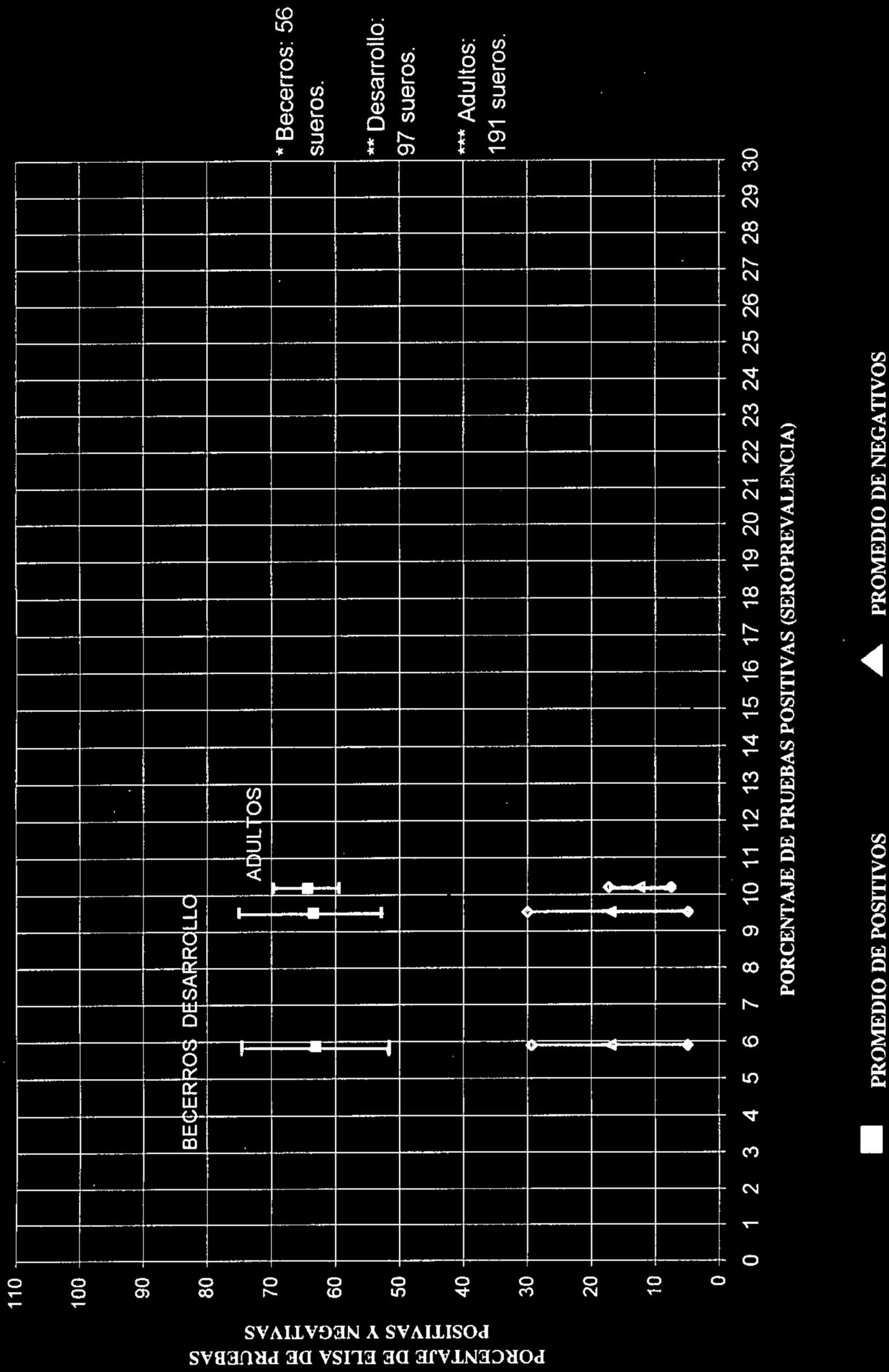


Figura 6. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *B. abortus* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

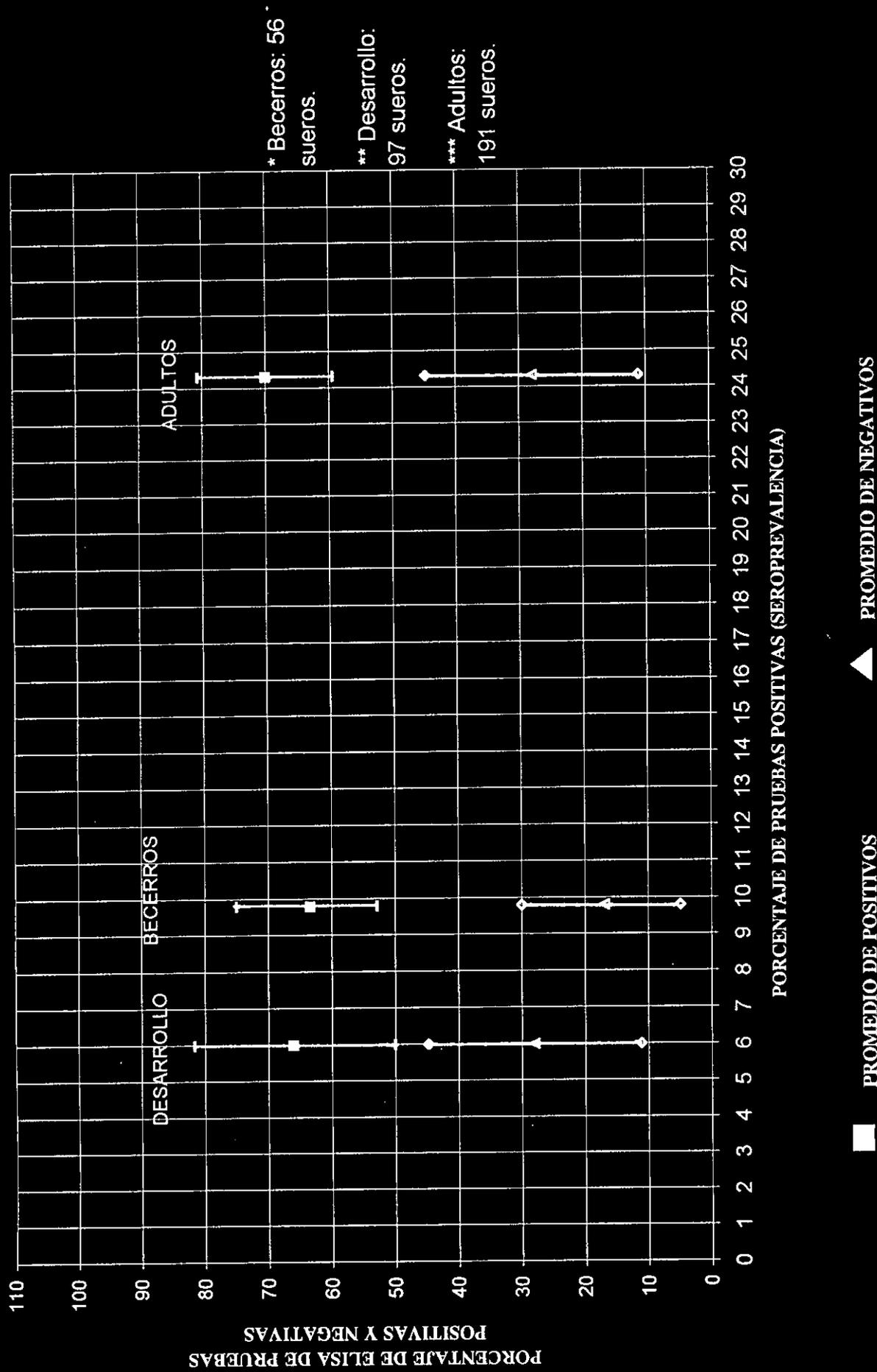


Figura 7. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *B. burgdorferi* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

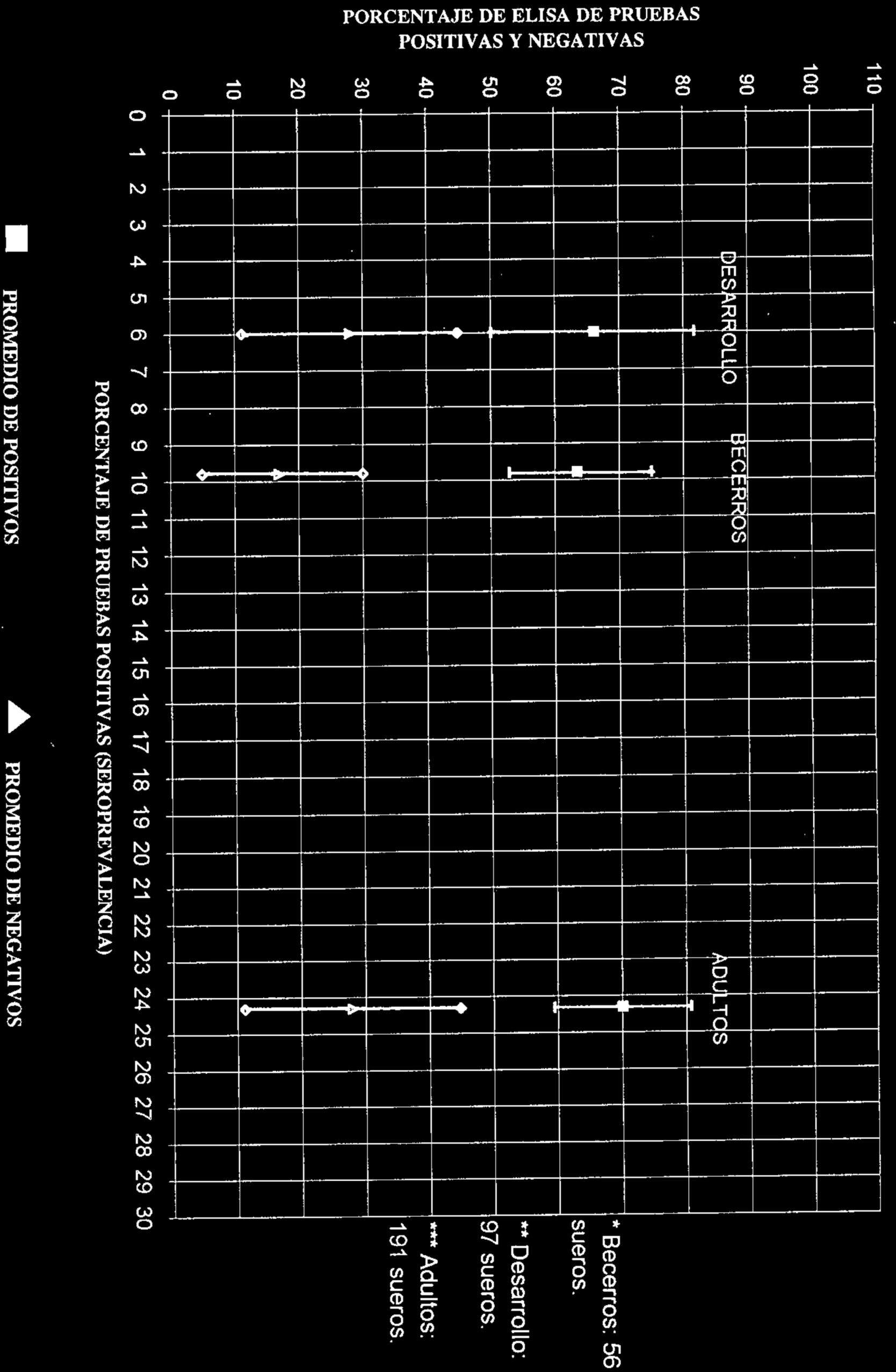


Figura 7. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *B. burgdorferi* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

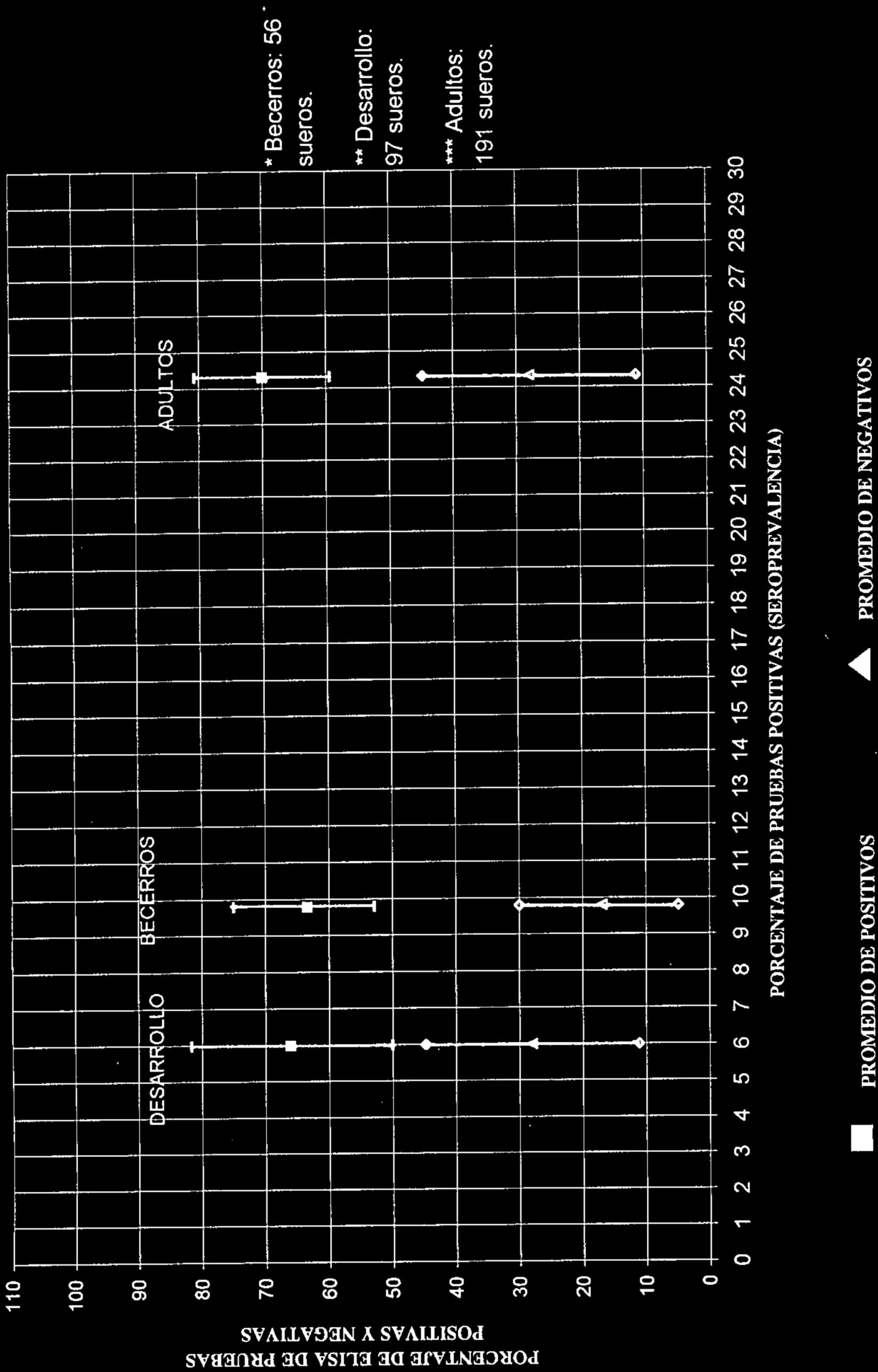


Figura 7. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *B. burgdorferi* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

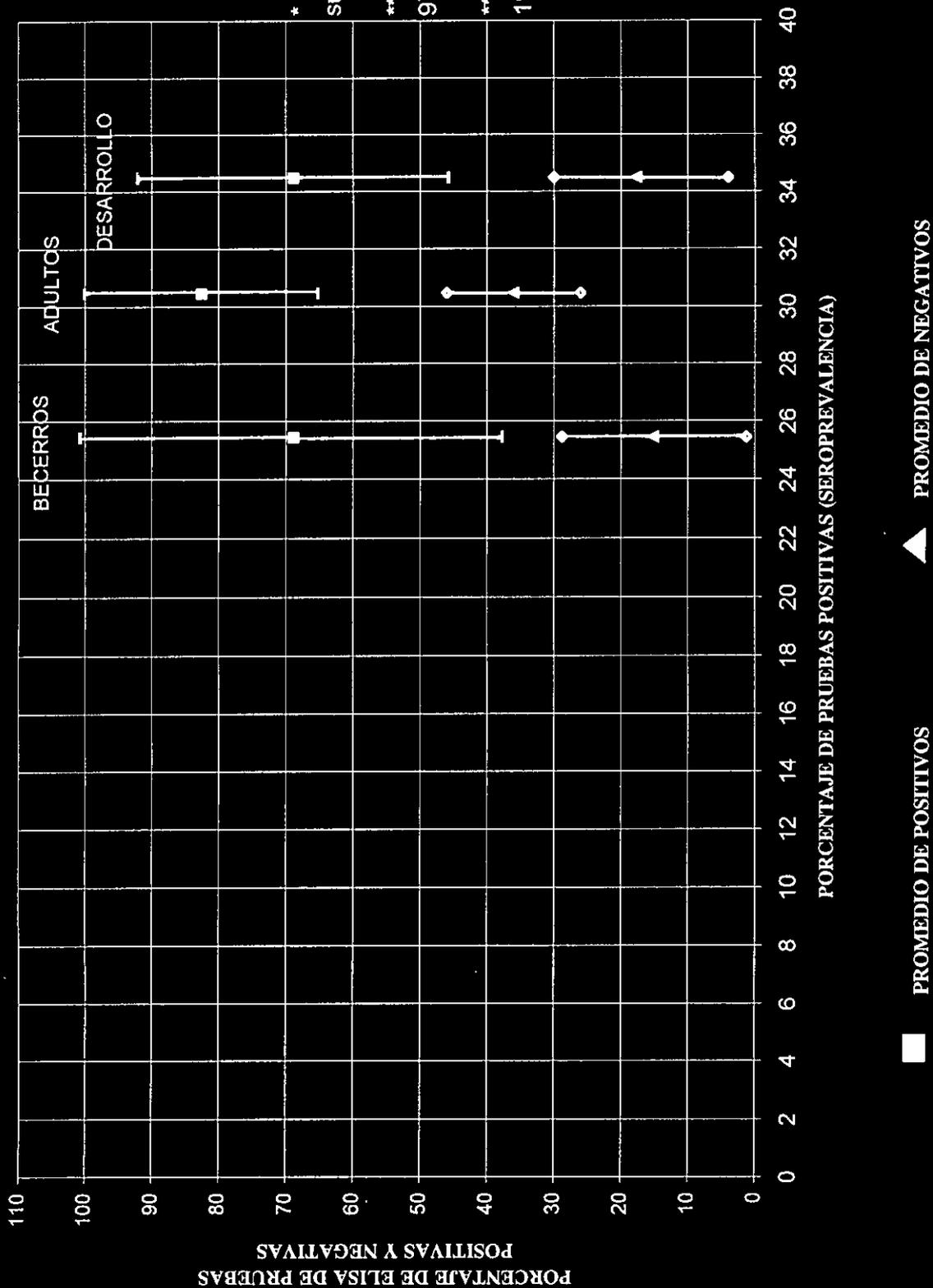


Figura 8. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *L. hardjo* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

107

PORCENTAJE DE ELISA DE PRUEBAS POSITIVAS Y NEGATIVAS

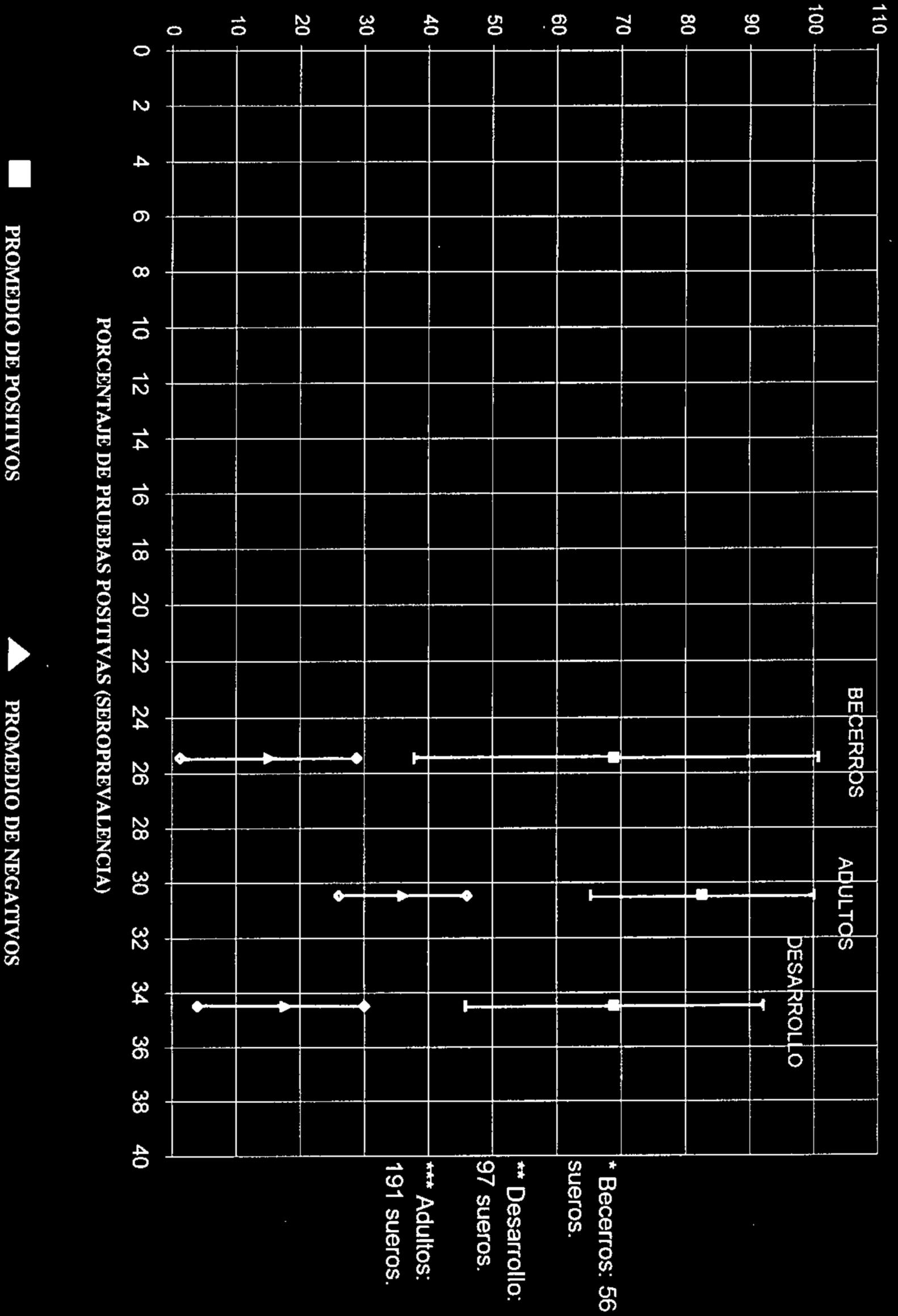


Figura 8. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *L. hardjo* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

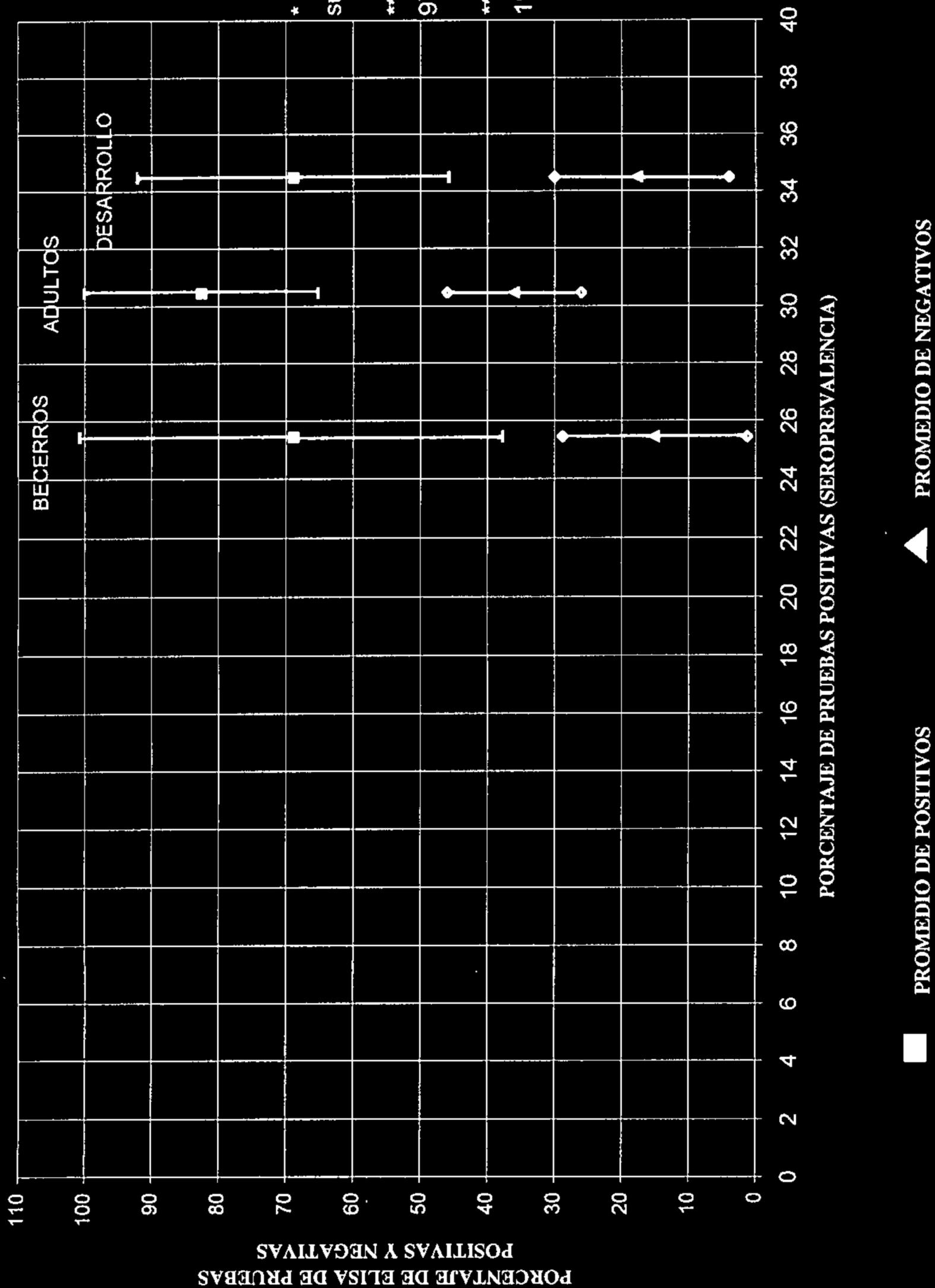
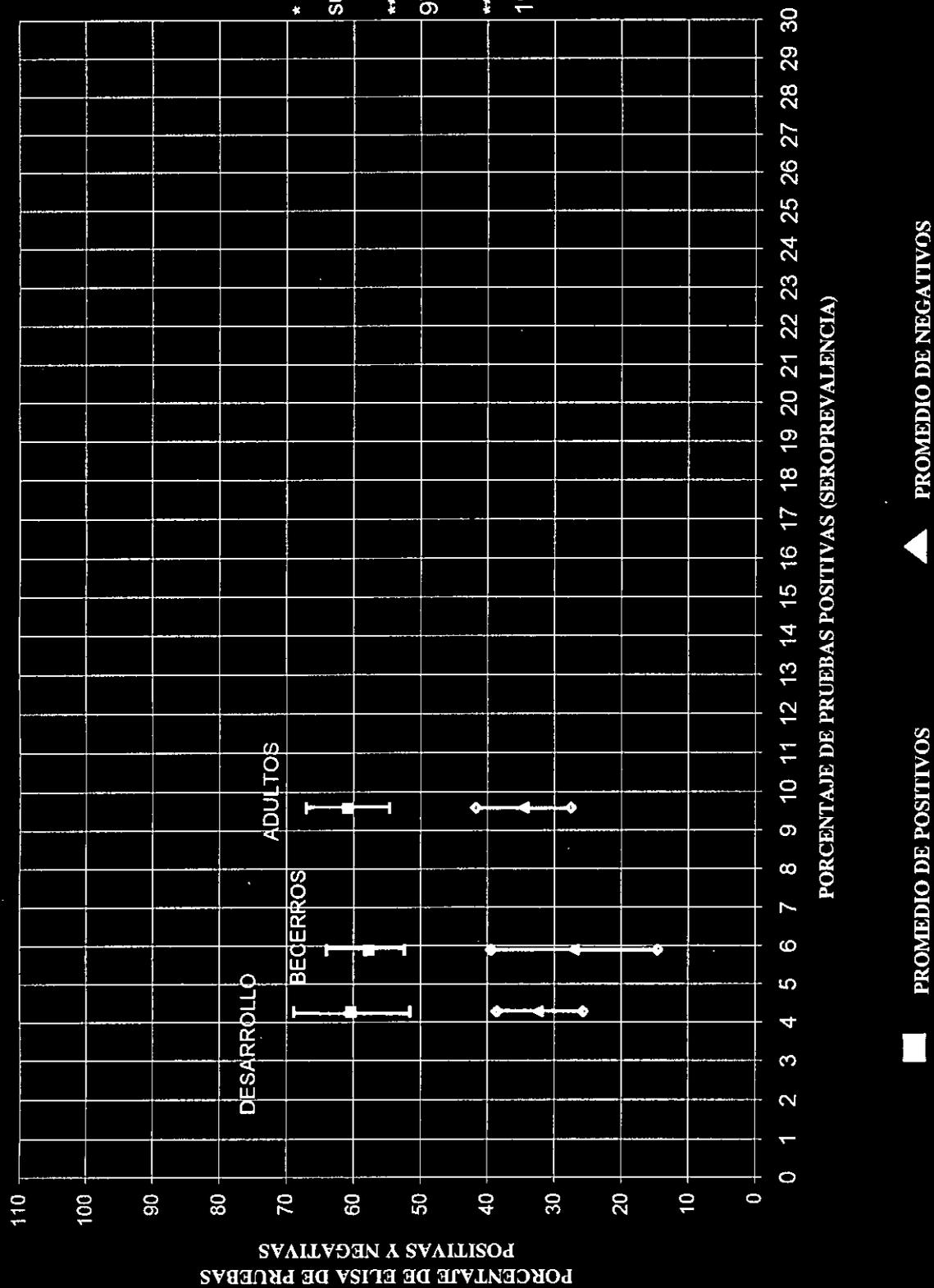


Figura 8. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *L. hardjo* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.



* Becerros: 56 sueros.
 ** Desarrollo: 97 sueros.
 *** Adultos: 191 sueros.

Figura 9. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *M. bovis* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

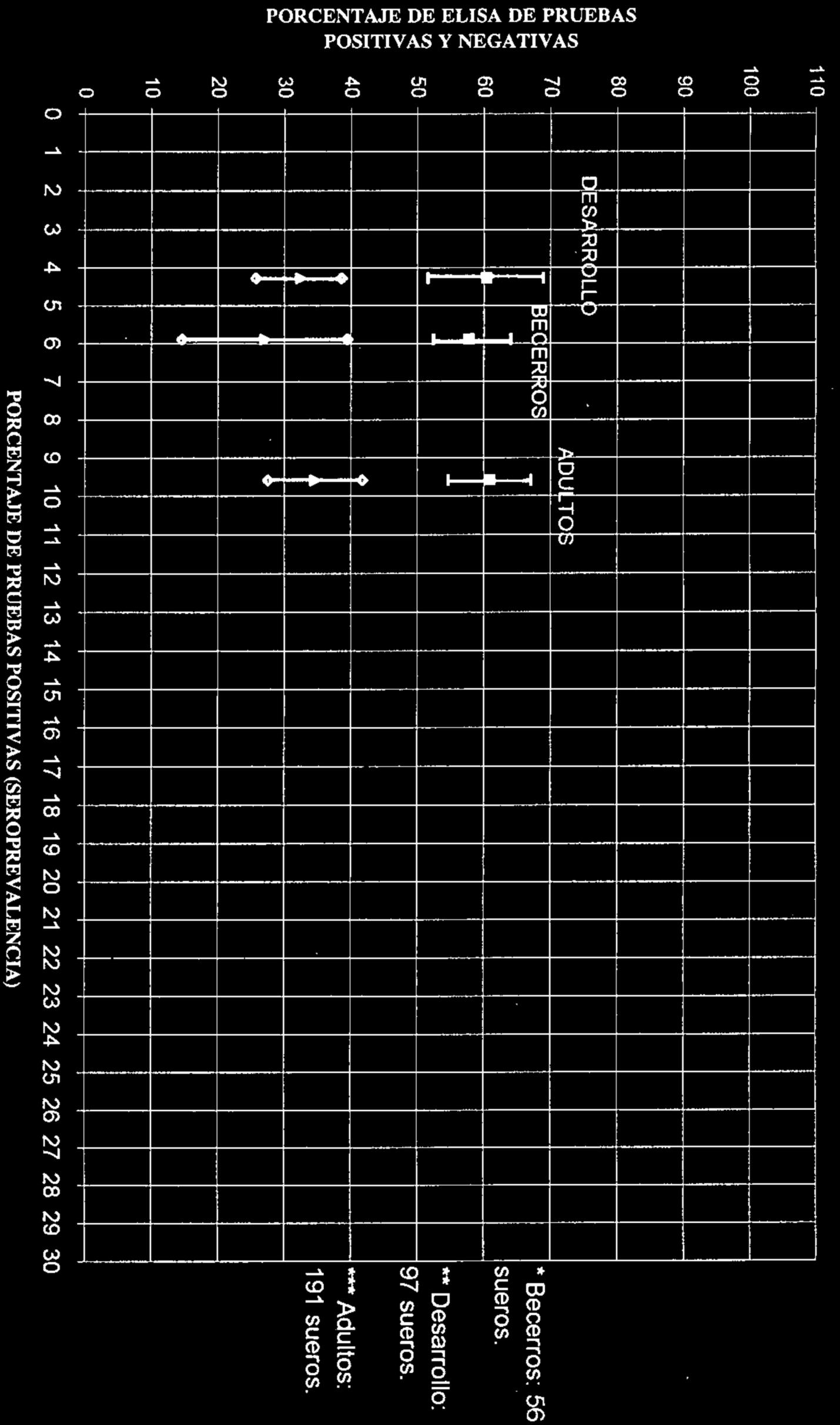


Figura 9. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *M. bovis* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.

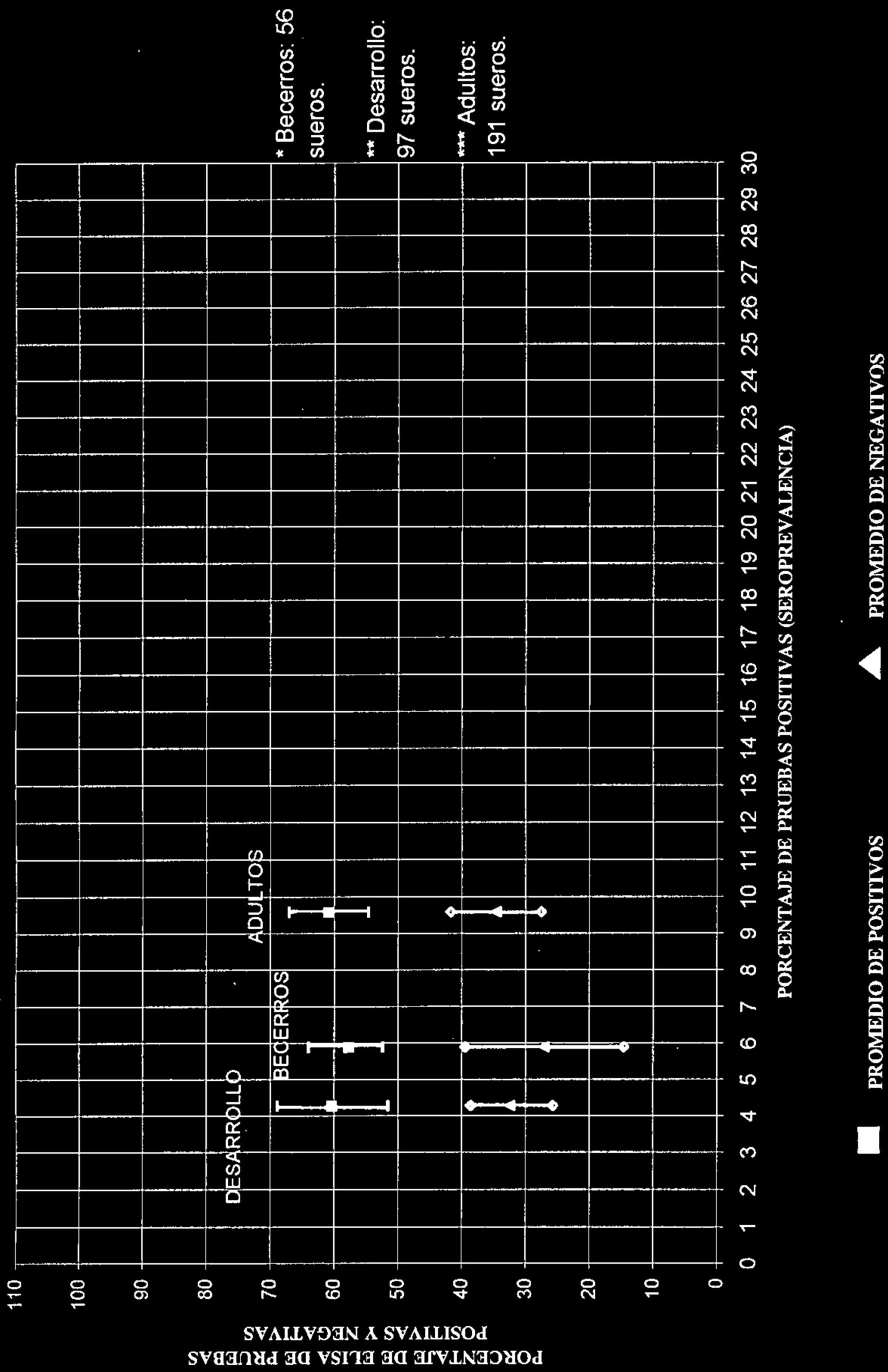
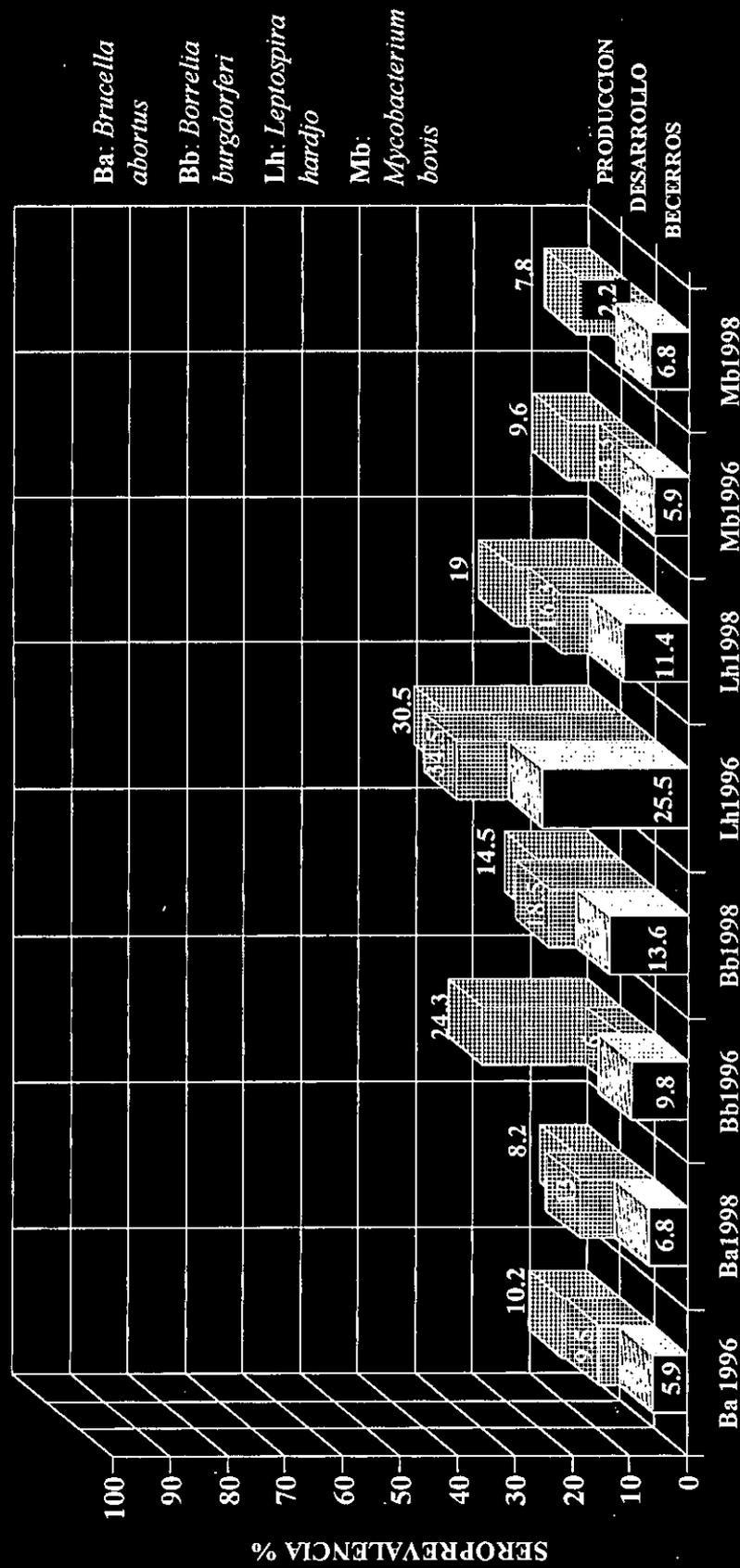


Figura 9. Seroprevalencia y promedio así como desviación estándar de resultados positivos y negativos contra *M. bovis* por ELISA en 344 sueros de bovinos estratificados por edad. Región Frailesca, Chiapas, 1996.



AGENTES ZOONOTICOS

Figura 10. Seroprevalencia de cuatro agentes zoonoticos por estrato de edad en bovinos de la región Frailesca Chiapas. 1996 y 1998.

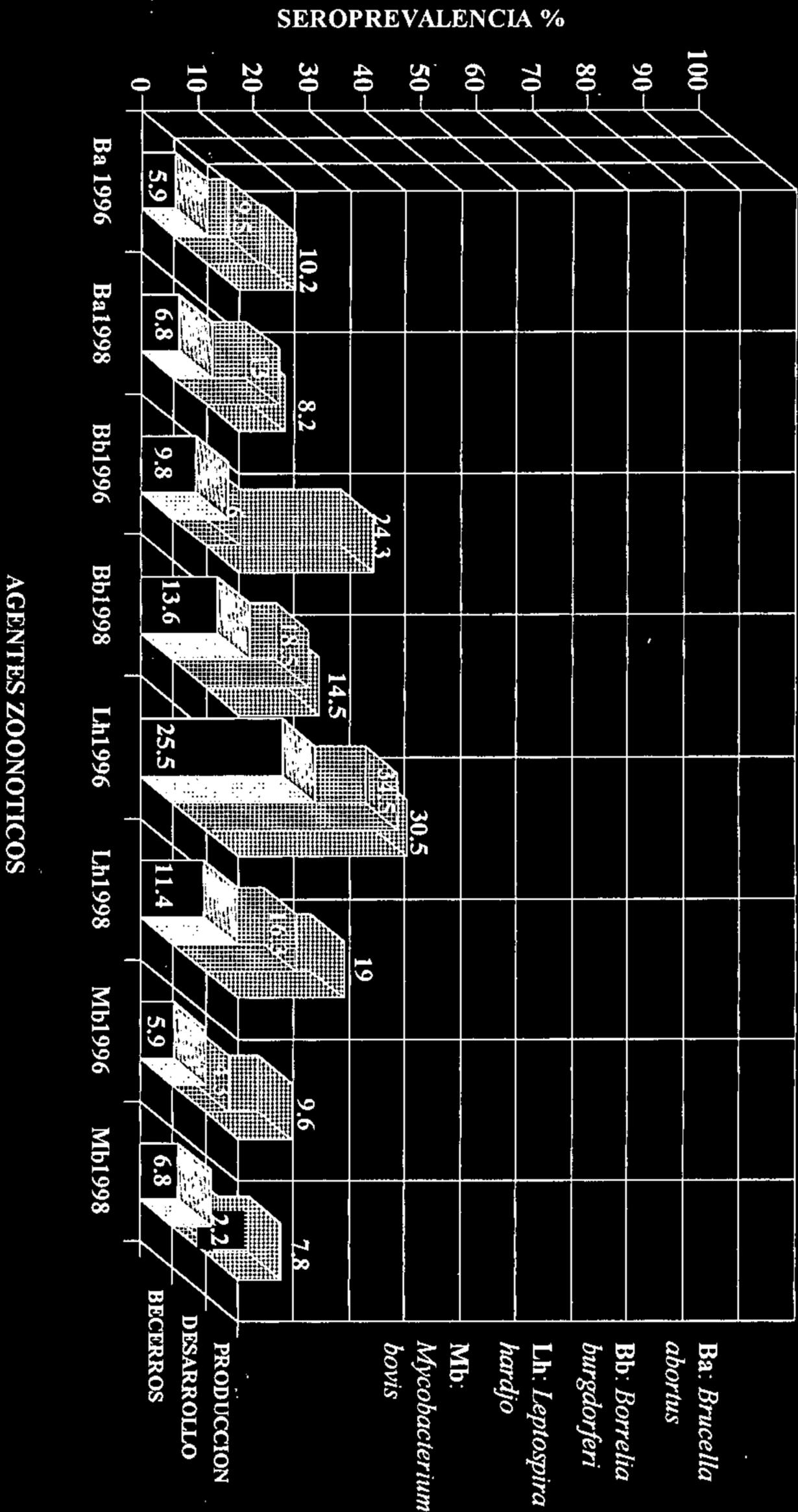
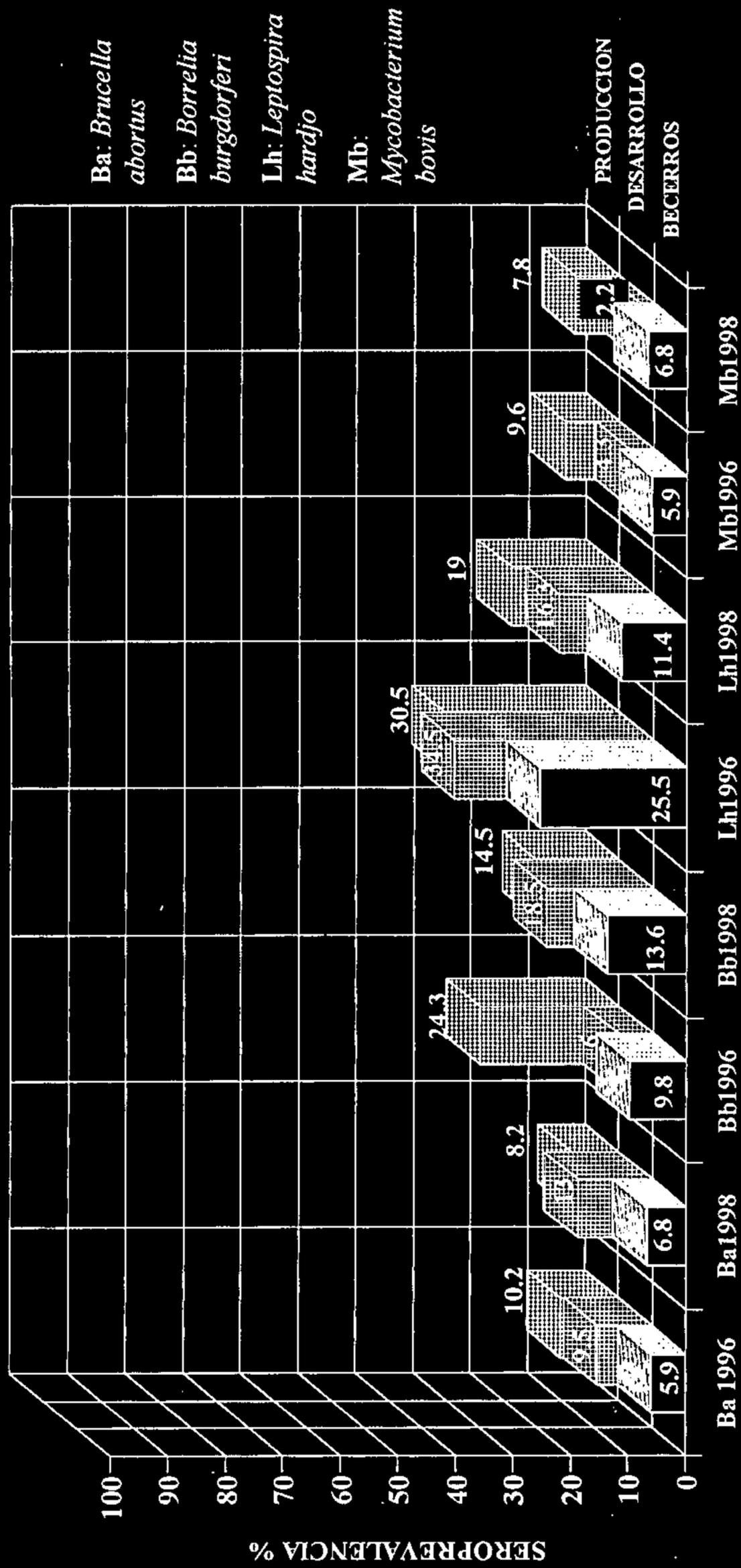


Figura 10. Seroprevalencia de cuatro agentes zoonóticos por estrato de edad en bovinos de la región Frailesca Chiapas. 1996 y 1998.



AGENTES ZOOTOTICOS

Figura 10. Seroprevalencia de cuatro agentes zoonóticos por estrato de edad en bovinos de la región Frailesca Chiapas. 1996 y 1998.

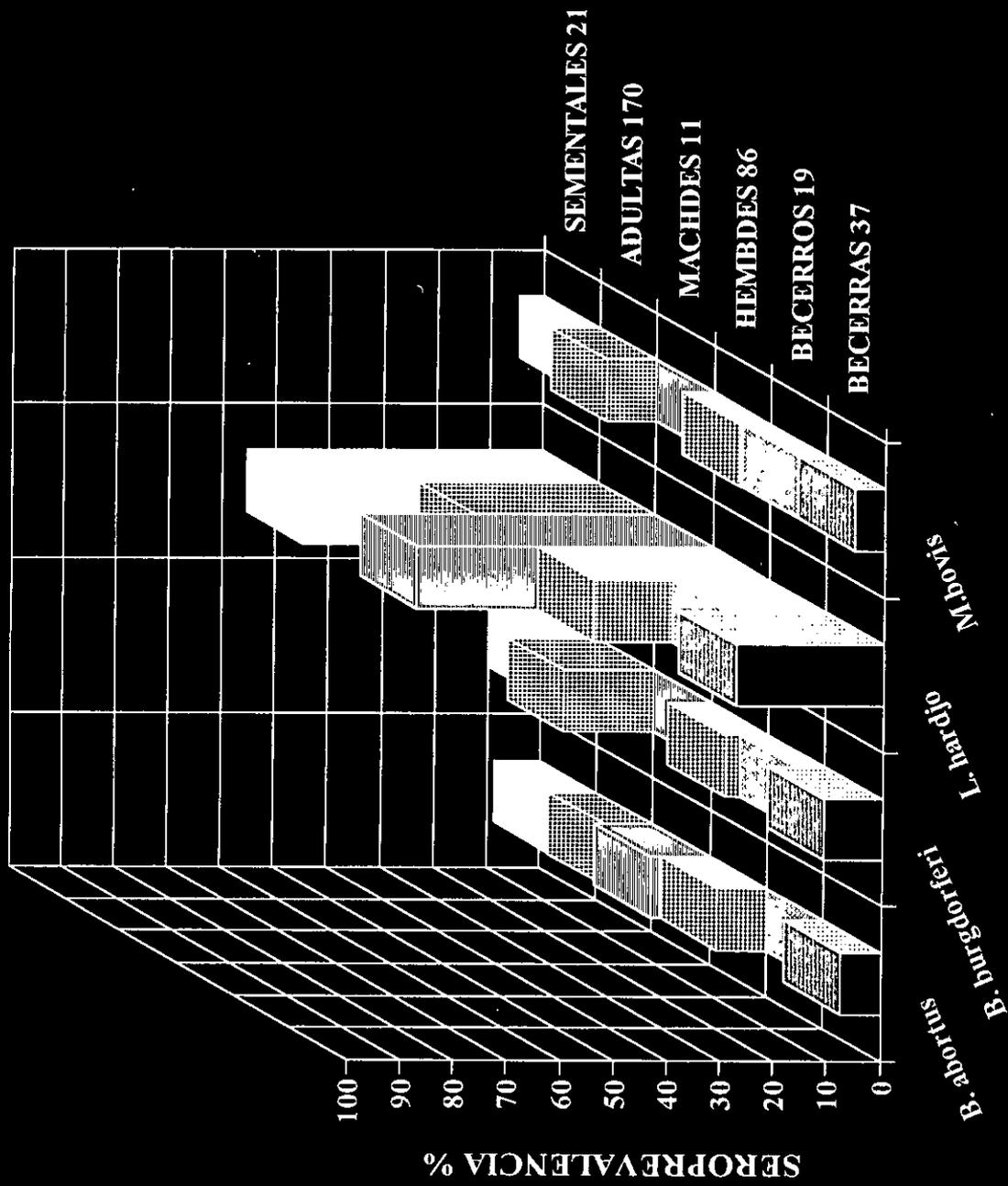


Figura 11. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas en 1996.

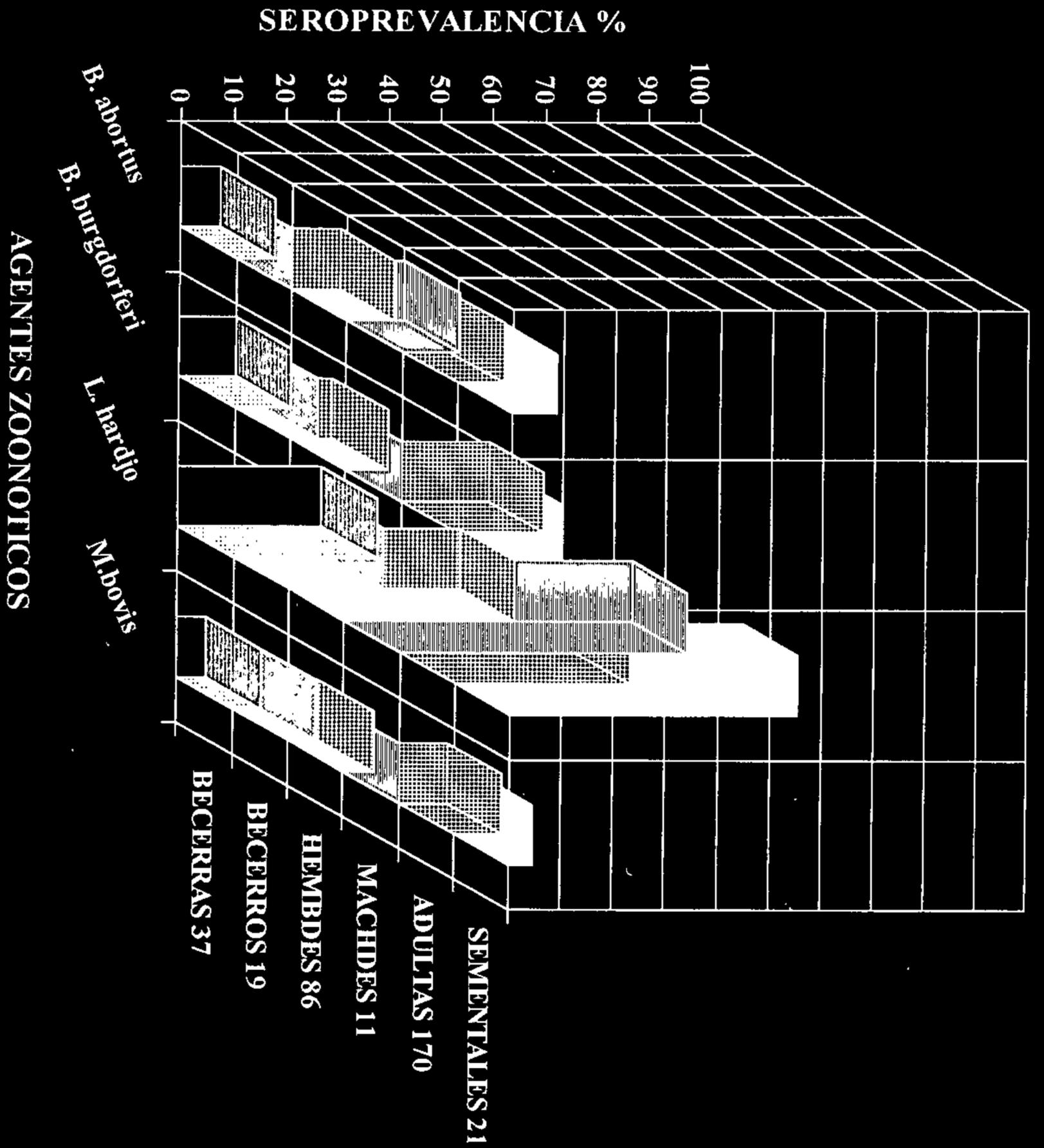


Figura 11. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas en 1996.

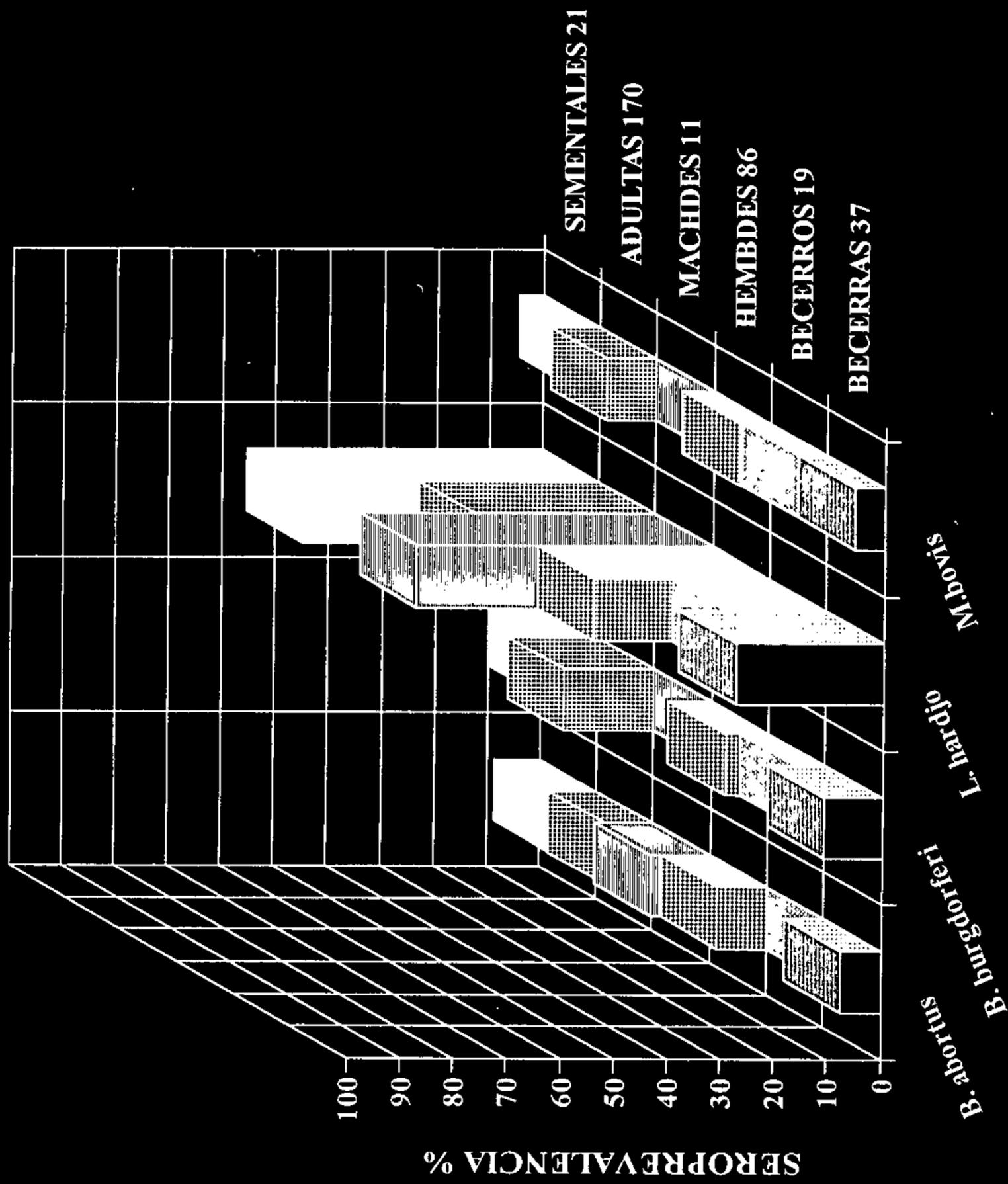


Figura 11. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailasca, Chiapas en 1996.

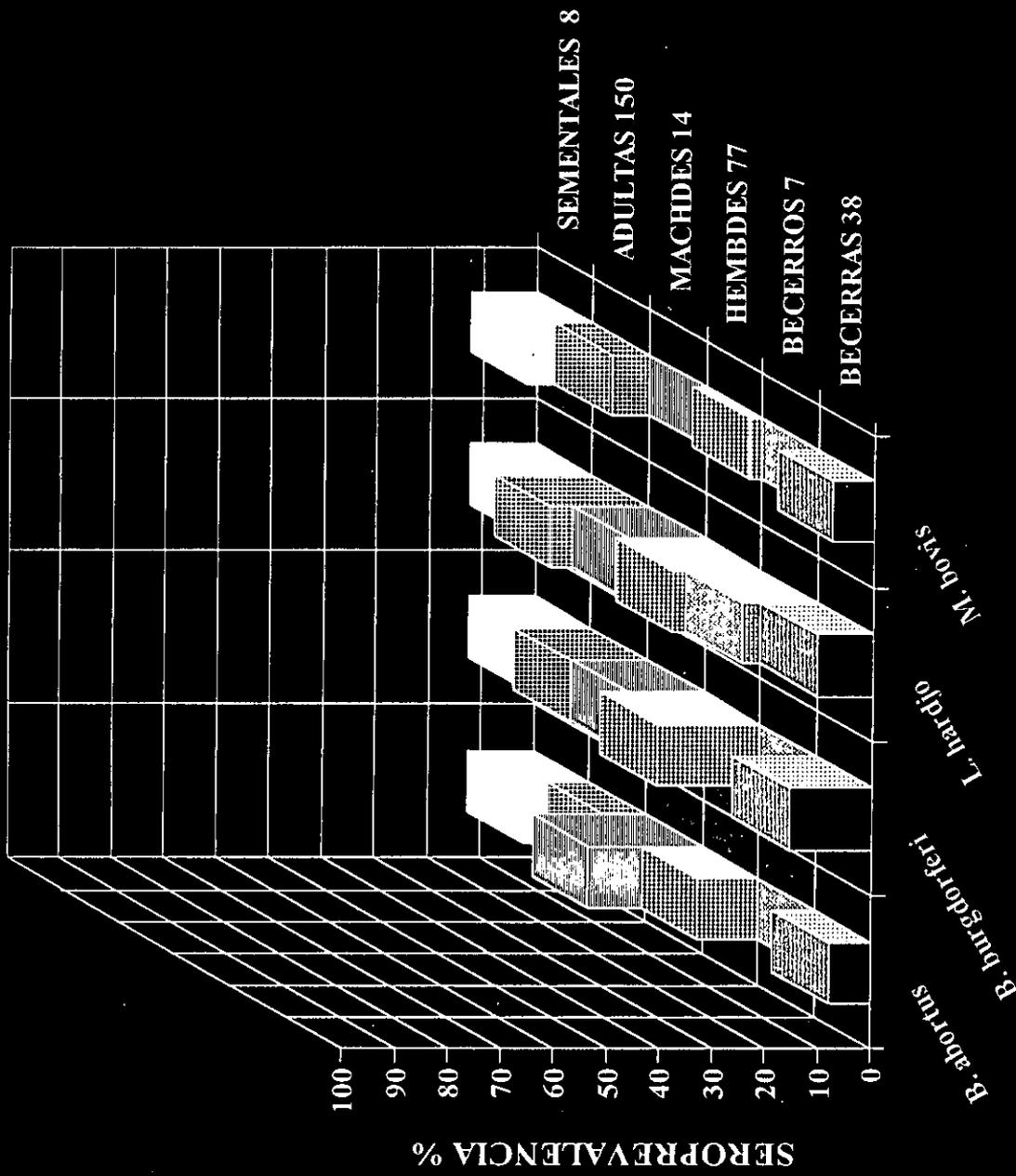


Figura 12. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas en 1998.

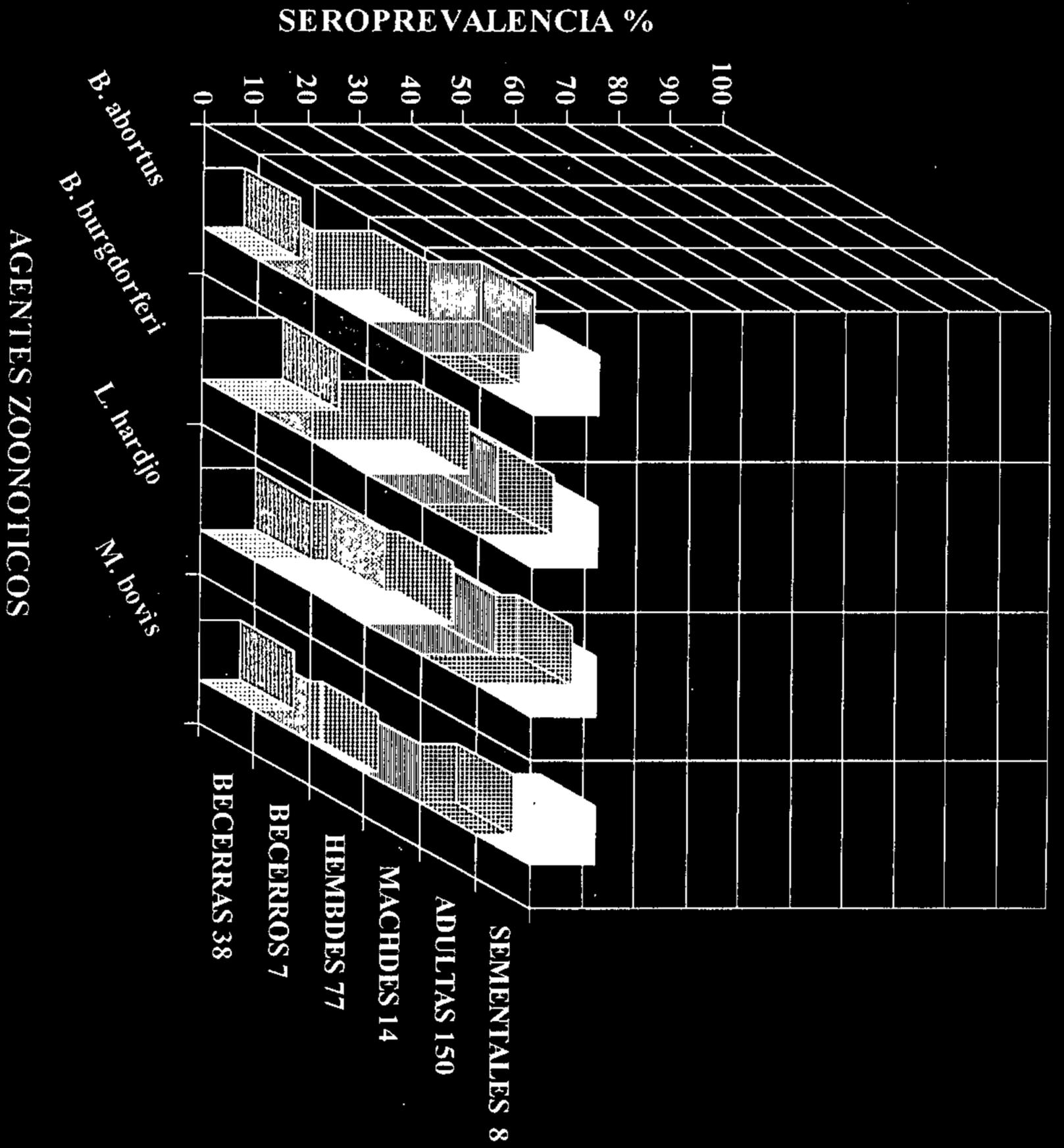
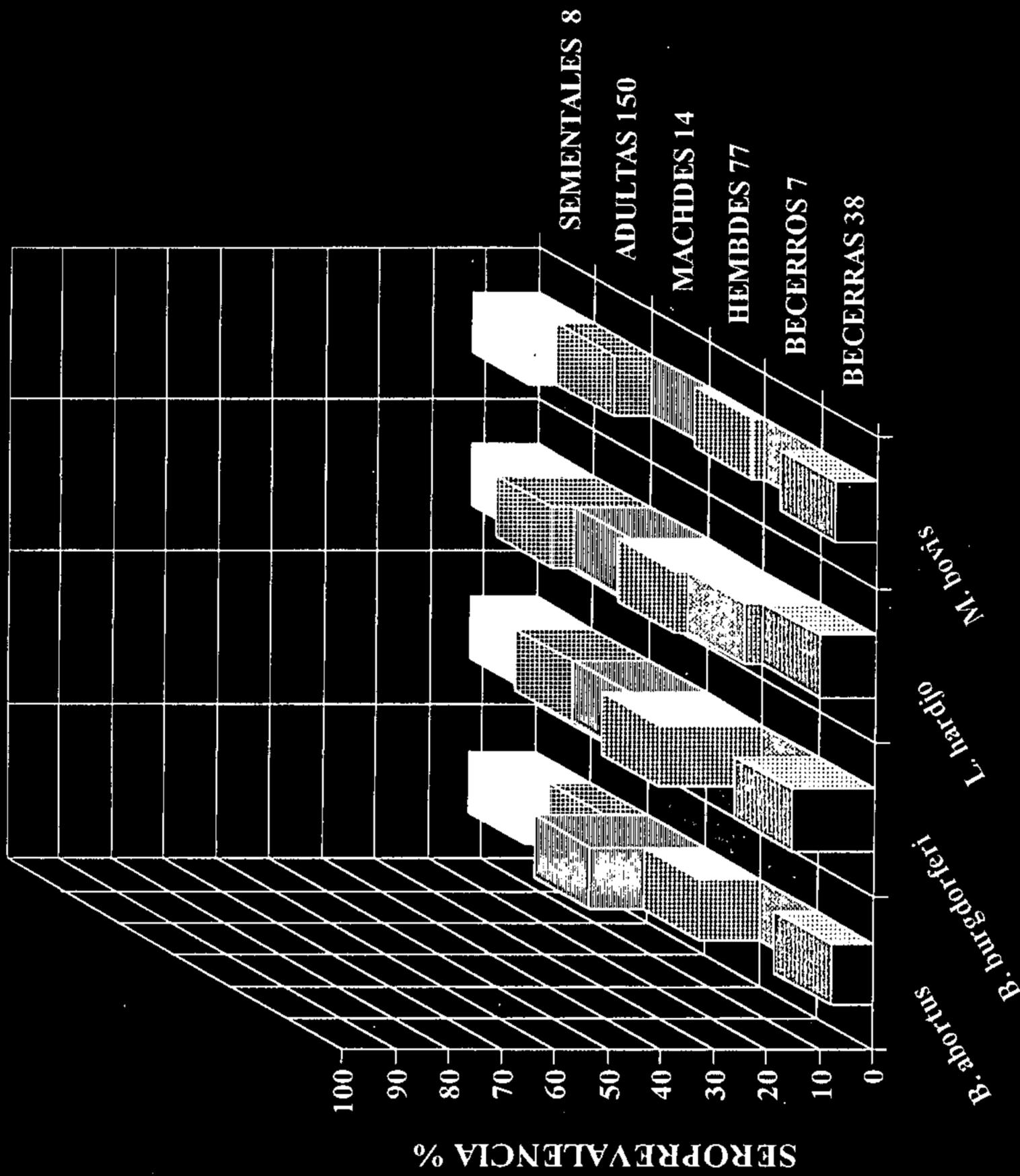


Figura 12. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas en 1998.



AGENTES ZOONÓTICOS

Figura 12. Comparación de la seroprevalencia por edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas en 1998.

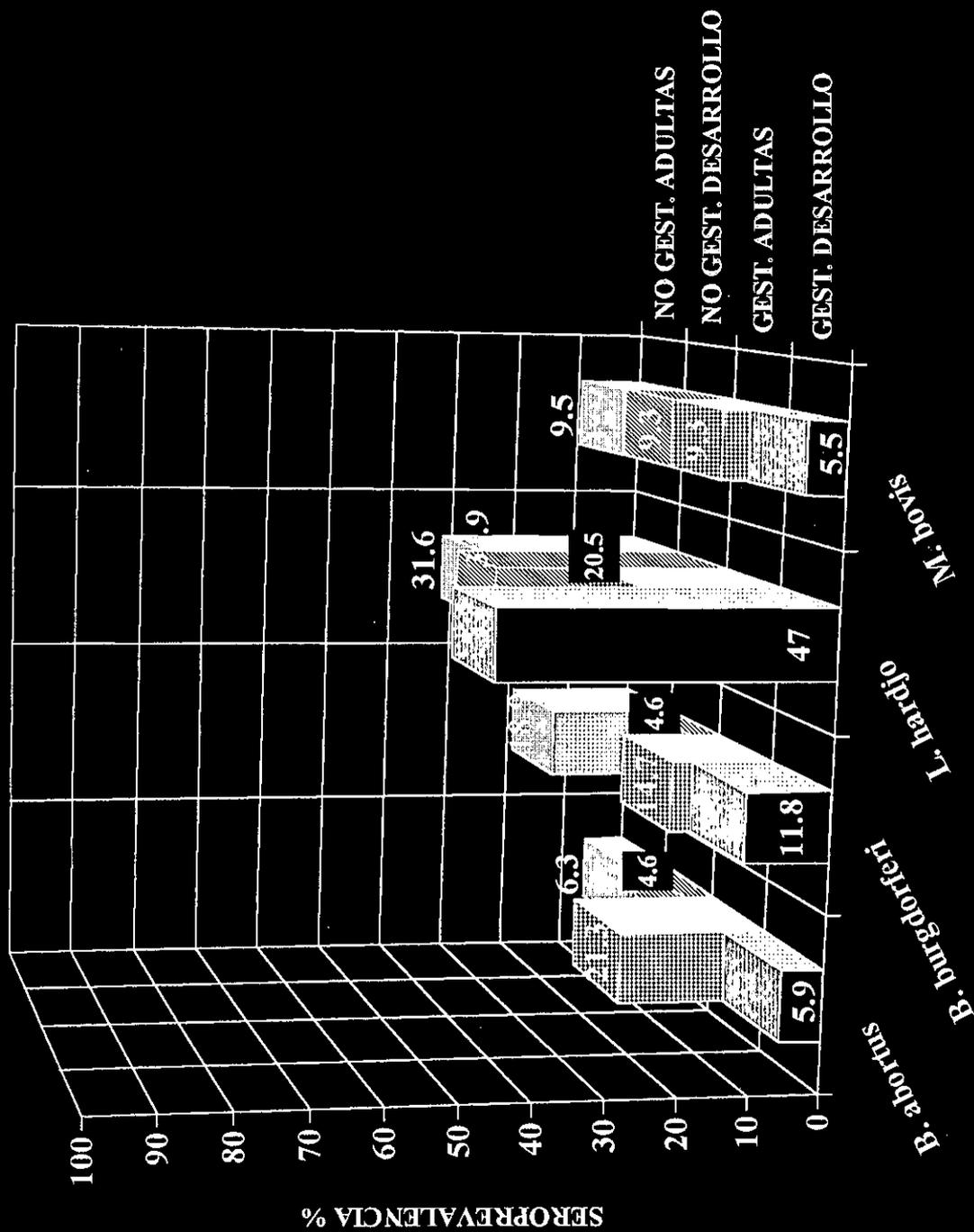


Figura 13. Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Frailesca, Chiapas en 1996.

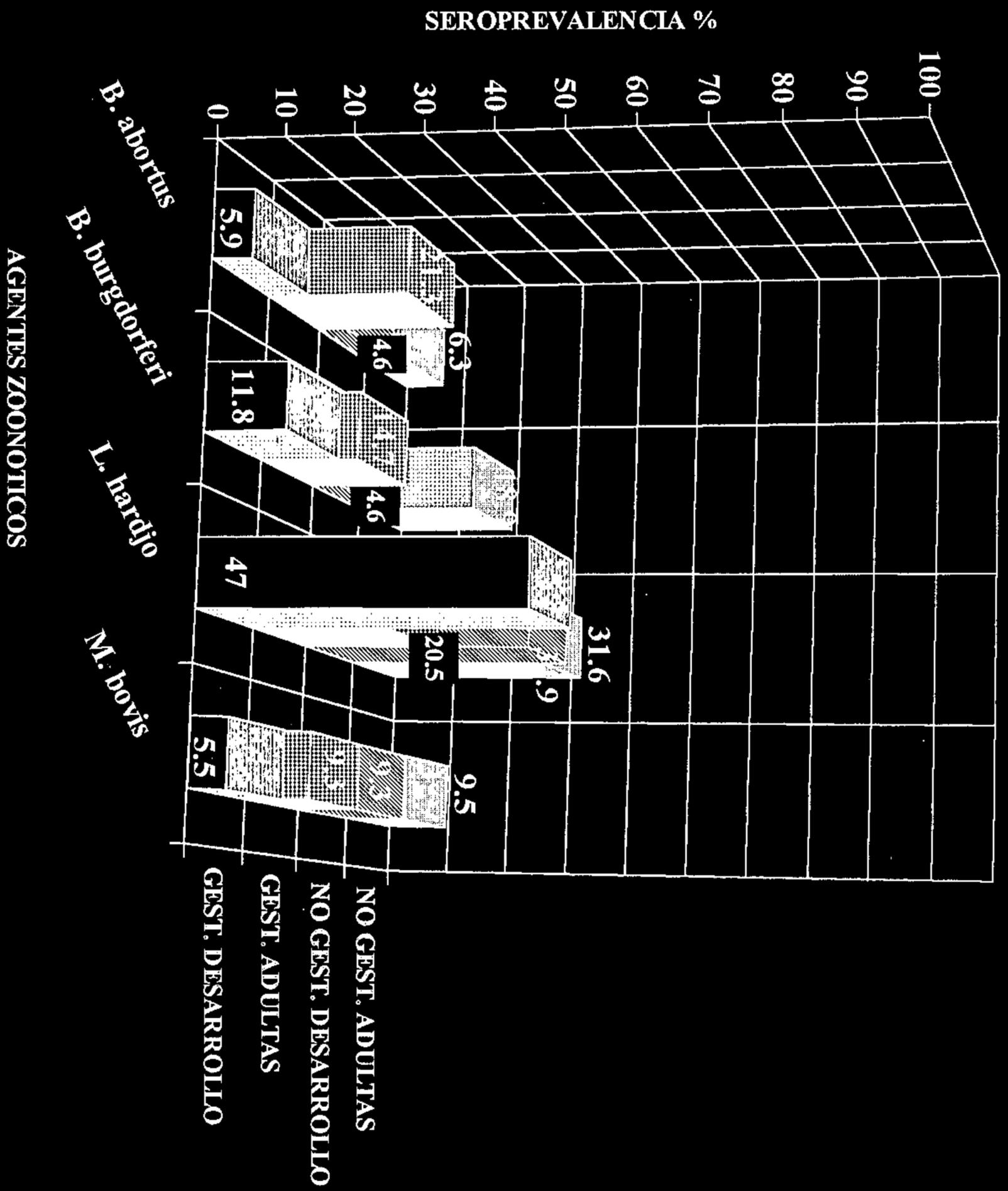


Figura 13. Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Frailesca, Chiapas en 1996.

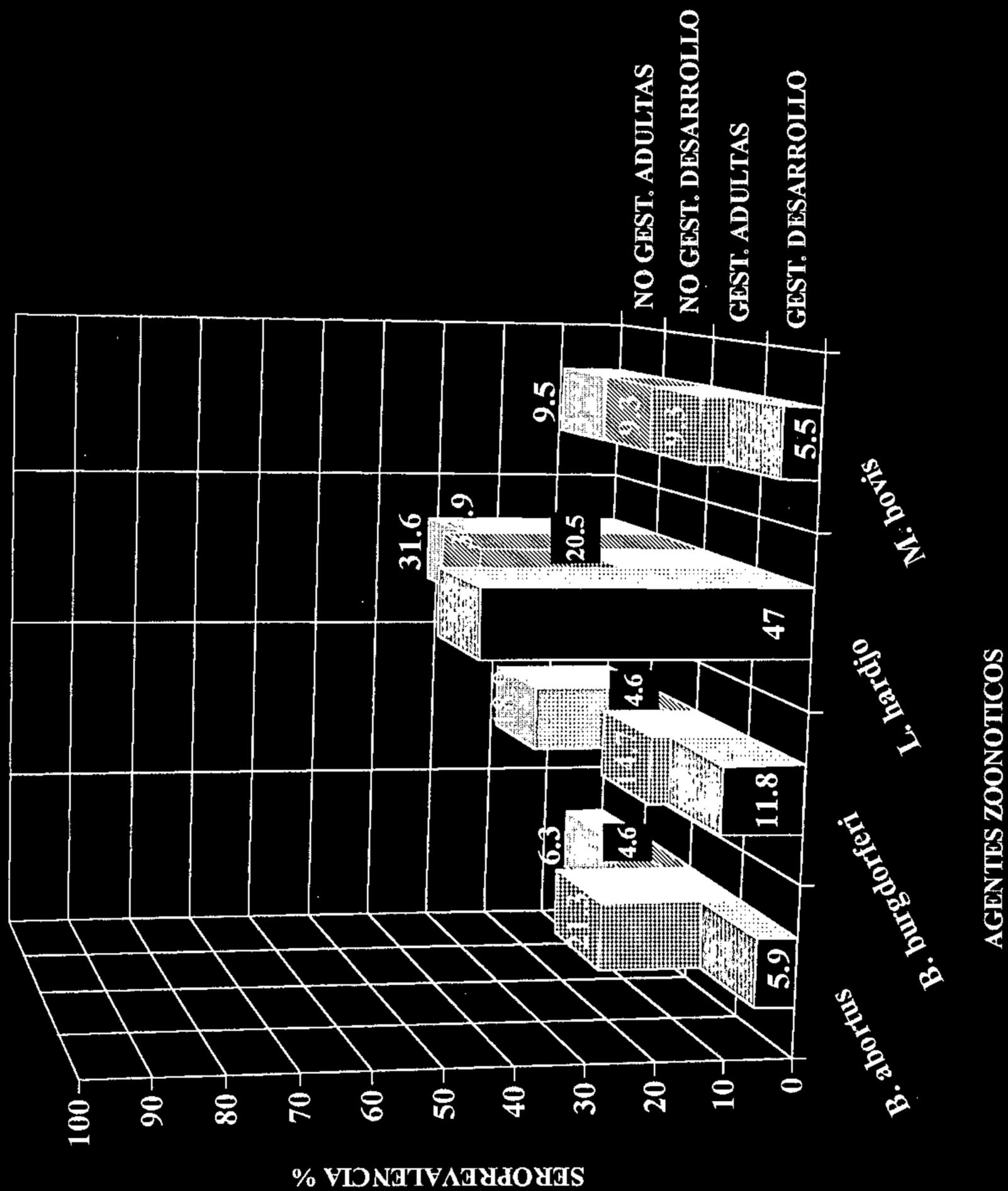


Figura 13. Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Frailesca, Chiapas en 1996.

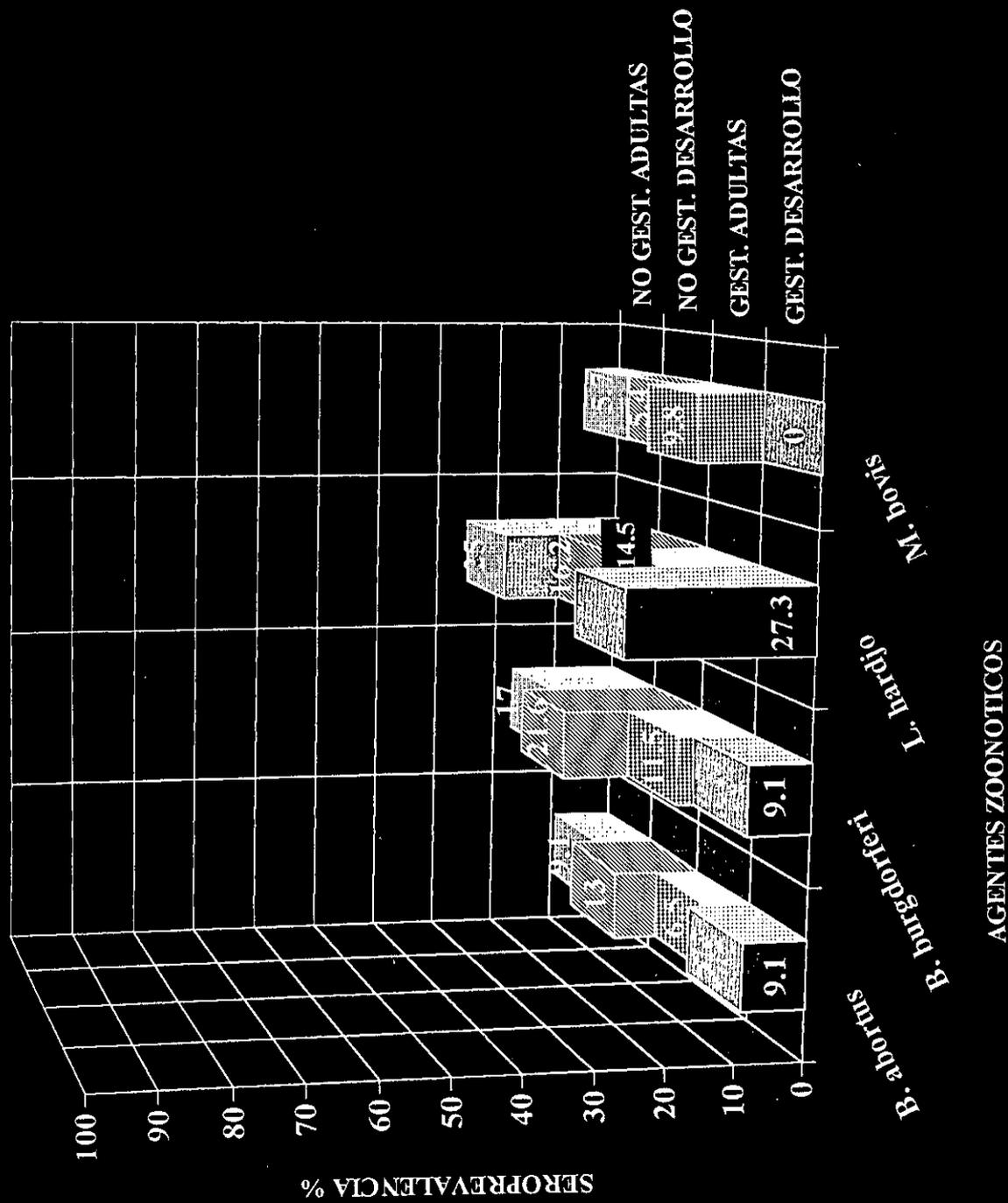


Figura 14. Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Frailesca, Chiapas en 1998.

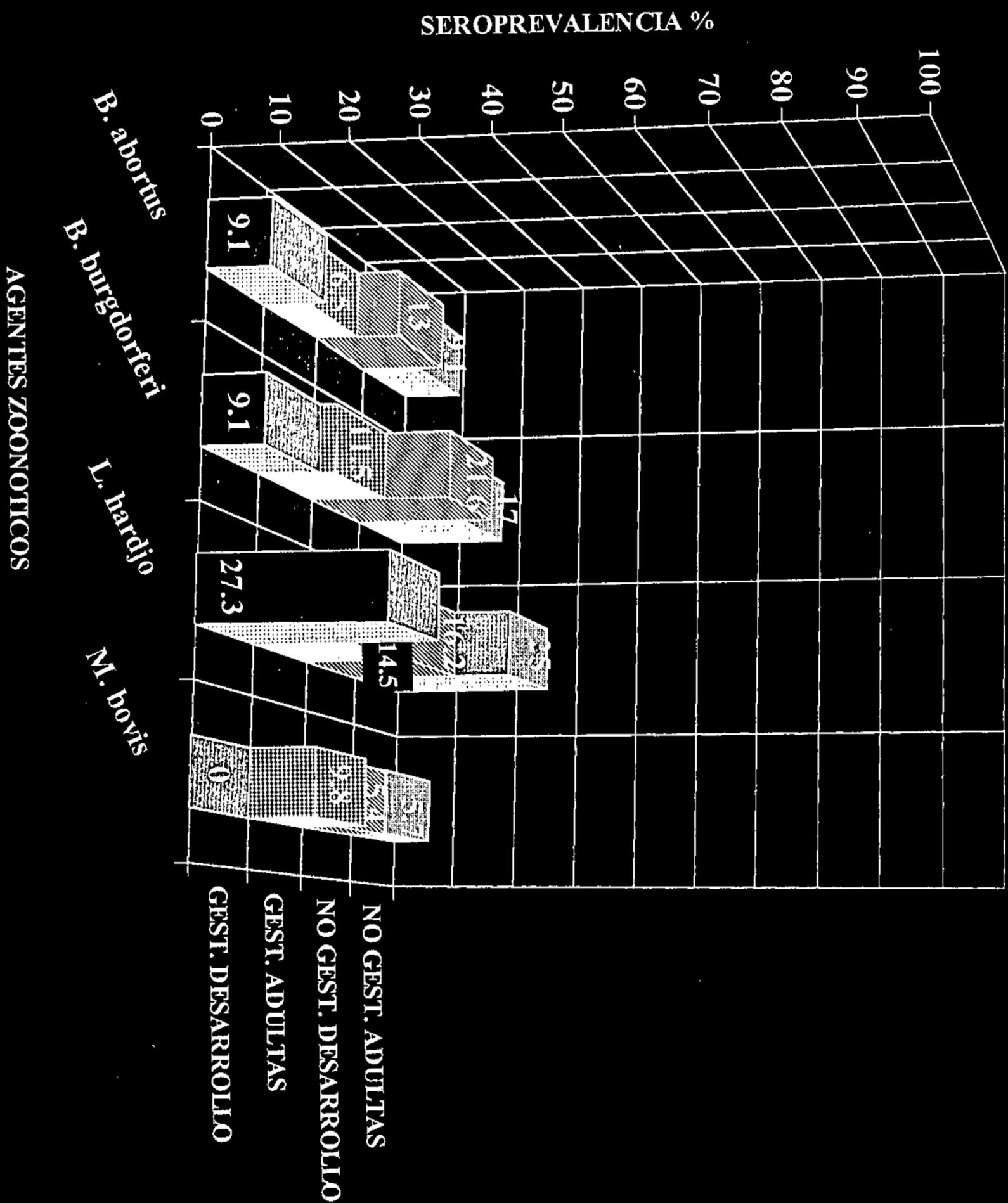


Figura 14. Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Frailesca, Chiapas en 1998.

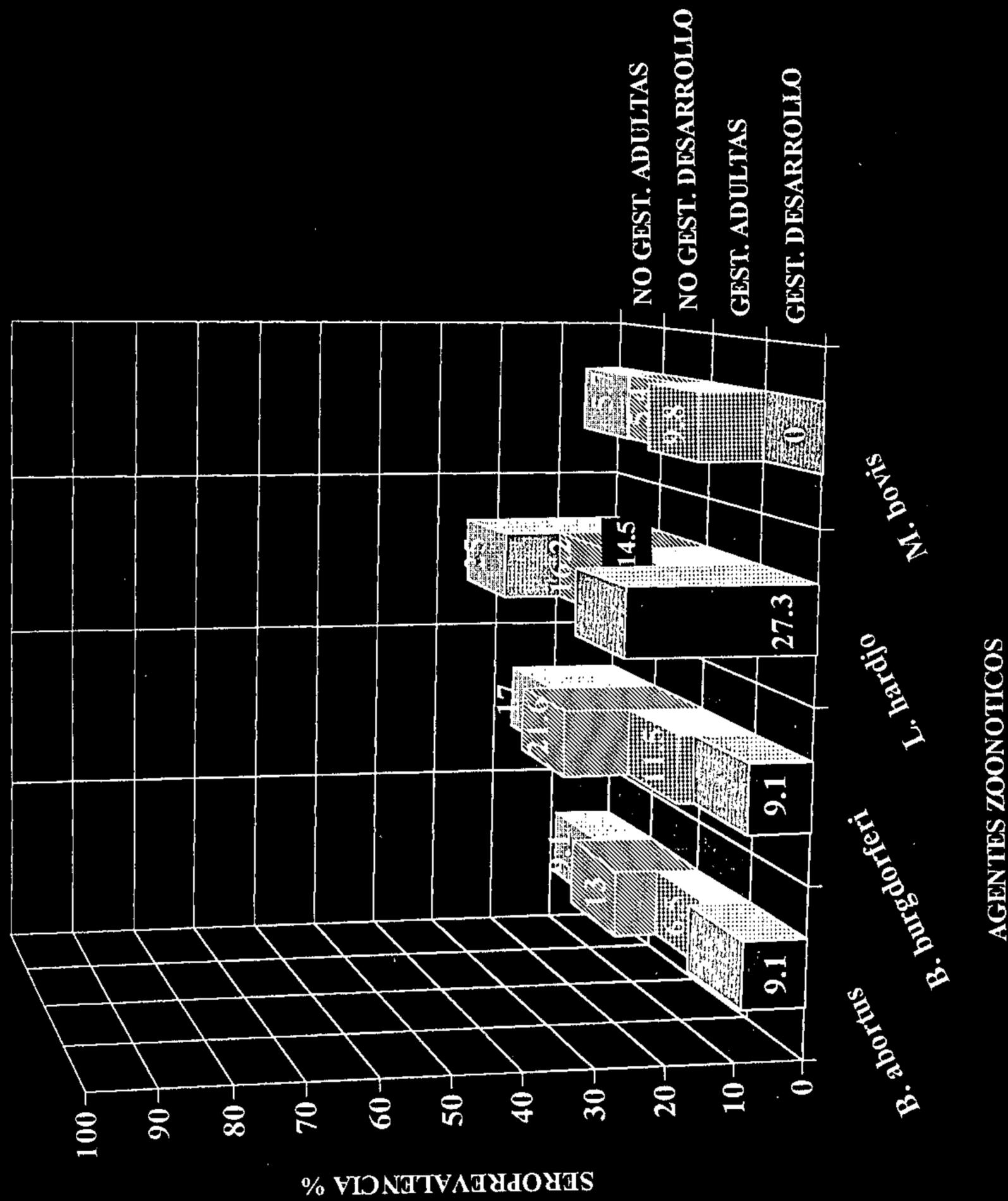


Figura 14. Comparación de la seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos entre hembras gestantes y no gestantes de la región Fraijesa, Chiapas en 1998.



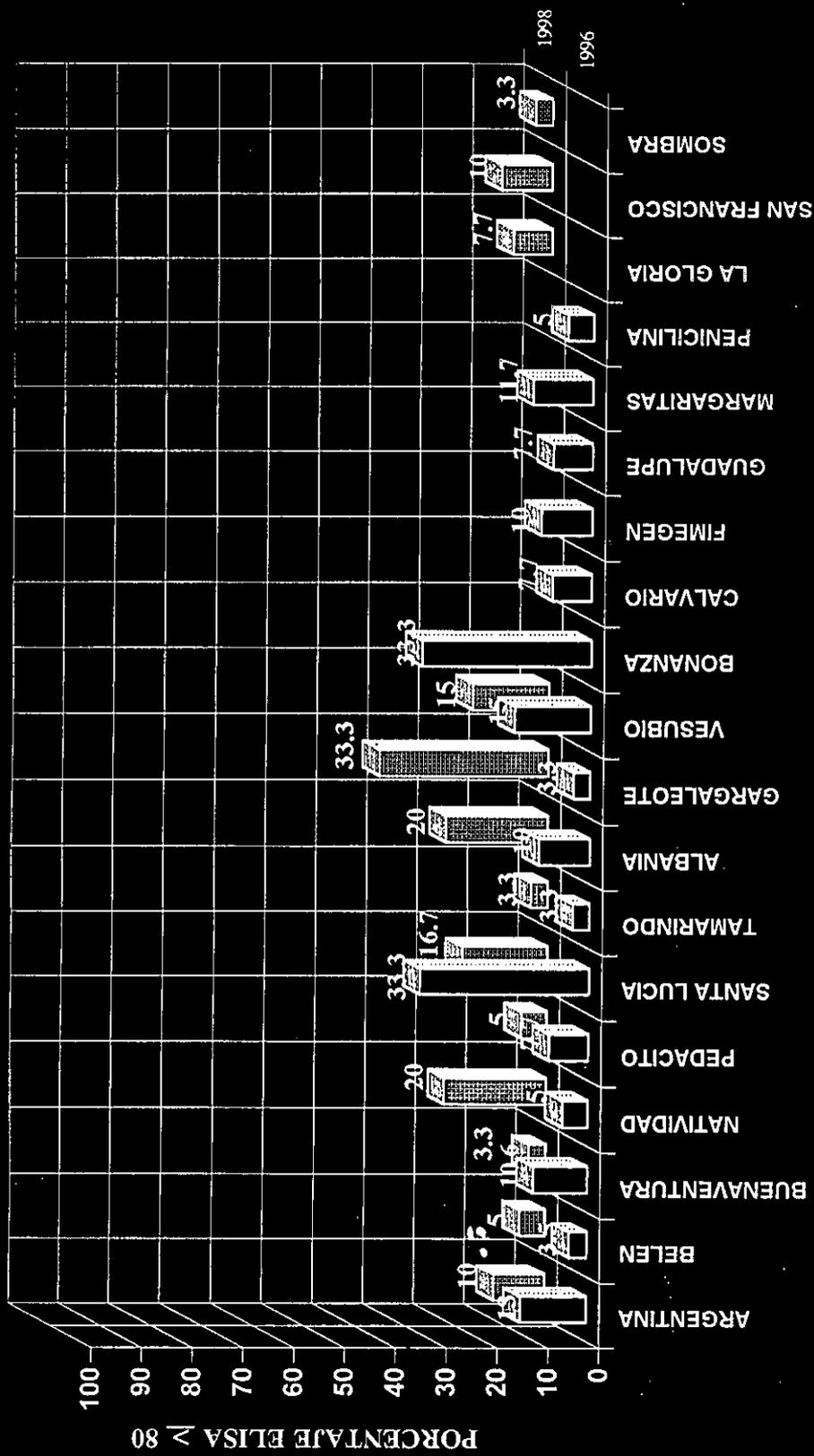
Figura 15. Frecuencia de bovinos por estrato de edad que presentaron un porcentaje de ELISA ≥ 80 contra el antígeno de la rabia. Región Frailesca, Chiapas 1996 y 1998.



Figura 15. Frecuencia de bovinos por estrato de edad que presentaron un porcentaje de ELISA \geq 80 contra el antígeno de la rabia. Región Frailesca, Chiapas 1996 y 1998.



Figura 15. Frecuencia de bovinos por estrato de edad que presentaron un porcentaje de ELISA >80 contra el antígeno de la rabia. Región Frailesca, Chiapas 1996 y 1998.



EXPLOTACION

Figura 16. Frecuencia de bovinos por explotación que obtuvieron un porcentaje de ELISA ≥ 80 contra el virus de la rabia . Región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998.

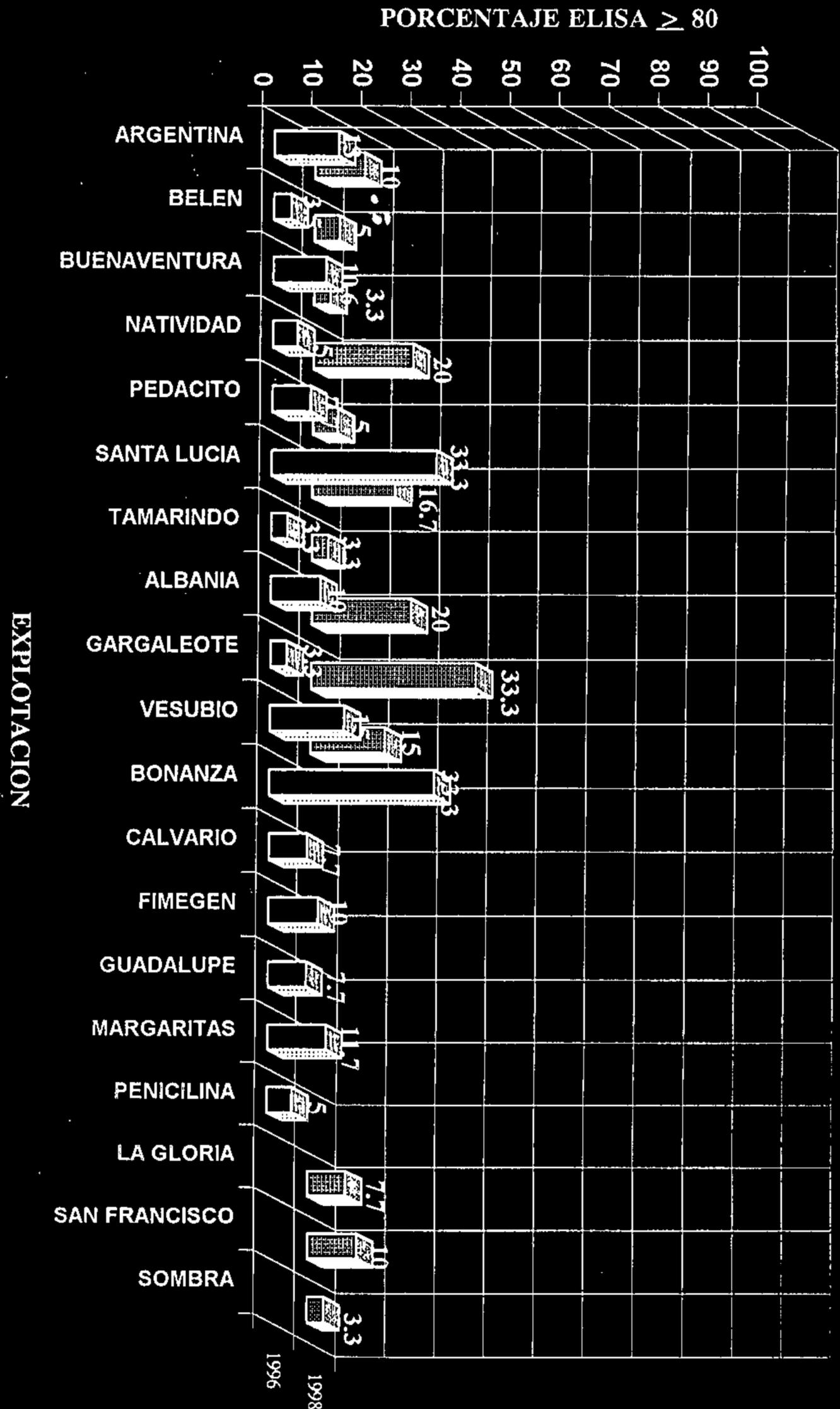


Figura 16. Frecuencia de bovinos por explotación que obtuvieron un porcentaje de ELISA \geq 80 contra el virus de la rabia. Región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998.

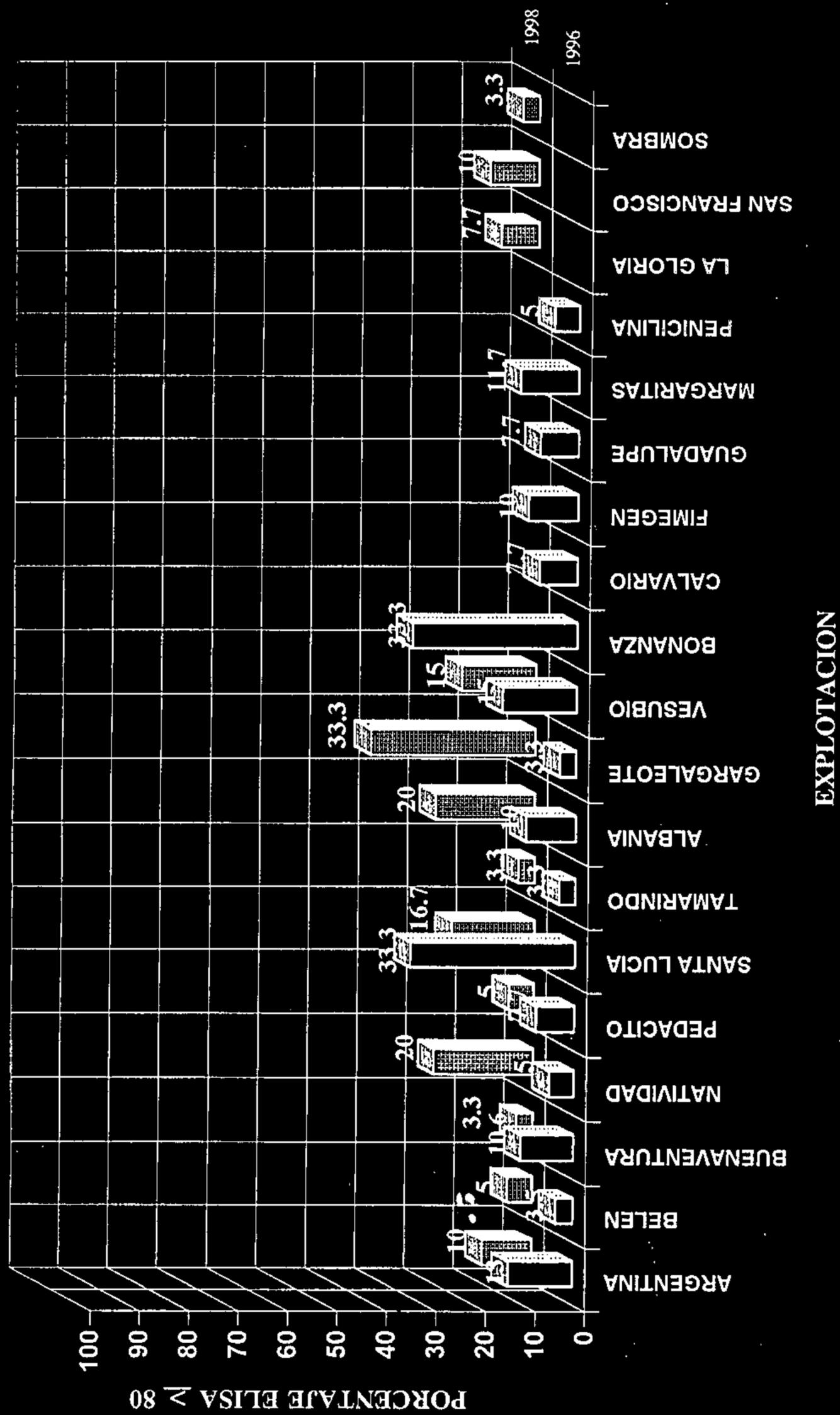


Figura 16. Frecuencia de bovinos por explotación que obtuvieron un porcentaje de ELISA \geq 80 contra el virus de la rabia . Región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998.

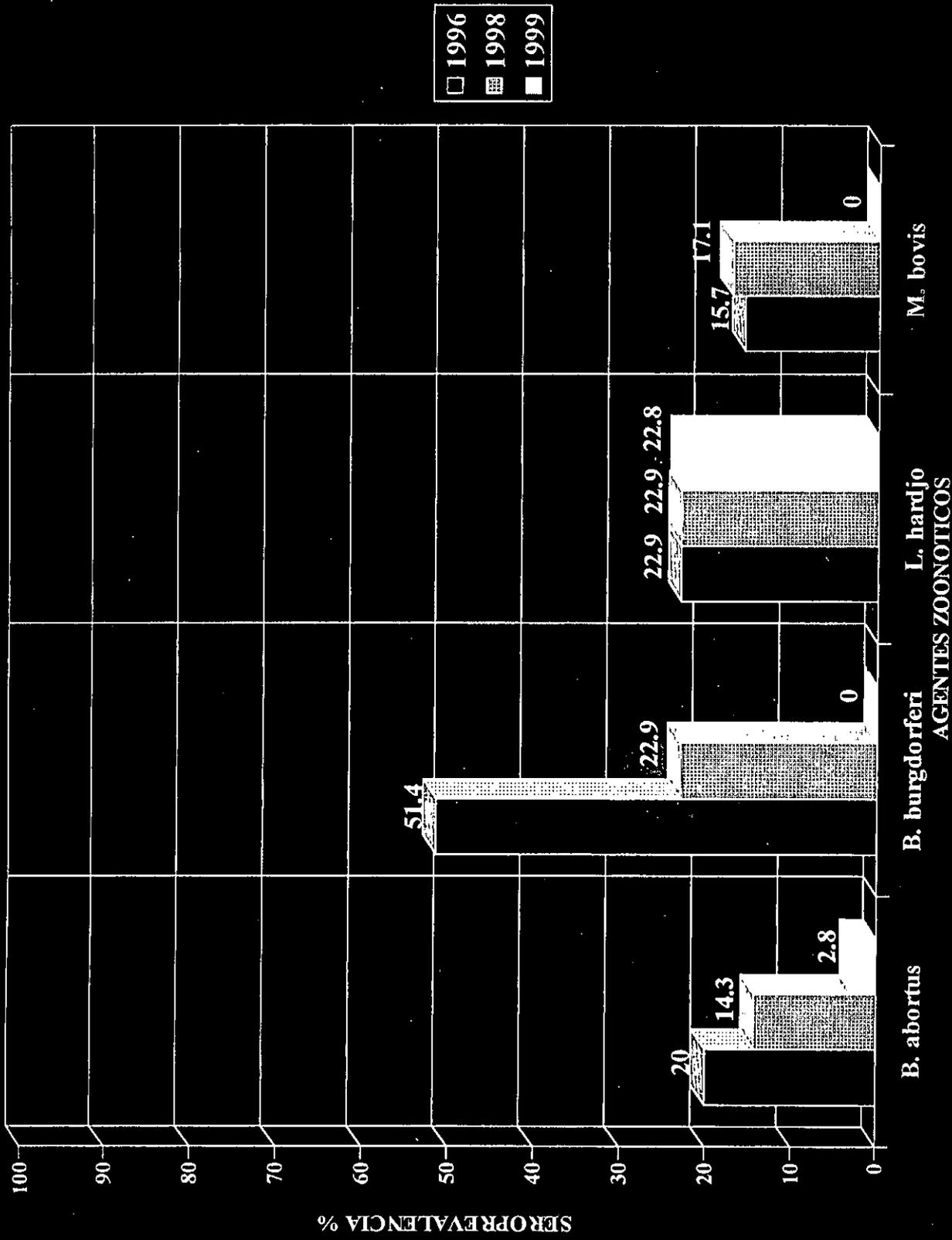


Figura 17. Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en 35 bovinos de doble propósito de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

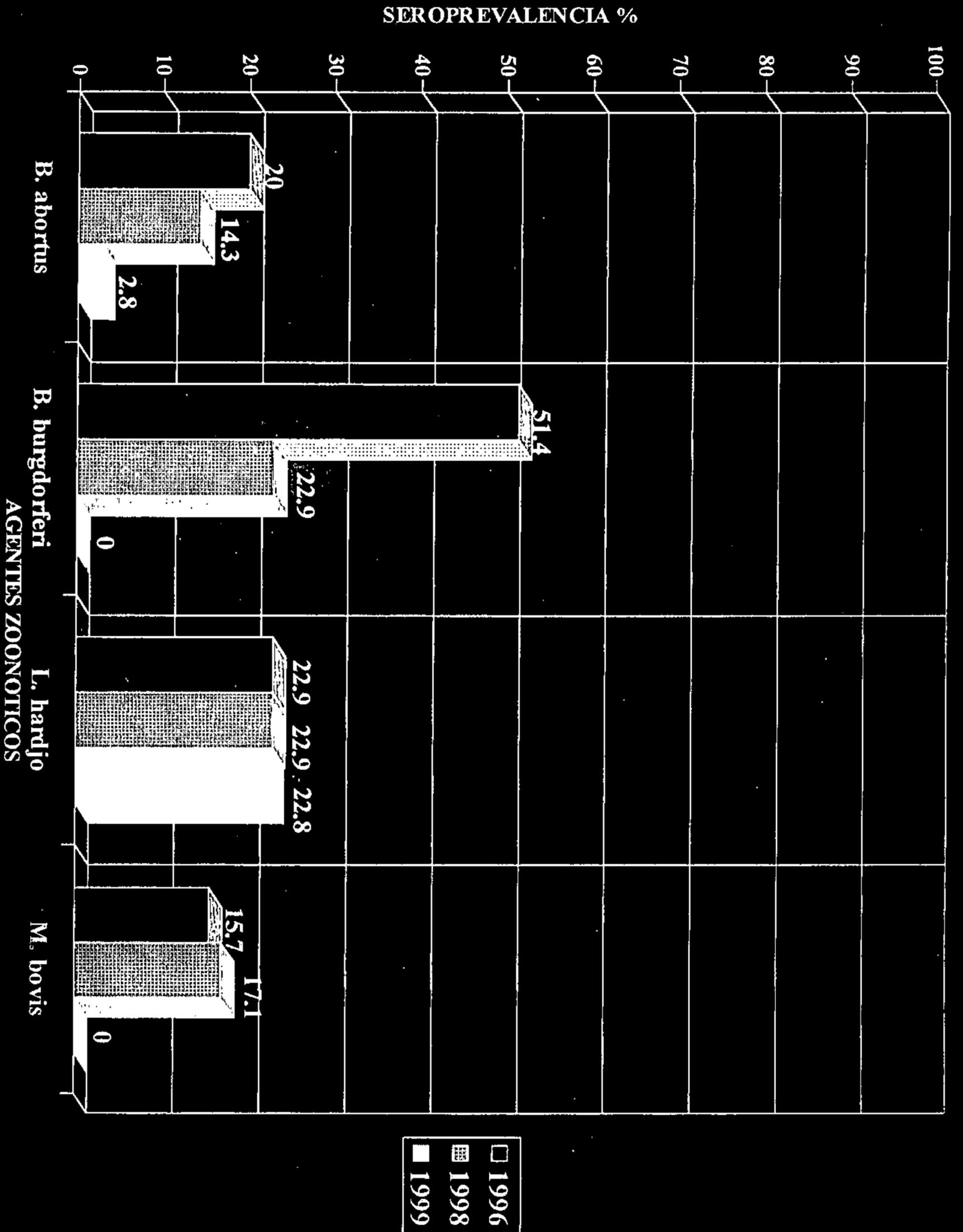


Figura 17. Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en 35 bovinos de doble propósito de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

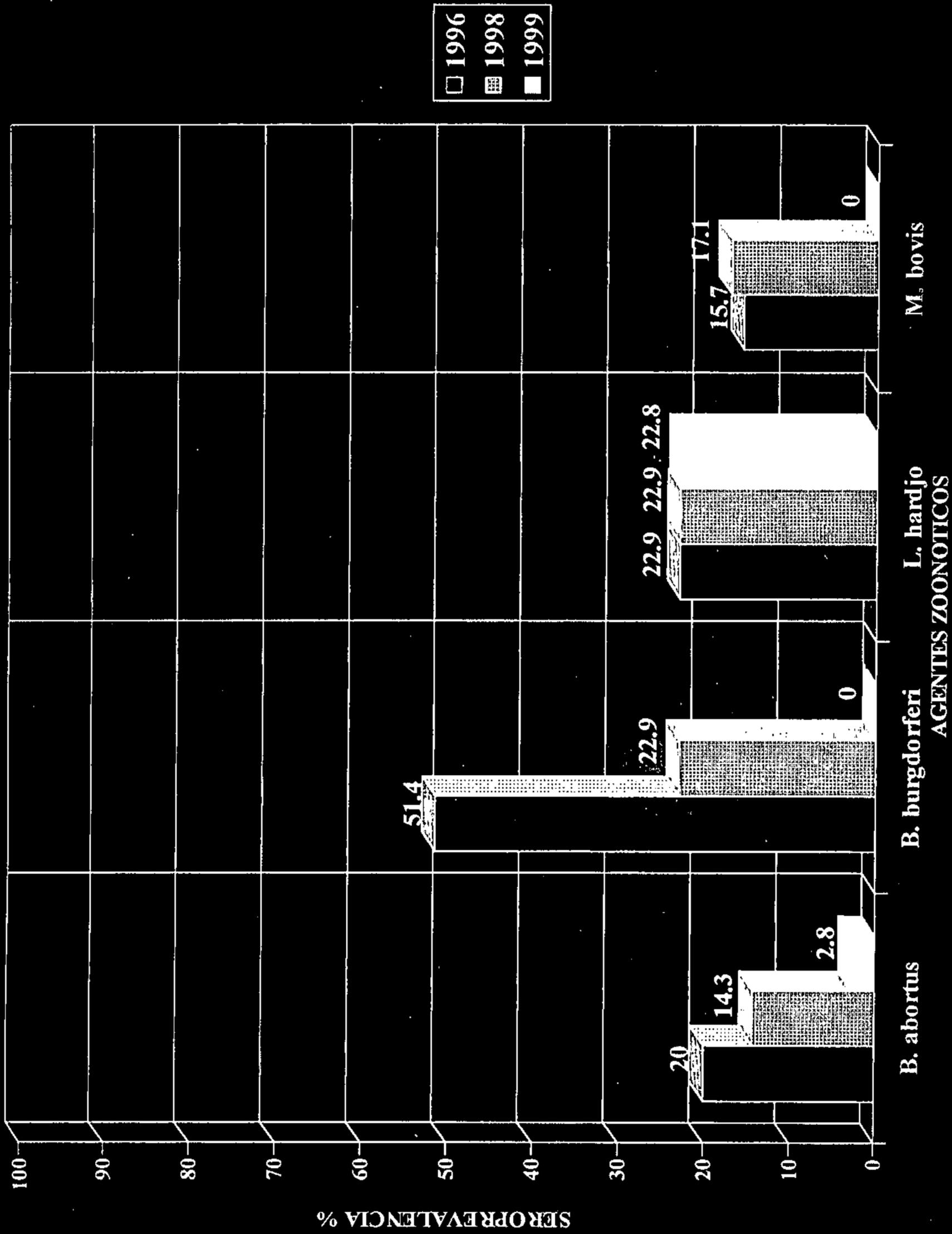


Figura 17. Seroprevalencia general de 4 agentes zoonóticos en 35 bovinos de doble propósito de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

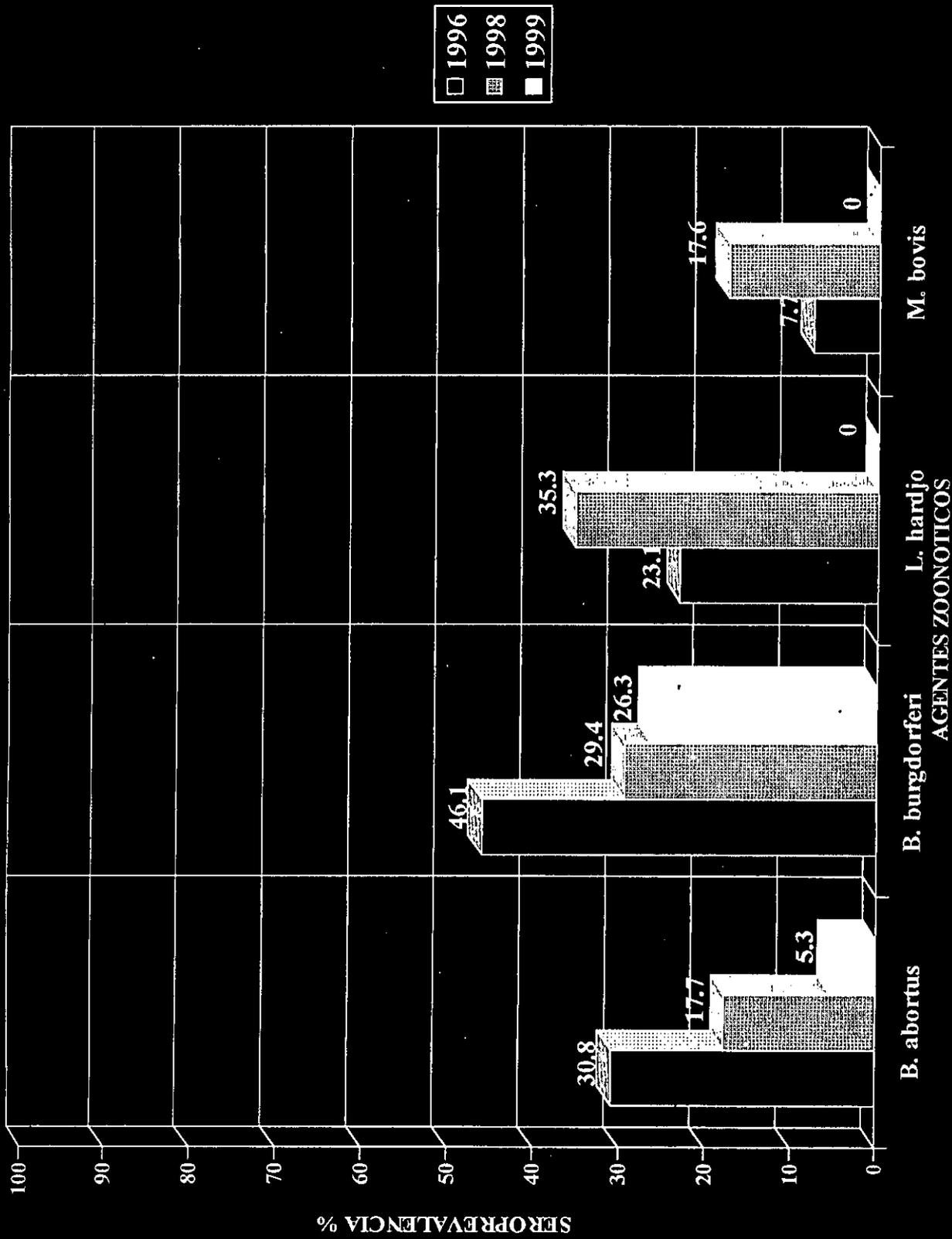


Figura 18. Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras gestantes de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

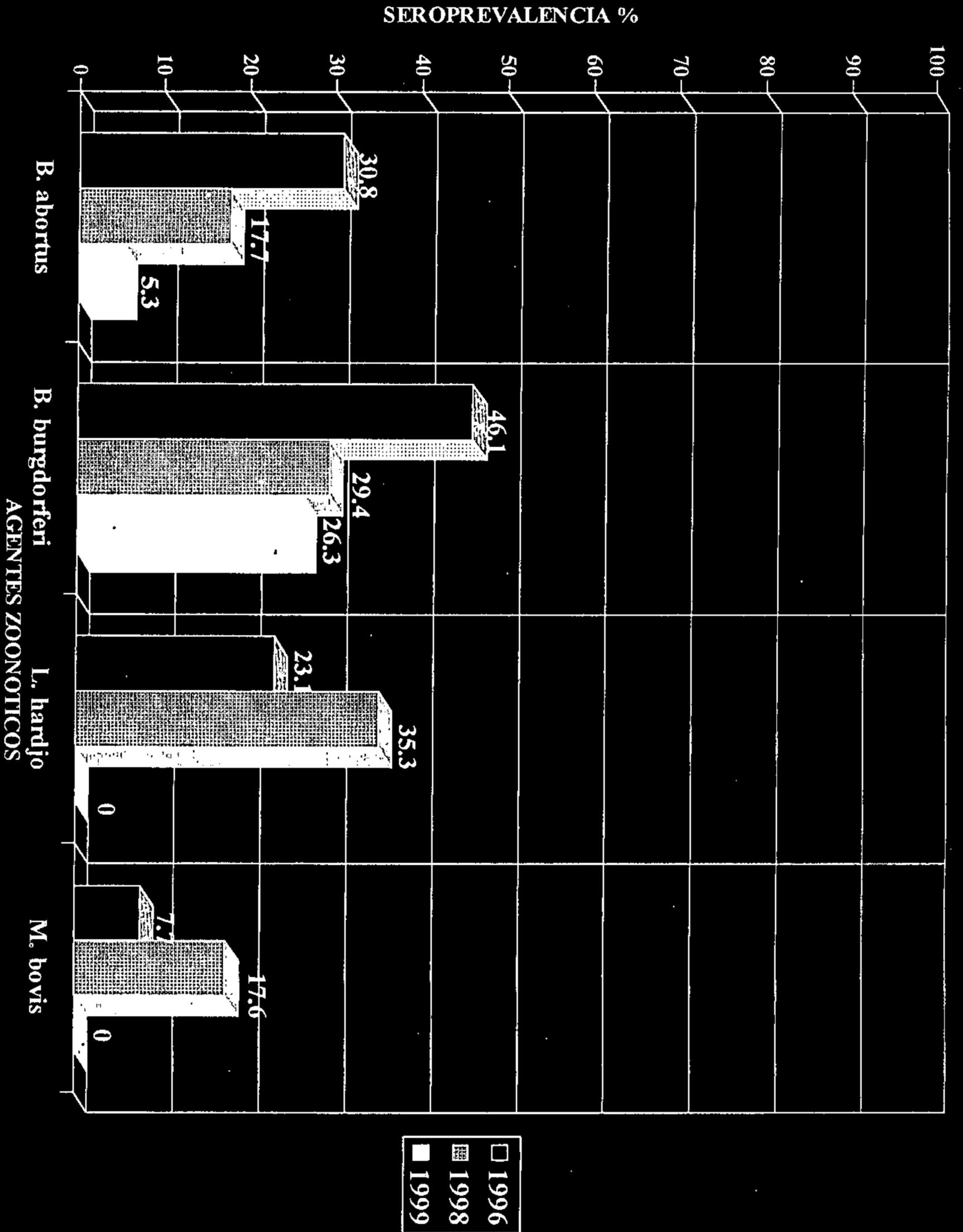


Figura 18. Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras gestantes de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

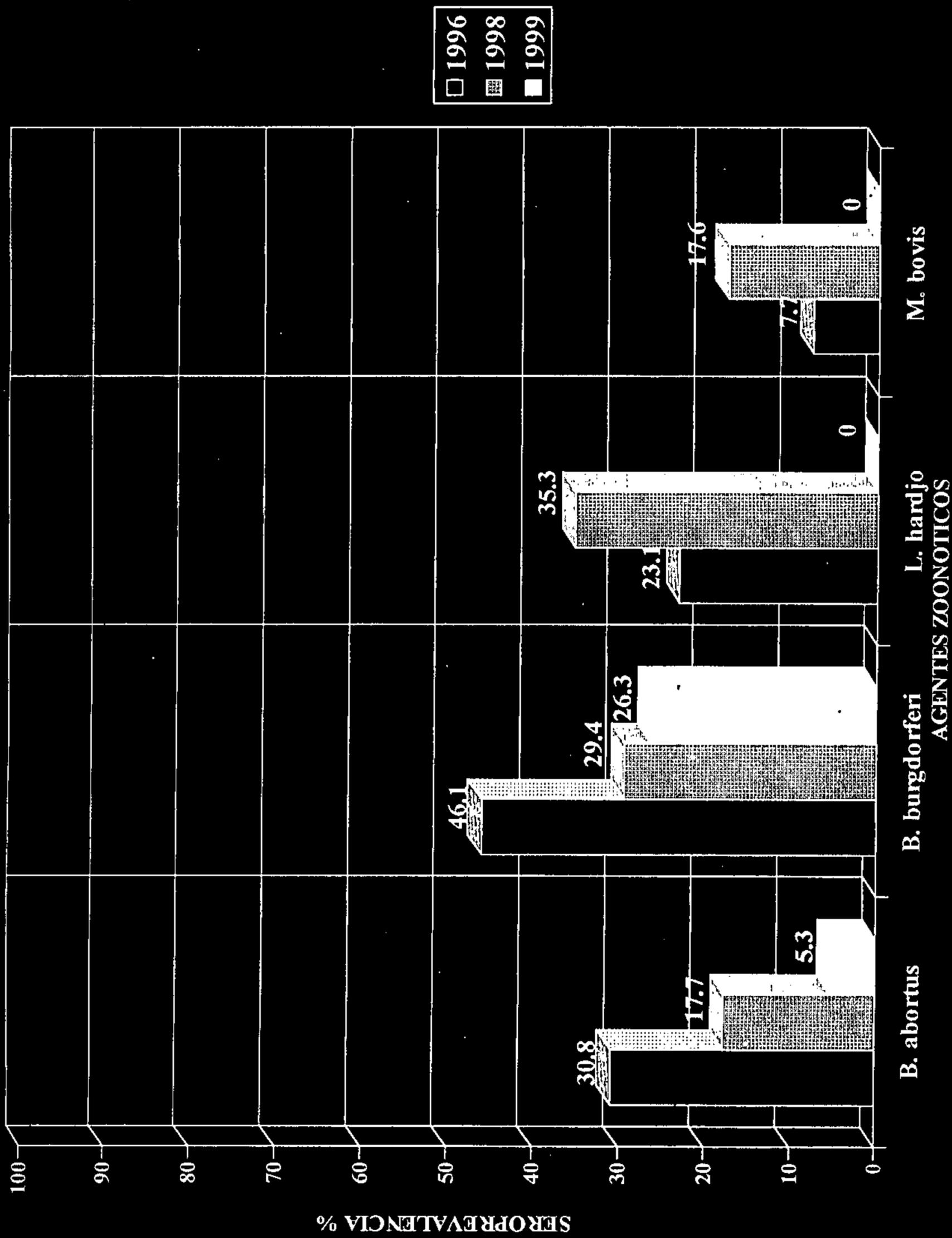


Figura 18. Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras gestantes de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

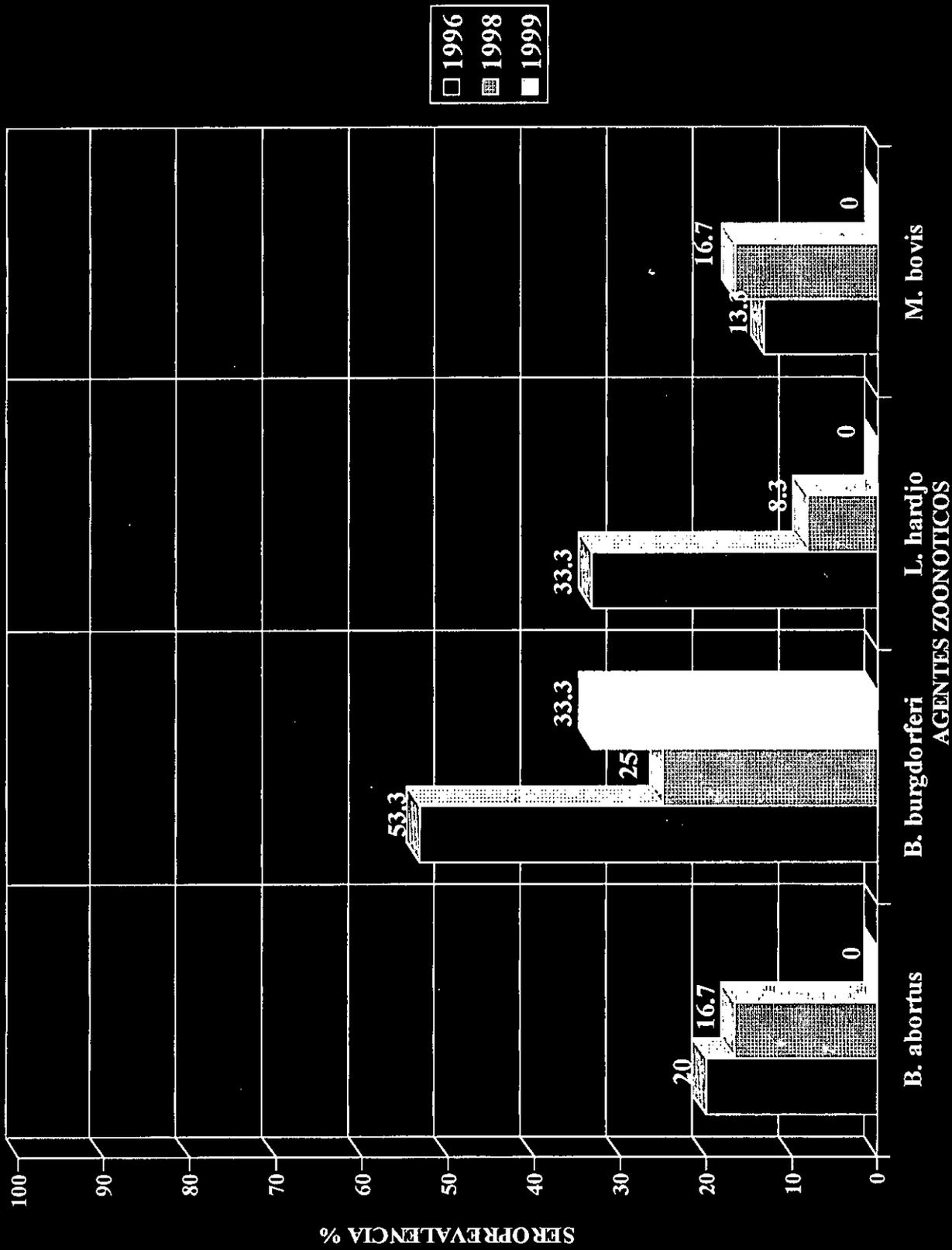


Figura 19. Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras no gestantes de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

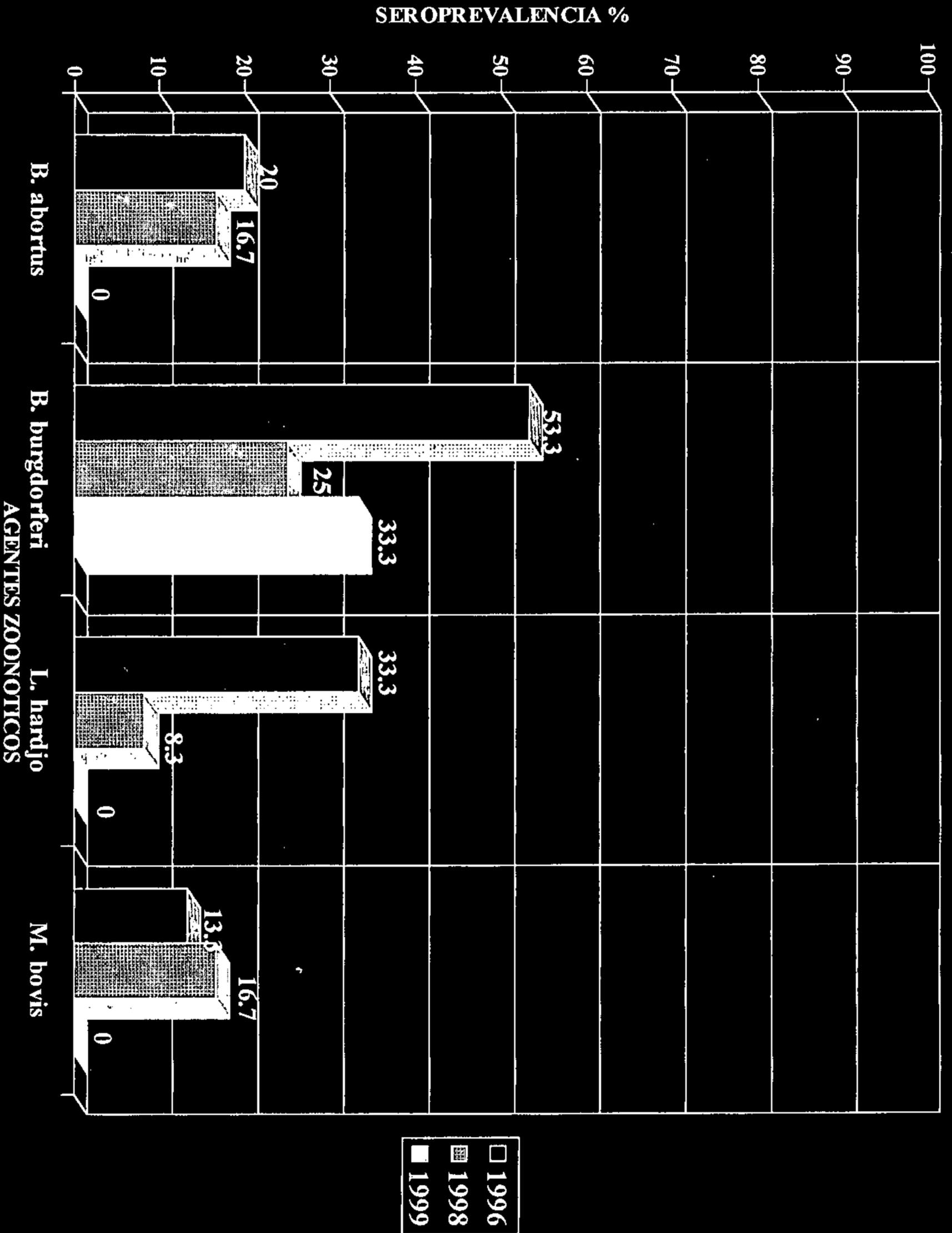


Figura 19. Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras no gestantes de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

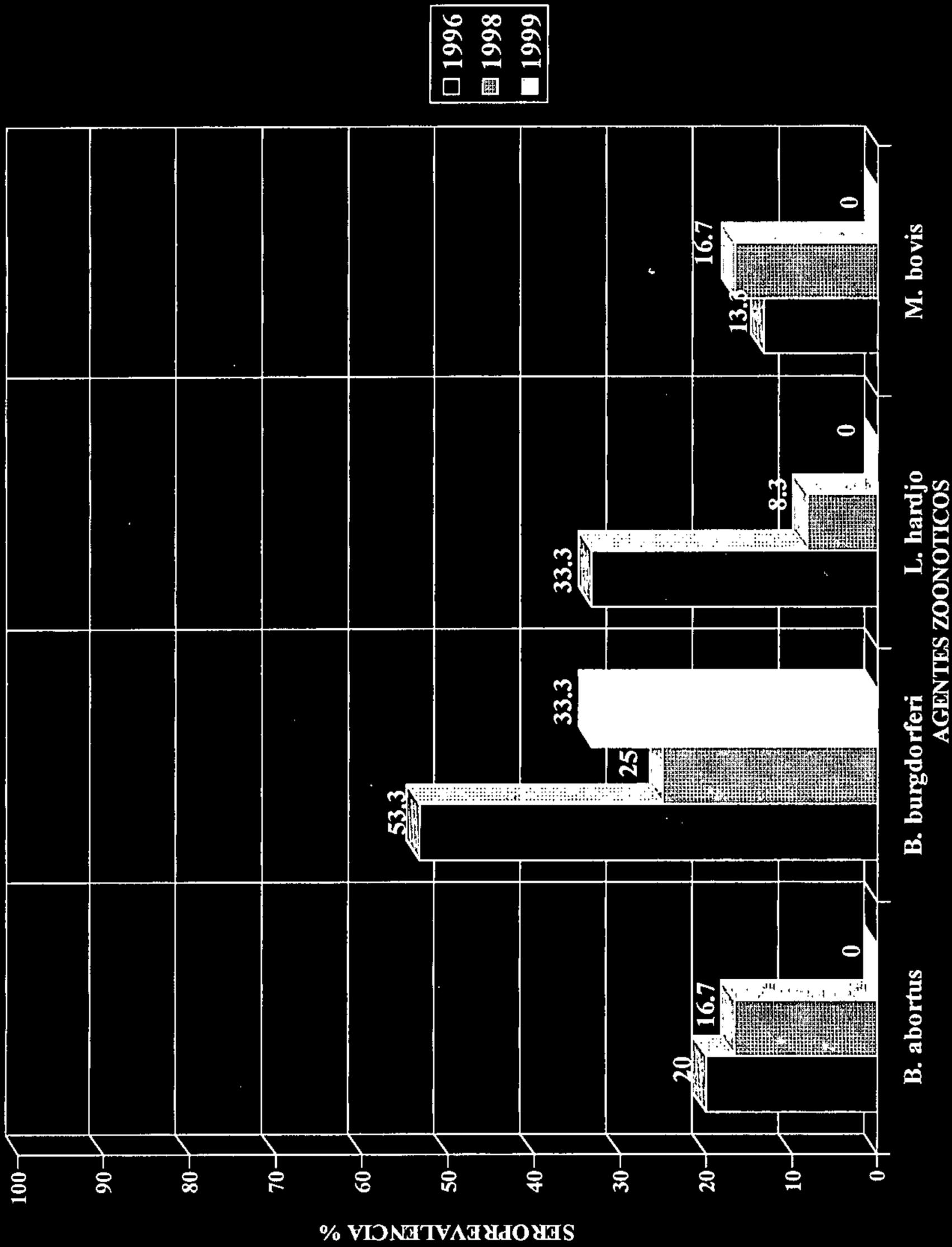


Figura 19. Seroprevalencia contra 4 agentes zoonóticos en hembras no gestantes de la región Frailesca Chiapas, 1996, 1998 y 1999.

Cuadro 1. Clasificación general, por edad y por sexo de la población bovina muestreada en la región Frailesca, Chiapas. 1996, 1998 y 1999.

	1996			1998			1999		
	No.	%	Total	No.	%	Total	No.	%	Total
BECERROS (0-4 meses)	40	12	51	37	84	44	0	0	0
DESARROLLO (> 4-36 meses)	107	92	116	78	85	92	2	100	2
ADULTOS (> 36 meses)	156	88	177	150	95	158	31	94	33
TOTAL	303		344	265	25	294	33		35

Cuadro 2. Seroprevalencia general aparente de cuatro agentes zoonóticos en la población bovina de la región Frailesca, Chiapas en 1996 y 1998.

AGENTE	1996			1998		
	No. animales	No. positivos	I.C. 95%	No. animales	No. positivos	I.C. 95%
<i>B. abortus</i>	344	32 (9.3%)	6.4 - 12.5	294	28 (9.5%)	6.3 - 13.0%
<i>B. burgdorferi</i>	344	43 (12.5%)	6.4 - 20.6	294	46 (15.6%)	7.6 - 23.9%
<i>L. hardjo</i>	344	107 (31.1%)	26.3 - 36.1	294	50 (17.0%)	12.9 - 21.5%
<i>M. bovis</i>	344	25 (7.3%)	5.6 - 11.5	294	17 (5.8%)	3.2 - 10.6%

Cuadro 3. Análisis estadístico (Ji^2) entre diferentes estratos sexo, edad y año contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998.

ESTRATO	<i>B. abortus</i>		<i>B. burgdorferi</i>		<i>L. hardjo</i>		<i>M. bovis</i>	
	Ji^2	P	Ji^2	P	Ji^2	P	Ji^2	P
Seroprevalencia general 1996 vs 1998.	1.735	0.419	2.245	0.325	17.071	0.0001*	4.486	0.106
Seroprevalencia por sexo (hembras 1996 vs hembras 1998)	0.039	0.8423	1.345	0.2460	16.643	0.0004*	0.160	0.6891
Seroprevalencia por edad (becerros vs producción) 1998	0.000	0.9925	1.214	0.2704	0.914	0.3388	4.514	0.0336*
Seroprevalencia por edad (desarrollo 1996 vs desarrollo 1998)	0.348	0.5547	0.479	0.4888	7.807	0.0052*	0.237	0.6259
Seroprevalencia por edad (producción 1996 vs producción 1998)	0.179	0.6720	0.379	0.5380	5.300	0.0213*	2.146	0.1428

**** P < 0.01**

*** P < 0.05**

Cuadro 4. Seroprevalencia por estrato de sexo de cuatro agentes zoonóticos, obtenidas en 1996 de la población bovina muestreada en la región Frailesca, Chiapas.

AGENTE	No. HEMBRAS	HEMRAS No. POSITIVOS (%)	INTERVALO DE CONFIANZA 95%	No. MACHOS	MACHOS No. POSITIVOS (%)	INTERVALO DE CONFIANZA 95%
<i>B. abortus</i>	303	30 (9.9)	6.7 - 13.4	41	2 (4.9)	.4 - 16.9
<i>B. burgdorferi</i>	303	40 (13.6)	10.0 - 19.8	41	3 (5.9)	1.1 - 11.1
<i>L. hardjo</i>	303	99 (32.7)	27.5 - 38.1	41	8 (19.5)	8.5 - 35.5
<i>M. bovis</i>	303	23 (7.8)	4.4 - 13.0	41	2 (3.9)	.3 - 15.5

Cuadro 5. Seroprevalencia por estrato de sexo de cuatro agentes zoonóticos, obtenidas en 1998 de la población bovina muestreada en la región Frailesca, Chiapas.

AGENTE	No. HEMBRAS	HEMRAS No. POSITIVOS (%)	INTERVALO DE CONFIANZA 95%	No. MACHOS	MACHOS No. POSITIVOS (%)	INTERVALO DE CONFIANZA 95%
<i>B. abortus</i>	265	24 (9.0)	5.0 - 14.0	29	4 (13.8)	3.8 - 31.8
<i>B. burgdorferi</i>	265	43 (16.2)	12.1 - 25.1	29	3 (10.3)	7.7 - 30.7
<i>L. hardjo</i>	265	46 (17.3)	13.0 - 22.1	29	4 (13.8)	3.8 - 31.8
<i>M. bovis</i>	265	16 (6.0)	3.2 - 11.9	29	1 (3.4)	.6 - 17.5

Cuadro 6. Seroprevalencia por estrato de edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas 1996.

ESTRATO	No. de animales	No. positivos <i>B. abortus</i> (%)	No. positivos <i>B. burgdorferi</i>	No. positivos <i>L. hardjo</i> (%)	No. positivos <i>M. bovis</i> (%)
Seroprevalencia en becerras.	37	3 (7.5)	4 (10.8)	11 (27.5)	2 (5.4%)
Seroprevalencia en becerros .	19	0	1 (5.3)	4 (18.2)	1 (5.3%)
Seroprevalencia en hembras en desarrollo.	86	8 (9.3)	7 (8.1)	29 (32.7)	5 (5.8)
Seroprevalencia en machos en desarrollo.	11	2 (11.1)	0	5 (55.5)	0
Seroprevalencia en hembras en producción.	170	16 (9.4)	29 (17.1)	58 (34.0)	16 (9.4)
Seroprevalencia en sementales.	21	1 (8.7)	2 (9.5)	1 (8.7)	1 (4.8)

Cuadro 7. Seroprevalencia por estrato de edad-sexo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas 1998.

ESTRATO	No. de animales	No. positivos <i>B. abortus</i> (%)	No. positivos <i>B. burgdorferi</i>	No. positivos <i>L. hardjo</i> (%)	No. positivos <i>M. bovis</i> (%)
Seroprevalencia en becerras.	38	3 (8.1)	6 (15.8)	4 (10.8)	3 (7.9%)
Seroprevalencia en becerros .	7	0	0	1 (14.3)	0
Seroprevalencia en hembras en desarrollo.	77	9 (11.5)	15 (19.5)	13 (16.7)	2 (2.6)
Seroprevalencia en machos en desarrollo.	14	3 (21.4)	2 (14.3)	2 (14.3)	0
Seroprevalencia en hembras en producción.	150	12 (8.0)	22 (14.7)	29 (18.6)	11 (7.3)
Seroprevalencia en sementales.	8	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)

Cuadro 8. Análisis estadístico (Ji^2) de manera conjunta de los estratos "edad y sexo" así como año de muestreo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998.

ESTRATO	<i>B. abortus</i>		<i>B. burgdorferi</i>		<i>L. hardjo</i>		<i>M. bovis</i>	
	Ji^2	P	Ji^2	P	Ji^2	P	Ji^2	P
Seroprevalencia por sexo y edad 1996 "Machos"(desarrollo vs sementales)	0.025	0.8731	1.574	0.2095	8.513	0.0035**	---	---
Seroprevalencia por edad y sexo 1996 "Producción" (machos vs hembras)	0.238	0.6249	0.046	0.8290	6.135	0.0132*	0.729	0.3930

* P < 0.05.

** P < 0.01

--- Ausencia de datos comparables.

Cuadro 9. Seroprevalencia por estrato de edad, presencia o ausencia de la gestación y año de muestreo contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. (1996 y 1998).

ESTRATO	No. de animales	No. positivos <i>B. abortus</i> (%)	No. positivos <i>B. burgdorferi</i> (%)	No. positivos <i>L. hardjo</i> (%)	No. positivos <i>M. bovis</i> (%)
Hembras en desarrollo gestantes 1996	17	1 (5.9)	2 (11.8%)	8 (47.0)	1 (5.5)
Hembras adultas gestantes 1996	75	16 (21.3)	11 (14.7)	15 (20.0)	7 (9.3)
Hembras en desarrollo no gestantes 1996	43	2 (4.6)	2 (4.6)	15 (34.9)	4 (9.3)
Hembras adultas no gestantes	95	6 (6.3)	18 (18.9)	30 (31.6)	9 (9.5)
Hembras en desarrollo gestantes 1998	11	1 (9.1)	1 (9.1)	3 (27.3)	0
Hembras adultas gestantes 1998	61	4 (6.5)	7 (11.5)	7 (11.5)	6 (9.8)
Hembras en desarrollo no gestantes 1998	37	5 (13.5)	8 (21.6)	6 (16.2)	2 (5.4)
Hembras adultas no gestantes 1996	88	8 (9.1)	15 (17.0)	22 (25.0)	5 (5.7)

Cuadro 10. Análisis estadístico (Ji^2) entre hembras gestantes y no gestantes en función de la edad, contra cuatro agentes zoonóticos en bovinos de la región Frailesca, Chiapas. 1996 y 1998.

ESTRATO	<i>B. abortus</i>		<i>B. burgdorferi</i>		<i>L. hardjo</i>		<i>M. bovis</i>	
	Ji^2	P	Ji^2	P	Ji^2	P	Ji^2	P
Hembras en desarrollo gestantes vs no gestantes en 1996	0.643	0.4221	0.517	0.4719	1.829	0.1762	5.057	0.0245*
Hembras adultas gestantes vs no gestantes en 1996	4.835	0.0278*	0.033	0.8542	0.063	0.8004	0.520	0.4705
Hembras en desarrollo no gestantes en 1996 vs hembras en desarrollo en 1998	0.009	0.9219	2.877	0.0890	8.432	0.0036**	0.025	0.8724
Hembras adultas gestantes en 1996 vs hembras adultas gestantes en 1998	3.960	0.0465*	0.002	0.9589	6.689	0.0096**	0.003	0.9540
Hembras en desarrollo gestantes vs hembras adultas gestantes en 1996	.0004	0.9839	0.123	0.7248	0.233	0.6286	7.289	0.0069**
Hembras en desarrollo gestantes vs hembras adultas gestantes en 1998	0.115	0.7338	0.035	0.8499	0.848	0.3571	14.387	0.0001**

* P < 0.05.

** P > 0.01

Cuadro 11. Seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos por explotación bovina muestreadas en 1996 y 1998. Región Frailesca, Chiapas.

EXPLOTACION	<i>B. abortus</i> %		<i>B. burgdorferi</i> %		<i>L. hardjo</i> %		<i>M. bovis</i> %	
	1996	1998	1996	1998	1996	1998	1996	1998
ALBANIA	4	4	11	13	23	18	5	0
ARGENTINA	0	10	0	0	4	10	0	0
BELEN	5	0	3	20	73	35	3	5
BONANZA	2	---	31	---	0	---	7	---
BUENAVENTURA	0	6	3	13	3	3	7	3
CALVARIO	0	---	44	---	56	---	6	---
FIMEGEN	0	---	14	---	0	---	0	---
GARGALEOTE	0	0	0	0	10	13	16	0
GUADALUPE	0	---	0	---	38	---	75	---
LA GLORIA	---	0	---	0	---	30	---	23
MARGARITAS	0	---	10	---	10	---	0	---
NATIVIDAD	7	10	33	15	61	20	43	15
PEDACITO	7	0	26	20	16	5	42	0
PENICILINA	0	---	60	---	36	---	20	---
SAN FRANCISCO	---	0	---	9	---	28	---	0
SANTA LUCIA	0	0	13	26	1	30	10	10
SOMBRA	---	13	---	43	---	26	---	16
TAMARINDO	21	19	19	54	31	16	16	16
VESUBIO	0	0	5	11	44	23	11	5

--- No se muestreo en ese año.

Cuadro 12. Cálculo de la seroprevalencia real y valores predictivos de la técnica de ELISA aplicada en el análisis de las muestras de suero de bovinos de la región Frailesca, Chiapas, 1996, 1998 Y 1999.

ESTRATO Seroprevalencia general aparente	SENSIB. REPORTADA	ESPECIF. REPORTADA	PREV. APARENTE	PREV. REAL	VALOR PREDICTIVO +	VALOR PREDICTIVO -	PRECISION
<i>B. abortus</i> , 1996.	99.6%	98.6%	9.3%	10.5%	100.0%	98.7%	98.8%
<i>B. abortus</i> , 1998.	99.6%	98.6%	9.5%	10.9%	100.0%	98.5%	98.6%
<i>B. abortus</i> , 1999.	99.6%	98.6%	2.8%	5.7%	100.0%	97.0%	97.0%
<i>B. burgdorferi</i> , 1996.	84.8%	100.0%	12.5%	10.5%	83.7%	100.0%	98.0%
<i>B. burgdorferi</i> , 1998.	84.8%	100.0%	15.6%	13.3%	84.8%	100.0%	97.6%
<i>B. burgdorferi</i> , 1999.	84.8%	100.0%	0	0	-	-	-
<i>L. hardjo</i> , 1996.	100.0%	99.4%	31.1%	31.7%	100.0%	99.1%	99.4%
<i>L. hardjo</i> , 1998.	100.0%	99.4%	17.0%	17.7%	100.0%	99.2%	99.3%
<i>L. hardjo</i> , 1999.	100.0%	99.4%	22.8%	22.8%	100.0%	100.0%	100.0%
<i>M. bovis</i> , 1996.	56.4%	65.6%	7.3%	38.9%	56.0%	65.5%	64.8%
<i>M. bovis</i> , 1998.	56.4%	65.6%	5.8%	35.7%	58.8%	65.7%	65.3%
<i>M. bovis</i> , 1999.	56.4%	65.6%	0	-	-	-	-

Cuadro 13. Determinación del coeficiente de concordancia (Kappa) entre diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico epidemiológico de *B. abortus* y *L. hardjo*.

AGENTE	Técnicas serológicas	No. de muestras analizadas	Valor de Kappa I.C 95%
<i>Brucella abortus</i>	ELISA indirecta vs Tarjeta ácida	31	0.35
<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>hardjo</i>	ELISA indirecta vs Aglutinación Microscópica	41	0.18

Cuadro 14. Resultados por explotación bovina de la región Frailesca, Chiapas que obtuvieron un valor de porcentaje de ELISA ≥ 80 contra el antígeno de la rabia en 1996 y 1998.

EXPLOTACION	No. bovinos muestreados		No. bovinos ELISA > 80		% bovinos ELISA > 80	
	1996	1998	1996	1998	1996	1998
ALBANIA	10	21	1	4	10.0	19.0
ARGENTINA	10	10	2	1	20.0	10.0
BELEN	19	20	0	1	0	5
BONANZA	30	---	3	---	10.0	---
BUENAVENTURA	29	30	1	1	3.4	3.3
CALVARIO	25	---	2	---	8.0	---
FIMEGEN	8	---	0	---	0	---
GARGALEOTE	30	30	1	10	3.3	33.3
GUADALUPE	21	---	2	---	9.5	---
LA GLORIA	---	13	---	2	---	15.4
MARGARITAS	10	---	3	---	30.0	---
NATIVIDAD	31	20	0	3	0	15.0
PEDACITO	27	20	4	0	14.8	0
PENICILINA	20	---	1	---	5.0	---
SAN FRANCISCO	---	21	---	2	---	9.5
SANTA LUCIA	29	30	12	5	41.4	16.7
SOMBRA	---	30		1		3.3
TAMARINDO	27	31	0	0	0	0
VESUBIO	18	18	4	2	22.2	11.1

Cuadro 15. Seroprevalencia contra cuatro agentes zoonóticos en función de la edad de 35 bovinos muestreados en 1996, 1998 y 1999. Región Frailesca Chiapas.

	<i>B. abortus</i> (%)			<i>B. burgdorferi</i> (%)			<i>L. hardjo</i> (%)			<i>M. bovis</i> (%)		
	1996	1998	1999	1996	1998	1999	1996	1998	1999	1996	1998	1999
BECERROS	11	37	30	23	24	49	44	34	40	63	48	30
DESARROLLO	0	50	33	16	16.6	0	0	33.3	33.3	33.3	0	0
ADULTOS	25	7.1	7.1	42.8	25	46.4	28.6	21.4	21.4	35.7	21.4	21.4