



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

47
2ej.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
GUAUTITLAN

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

"EMPLEO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL CON HAPTENO NATIVO PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN BOVINOS REYAGUNADOS EN UN ESTABLO UBICADO EN GUAUTITLAN, MEX."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
ESPERANZA GONZALEZ MIRANDA

ASESOR:

M. V. Z. LUIS ARTURO NAVARRO M.

COASESORES:

DR. EFREN DIAZ APARICIO

O. F. B. LAURA HERNANDEZ ANDRADE

GUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264788



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA F.E.S.-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Jaime de Anda Montañez
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S.-C

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

Empleo de la prueba de inmunodifusión radial con hapteno
nativo para el diagnóstico de brucelosis en bovinos revescu-
nados en un establo ubicado en Cuautitlán, Méx.

que presenta la pasante: Esperanza González Miranda,
con número de cuenta: 9156661-6 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista.

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

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, a 12 de Mayo de 1998

PRESIDENTE	MVZ. <u>Luis Navarro Morales</u>	
VOCAL	MVZ. <u>Rafael Ordóñez Medina</u>	
SECRETARIO	MVZ. <u>José Antonio Licea Vega</u>	<u>José Antonio Licea Vega</u>
RIMER SUPLENTE	MVZ. <u>Silviano Trejo Nuñez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. <u>Raúl Radillo Rodríguez</u>	

AGRADECIMIENTOS

QUIERO DAR GRACIAS A DOS SERES TAN GRANDES QUE ME PERMITIERON LLEGAR A LA CULMINACION DE ESTA OBRA, DANDOME LA FUERZA Y EL APOYO ESPIRITUAL QUE ME AYUDO A SALIR DEL ABISMO EN EL QUE ME ENCONTRABA. GRACIAS PARA TODA LA VIDA.

A MI MADRE:

**CARMEN MIRANDA RODRIGUEZ
NO EXISTEN PALABRAS PARA AGRADECERTE LO QUE TÚ ME HAS DADO Y ENSEÑADO, GRACÍAS POR TENER SIEMPRE LA CONFIANZA EN MÍ Y POR PERMITIRME SER TU HIJA, ESTE TRIUNFO ES TUYO, JUNTAS LUCHAREMOS POR SALIR ADELANTE Y VENCER ESA ENFERMEDAD , GRACÍAS MAMÁ.**

A MI PADRE:

**JUAN GONZÁLEZ ORTIZ .
TÚ QUE EN TODO MOMENTO ME HAS BRINDADO TU APOYO, QUIERO DECIRTE QUE TE QUIERO MUCHO Y QUE NUNCA VOY A OLVIDAR EL ESFUERZO QUE TU HICISTE PARA QUE PUDIERO LLEGAR A CULMINAR OTRA ETAPA DE MI VIDA, GRACÍAS PAPÁ.**

A MIS HERMANOS:

**ROSALBA, MARIO Y SERGIO:
USTEDES QUE HAN SIDO UNA BASE MUY IMPORTANTE EN LA CULMINACIÓN DE ESTA OBRA, QUIERO DECIRLE QUE ME SIENTO MUY ORGULLOSA DE SER SU HERMANA, SE QUE EN USTEDES TENGO Y TENDRE SIMPRE UNA MANO AMIGA EN LA CUAL PUEDA APOYARME.**

A MI TIA:

**FELICITAS MIRANDA RODRIGUEZ:
USTED QUE HA SIDO COMO MI SEGUNDA MADRE, NO TENGO MÁS QUE DECIRLE MIL GRACIAS POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE HE RECIBIDO DE SU PARTE.**

A MIS SOBRINOS:

**MA. CARMEN Y DIEGO ALEJANDRO:
ESPERO QUE EN UN TIEMPO, ESTO PUEDA SER ESTIMULO PARA QUE USTEDES PUEDAN LLEGAR A REALIZARSE COMO PROFESIONISTAS.**

A MIS CUÑADAS:
SUSANA Y MARIBEL:
GRACIAS POR CREER EN MÍ.

A MI PRIMO:
JUAN CARLOS MIRANDA ZAVALA:
TÚ QUE ME HAS APOYADO MORALMENTE, QUIERO DECIRTE QUE AUNQUE TÚ CREAS QUE TODO LO QUE ME HAS DICHO, SE HA IDO AL OLVIDO NO, QUIERO DECIRTE QUE ALGÚN DÍA VOY A REALIZAR LO QUE TU SIEMPRE HAS PENSADO. GRACIAS HIJO.

A MI TIO LALO:
GRACIAS TÍO POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE HE RECIBIDO DE SU PARTE.

A MIS AMIGAS:
BEATRIZ:
GRACÍAS POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE SIEMPRE ME DISTE, POR SER MI BRAZO FUERTE EN UN MOMENTO EN DONDE SENTÍA DECAER, SINCERAMENTE QUIERO DECIRTE QUE ERES MI MEJOR AMIGA.

YLIANA:
GRACÍAS POR SER MI AMIGA Y SER UNA DE LAS PERSONAS QUE HAN CREIDO EN MI.

A LA FAMILIA SANTIAGO SANTOS: GRACIAS POR BRINDARME SU APOYO Y ABRIRME LAS PUERTAS DE SU CASA PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO. MIL GRACÍAS.

A BERTHA Y DAVID: GRACÍAS POR APOYARME EN TODO MOMENTO EN LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO, Y DEDICARME PARTE DE SU TIEMPO

A MIS ASESORES:

M.V.Z. LUIS ARTURO NAVARRO MORALES: POR LA CONFIANZA QUE TUVO EN MI PARA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO Y POR EL TIEMPO Y APOYO QUE ME BRINDO EN TODO MOMENTO.

M.V.Z. EFRÉN DÍAZ APARICIO: POR SU TIEMPO Y DEDICACIÓN PARA LA TERMINACIÓN DE ESTE TRABAJO.

Q. F. B. LAURA HERNANDEZ ANDRADE: POR LA PACIENCIA QUE TUVO PARA LA REVISIÓN DE LA TESIS.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO Y EN ESPECIAL A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN POR HABER ABIERTO LAS PUERTAS DEL CONOCIMIENTO PARA MI FORMACION COMO PROFECIONAL

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN -----	I
INTRODUCCIÓN-----	1
OBJETIVOS-----	13
MATERIAL Y MÉTODOS-----	14
RESULTADOS-----	19
DISCUSIÓN-----	24
CONCLUSIONES-----	28
LITERATURA CITADA-----	29

RESUMEN.

El presente trabajo se realizó en un hato bovino, el cual presentaba problemas reproductivos principalmente abortos y retención de placenta. Se muestreo una población de 300 vacas Holstein vacunadas y con repetidas revacunaciones con la dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19 , a las cuales se les realizaron dos muestreos serológicos, que se trabajaron con las pruebas de tarjeta y rivanol, teniendo un 52% de positivos a tarjeta, y un 32.9% de vacas positivas a rivanol, con títulos de 1:50 o mayores. Se realizó un segundo muestreo de donde se obtuvieron los siguientes resultados: un 45% de vacas positivas a la prueba de tarjeta, y un 23.5% de positivos a rivanol. En base al segundo muestreo se seleccionaron 90 muestras de aquellos animales que tuvieron aborto , expulsión fetal y retención de placenta, sometiéndolas a la prueba de tarjeta, teniendo un 97.8% de vacas positivas y un 76.4% de positivas a la prueba de rivanol, de los animales positivos a esta última prueba se les realizó la prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo, para diferenciar anticuerpos por vacunación de anticuerpos por infección, obteniéndose un 21.1% de animales positivos. De esos mismos animales se obtuvieron muestras de exudado vaginal y de leche, para poder realizar el aislamiento del agente e identificar si era una cepa de campo o vacunal, aislándose tres cepas de campo de *B. abortus* biotipo 1.

INTRODUCCIÓN.

ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA ENFERMEDAD.

Durante la guerra de Crimea (1854-1856) en los países mediterráneos y particularmente en la Isla de Malta, se observaron numerosos casos de fiebres ondulantes prolongadas, que no se comparaban con las enfermedades entonces conocidas. En 1859, Martson hizo cuidadosamente estudios clínicos y autopsias de casos de fiebre mediterránea remitente, presentando posteriormente (1863) una descripción detallada de la enfermedad tal como ocurría en Malta, considerándose desde entonces como padecimiento endémico característico de los países del Mediterráneo (7,14,16).

El agente causal de la enfermedad fue identificado por Bruce en el año de 1886, al aislarlo del bazo de personas muertas por esta infección en la Isla de Malta. Posteriormente logró aislar el germen de enfermos y pudo demostrar la virulencia del Micrococcus melitensis para el mono (18, 35).

El primer aislamiento e identificación de Brucella abortus a partir de fetos bovinos abortados y membranas fetales, fue realizado en Dinamarca por Frederick Bang en el año 1897, por lo que la enfermedad en bovinos tomó el nombre de "Enfermedad de Bang" o "Enfermedad abortiva de Bang". Traum en 1914 en E.U.A. aisla Brucella suis de cerdas que abortaban (41, 43).

Malvin y Eichhorn 1918 en E.U.A. sugieren que se estudie las semejanzas entre Micrococcus melitensis y Brucella abortus. Huddleson en 1935 describe la prueba rápida para la aglutinación en placa que sirve para la campaña nacional contra la brucelosis bovina en Estados Unidos. Ruiz Castañeda en 1956 en México propone un medio de cultivo bifásico para Brucella y una prueba diagnóstica de tarjeta. En México el primer caso de brucelosis humana fue reportado por Carbajal en el año de 1906, y es hasta 1937 cuando se iniciaron estudios en el ganado bovino y caprino (31, 35).

DEFINICIÓN.

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa, que afecta a los animales domésticos, particularmente cabras, bovinos y cerdos, cuyas manifestaciones clínicas son la expulsión prematura del feto, retención de placenta e infertilidad, se encuentra ampliamente diseminada en el mundo, y es considerada como una de las zoonosis más importantes (7, 14, 16, 29).

SINONIMIAS. Aborto contagioso, Aborto infeccioso, Aborto enzootico, Enfermedad de Bang, Fiebre de Malta en humanos (7, 16, 35, 43).

ETIOLOGÍA.

La infección es producida por microorganismos del género Brucella, de forma cocobacilar, los cuales están clasificados como cepas lisas: B. melitensis, B. abortus, B. suis, B. neotomae, en las cuales empleando técnicas de tinción especiales, puede demostrarse la existencia de cápsula. Cepas rugosas: B. ovis y B. canis (7, 14, 16, 29).

Las características de cada una de las especies de Brucella son:

- B. abortus: Se reconocen nueve biovariedades, infecta básicamente a bovinos también a caprinos y ovinos que conviven con bovinos infectados.
- B. melitensis: Tiene tres biovariedades que difieren entre si por su compartamiento con sueros monoespecíficos anti-A y anti-M.

Causa una enfermedad contagiosa en caprinos y también en bovinos, produce en el hombre una infección severa y persistente.

- B. suis: Hay cuatro biovariedades, la uno y la tres infectan a los suinos, las biovariedades uno, tres y cuatro son altamente patógenas para el hombre.
- B. neotomae: Se aisló de ratas de el desierto en el noroeste de Estados Unidos.
- B. ovis: Causa epididimitis en corderos y abortos esporádicamente en ovejas, ocasionalmente afecta a cabras, pero no infecta a otros animales, ni al hombre.
- B. canis: Produce epidídimo-orquitis en perros machos y metritis y abortos en perras, infecta al hombre que convive con perros infectados.

La afinidad de especies no es definitiva y se pueden producir infecciones por cualquier especie de Brucella en cualquier especie animal. Las especies de B. ovis y B. canis son cepas rugosas que no cruzan con cepas lisas (16, 30, 31, 43).

CARACTERÍSTICAS CULTURALES.

Las brucelas son pequeños cocobacilos Gram negativos, su crecimiento ocurre entre 20 y 40°C, a una temperatura óptima de 37°C y un pH 6.6 a 7.4. No son organismos primarios, las colonias de Brucella tienen 0.5 a 1.0 mm de diámetro y son convexas.

Las colonias de las cepas varían considerablemente en color, consistencia y textura. Las colonias rugosas son usualmente mucho menos transparentes que las colonias lisas, pero tienen una textura pegajosa. Las brucelas son catalasa positiva, usualmente oxidasa positiva, no producen indol, no licúan la gelatina, utilizan diversos carbohidratos, pero no producen ácido ni gas en cantidades suficientes como para poder usarlas en su identificación (5, 16, 34, 40).

Brucella es un microorganismo que crece bajo condiciones aeróbicas y microaerofílicas. El crecimiento de algunas especies de Brucella, se estimula con suero fetal bovino en el medio de cultivo, sobre todo si se trata de primoaislamiento, requiriendo de un 5-10% de CO₂.

La diferenciación de las seis especies y sus biotipos se efectúa en base a su capacidad de producir H₂S, necesidades de CO₂, habilidad de crecer en medios que contengan concentraciones variables de Fucsina básica y Tionina, aglutinación por sueros monoespecíficos y susceptibilidad a sufrir lisis por los fagos: Wb, Tb, Iz y R/C (4,5).

Con relación a la estructura antigénica de las brucelas, se sabe que existen dos antígenos principales en las cepas lisas, las cuales se conocen como antígenos A y M, siendo estos residuos formados de polihidroxiamino, presente en el lipopolisacárido (LPS) de B. abortus y B. melitensis la proporción del antígeno A:M en B. abortus es de 20:1 y en B. melitensis es de 1:20.

Las cepas rugosas de Brucella, tienen características antigénicas similares entre sí pero diferentes a las cepas lisas. Es importante conocer la estructura antigénica del género Brucella ya que parte de la respuesta inmune del animal es función de dicha estructura antigénica (2, 5, 30, 31).

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE B. abortus.

B. abortus es una bacteria Gram negativa, que como otras especies del género, se caracteriza por ser un patógeno intracelular facultativo, esto es por poder multiplicarse en las células fagocitarias del sistema inmune de sus huéspedes naturales (13).

Consta de una envoltura celular característica de las bacterias Gram negativa, constituida por una membrana interna y otra externa, existe un espacio comprendido entre ambas membranas denominado periplasma o espacio periplásmico, en donde se encuentran proteínas solubles y un polímero glucopeptídico (mureína o péptidoglicano).

La parte exterior de la membrana externa es la única parte de la bacteria que se encuentra en contacto con el medio ambiente y contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) (5, 14,16).

LPS: Es un componente bacteriano, que en el caso de Brucella como en el de otras bacterias estudiadas es un coadyuvante para la respuesta inmune, porta determinante antigénico extraordinariamente inmunodominante y tiene propiedades mitogénicas policlonales para células B y es causante en muchos casos de los síntomas del shock séptico (13, 22, 43).

Está constituido de una parte lipídica (lípidos A), una cadena O que es la parte polisacárida y una región central que es un oligosacárido que sirve de unión entre el lípidos A y la cadena O.

El lípido A es un glucolípido hidrófobo inserto en la membrana externa de la bacteria y por lo tanto no expuesto al medio externo. El LPS permanece en la membrana externa debido a la interacción hidrófoba del lípido A con el resto de los componentes del mismo. El LPS posee determinantes antigénicos que da reacciones cruzadas con otros Gram negativos. La cadena O es la responsable de las reacciones cruzadas con Yersinia enterocolitica serotipo 9, Escherichia coli serotipos O:157, O:116 y O:117 y Vibrio cholerae.

La síntesis del LPS tiene lugar en el citoplasma en la parte interior de la membrana interna, por lo que en el citoplasma podemos encontrar precursores del LPS desprovistos de su componente lipídico, no son inmunogénicos pero reaccionan con anticuerpos específicos anti-LPS y son conocidos como hapteno nativo (HN).

Por medio de inmunolectroforesis se ha identificado un segundo componente del LPS de naturaleza exclusivamente polisacárida, esta fracción fue originalmente llamada componente 1, posteriormente segundo polisacárido y después polisacárido B (poly-B). Sin embargo por representar el equivalente del hapteno nativo (HN) de otras bacterias Gram negativas, actualmente se emplea con preferencia la denominación de HN (14, 37, 41).

TRANSMISIÓN.

La transmisión de la enfermedad es básicamente por vía oral, ya que los animales infectados eliminan las brucelas a través de secreciones como la leche, exudados vaginales y orina, pero la mayor cantidad de microorganismos es excretado mediante el aborto o incluso durante el parto. Representan de esta forma los productos y los loquios de los mismos, un foco de infección para el resto de animales que integran el hato, donde se contamina la pastura, agua e instalaciones, propiciando así la entrada por vía oral, aunque existen otras vías de transmisión como la exposición conjuntival, la inhalación, el contacto a través de la piel, el semen, en el caso de las terneras pueden adquirir la infección en útero o por ingestión de leche contaminada, a través de la vía congénita (7, 12, 14, 16).

PERIODO DE INCUBACIÓN.

El periodo entre la exposición a B. abortus y la aparición de respuestas clínicas o serológicas es muy variable. Está influenciado por la gestación, número y virulencia de las bacterias, edad, vacunaciones previas. Thomsen (1950) encontró que el periodo de incubación era inversamente proporcional al estado de desarrollo fetal en el momento de la exposición. Variaba de 53 a 251 días (16).

PATOGENIA

Las brucelas al introducirse a los tejidos a través de las mucosas, son fagocitadas por los macrófagos pero resisten la destrucción celular interior, por lo tanto permanecen a salvo de los mecanismos de defensa por largos períodos de tiempo pudiéndose multiplicar dentro del fagocito ya que es un parásito facultativo y que puede vivir dentro o fuera de las células, esta relación huésped-parásito es muy compleja por lo que el período de incubación es variable.

Las bacterias que se multiplican en el interior del fagocito, llegan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales, ocasionando así una linfadenitis, donde algunas células mueren liberando bacterias y factores que activan la multiplicación de más mononucleares. Las células parasitadas que sobreviven son transportadas al torrente sanguíneo causando así una bacteremia, la que puede persistir por mucho tiempo. La diseminación hemática de las brucelas les permite llegar a los órganos y tejidos de su predilección como: bazo, nódulos linfáticos, glándula mamaria y especialmente útero grávido, placenta y tejidos fetales; en los machos, la bacteremia se localiza principalmente en tejido linfoide, testículos y glándulas accesorias. Esporádicamente se localiza en las estructuras sinoviales causando así una tendosinovitis, artritis o bursitis subcutánea principalmente tarsiana y carpiana (5, 7, 26, 29, 30, 31).

El tropismo de las brucelas hacia el aparato reproductor femenino se debe a la presencia de eritritol, azúcar que estimula considerablemente el crecimiento de esta bacteria (30, 31).

En el útero bovino gestante, crece la bacteria dentro de las células del epitelio coriónico, provocando una reacción inflamatoria. Esencialmente en los placentomas, las bacterias penetran y se multiplican dentro del citoplasma de las células epiteliales coriónicas. De esta forma las células parasitadas pueden necrosarse y desprenderse de la membrana basal de las vellosidades del corion, esto provoca trastornos en la nutrición del feto que a su vez puede contraer la enfermedad ya sea por vía sanguínea, cuando las brucelas entran al torrente sanguíneo a través de las vellosidades o por vía digestiva, o al deglutir el líquido amniótico rico en gérmenes.

Al presentarse la inflamación de las envolturas fetales (placentitis), se producen trastornos en la respiración y en la nutrición del feto, provocando anoxia y muerte de éste. El feto muerto constituye un cuerpo extraño que es expulsado, las lesiones placentarias provocan generalmente retención completa o fragmentos de la misma, dando lugar a una sepsis local. En la mayoría de las vacas se presenta el aborto tardío en las primeras gestaciones (6 ó más meses); al desarrollar

suficiente inmunidad después de dos o tres abortos, la vaca logra llegar al término de las gestaciones sucesivas.

En el caso de las hembras no gestantes la enfermedad puede permanecer latente y desarrollarse hasta el momento de la gestación, o en su defecto se localiza en la glándula mamaria y ganglios linfáticos adyacentes, ocasionando una mastitis intersticial.

En los machos, la infección se localiza en los testículos, epidídimo y glándula accesorias y adquiere generalmente carácter de tipo crónico.

Los bovinos jóvenes muestran una relativa insensibilidad hasta que alcanzan la pubertad. Pueden ser infectados por vías y procesos como los descritos anteriormente, incluyendo la ingestión de leche contaminada, pero la infección desaparece en el curso de pocos meses (16, 29, 35, 37, 41).

SIGNOLOGÍA CLÍNICA.

La signología específica de la enfermedad la constituye el aborto tardío repentino y repetitivo a lo largo de la vida productiva del animal, donde generalmente ocurre en el último tercio de gestación, frecuentemente se relaciona con retención placentaria, resultando una metritis. Es frecuente la infección permanente de la glándula mamaria y ganglios linfáticos supramamarios, con cantidades constantes o intermitentes de bacterias en la leche. Las alteraciones inflamatorias de la glándula mamaria infectada reducen la producción de leche en una proporción estimada en el 10% (23, 29, 43).

En los machos, se observan ocasionalmente orquitis y epididimitis, afectándose los sacos escrotales con tumefacción aguda y dolorosa, hay vesiculitis y como consecuencia: esterilidad. Estos animales se consideran como propagadores potenciales si se utilizan para fines de inseminación artificial. En forma menos común se presentan sinovitis e inflamación de tipo higromatoso sobre todo en rodillas (5, 7, 11).

DIAGNÓSTICO.

Es difícil precisar el diagnóstico clínico de la causa del aborto en un animal aislado o en un grupo de bovinos, debido a la multiplicación de las mismas que lo pueden provocar. Para tal fin existen numerosas pruebas diagnósticas, que consisten en el aislamiento del agente causal y pruebas serológicas (3).

Las pruebas más útiles para el diagnóstico de la brucelosis bovina en las campañas de control son las serológicas, con las que se detectan anticuerpos específicos frente a Brucella en el suero sanguíneo.

Las pruebas serológicas no sólo deben identificar los animales que han estado en contacto con el antígeno; es preciso poder diferenciar los animales que han sido vacunados y están sanos de aquellos que habiendo sido vacunado o no están infectados.

Esto es debido a que la vacunación, incluida la realizada con cepas vivas, que es generalmente aceptada como la más efectiva no protege al 100% de los animales por lo tanto, la prueba serológica ideal sería aquella que fuese capaz de diferenciar los animales infectados de los vacunados, fuese simple de realizar y proporcionar los resultados con rapidez y repetibilidad (15, 38).

La diferenciación entre infectados de vacunados se realiza interpretando las pruebas serológicas en función del tipo de inmunoglobulinas, el antígeno empleado y el estado del animal. En bovinos está claramente demostrado que en los animales infectados y en los vacunados la respuesta humoral incluye las clases IgM e IgG; sin embargo en la vacunación, el nivel de anticuerpos cae rápidamente, de tal manera que a los seis meses no se encuentra IgG2 y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG1, a diferencia de los animales infectados, en donde persisten altos niveles de IgG1 e IgG2.

Tanto animales infectados como vacunados estimulan la aparición de IgM e IgG frente al lipopolisacárido (LPS), mientras que los anticuerpos frente al hapteno nativo (HN) y proteínas citoplasmáticas son solo de la clase IgG (2, 4, 15).

Berman y Jones (1979) observaron que el uso de hapteno nativo en una solución de gel agarosa la cual contenía un 10% de NaCl precipitaba rápidamente los anticuerpos, igual como lo haría el LPS. Pero Alonso y col., (1988) realizaron un estudio en donde observaron que la precipitación del hapteno nativo requiere de anticuerpos de alta afinidad y a títulos relativamente altos, en donde ambas circunstancias se logran solo con una exposición prolongada de la bacteria al sistema inmune como es el caso de una infección por cepa de campo se producen anticuerpos contra el hapteno nativo y no cuando se trata de una exposición temporal al microorganismo como es el caso de la revacunación con dosis reducida de B. abortus cepa 19.

El diagnóstico de brucelosis en bovinos se realiza por médicos veterinarios aprobados, se debe realizar en los laboratorios aprobados, por la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR) con muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y muestras de tejidos, mediante pruebas serológicas y estudios bacteriológicos.

Dentro de las pruebas inmunológicas que ayudan al diagnóstico de la brucelosis y que son autorizadas por la SAGAR se encuentran:

- Prueba en tarjeta
 - Prueba de rivanol
 - Prueba de fijación del complemento
 - Prueba de anillo en leche
- Cualquier otra prueba especial que se considere necesaria, conforme a las disposiciones de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (38).

PRUEBA DE TARJETA: También conocida con el nombre del antígeno acidificado, fue descrita por Rose y Roapke en 1957, es una prueba rápida que emplea un antígeno coloreado con Rosa de Bengala y suspendido en una sustancia amortiguadora con un pH de 3.6, la concentración de la B. abortus cepa 1119-3 es del 8%. La prueba es rápida, sensible y específica. Con los bovinos infectados experimentalmente, la reacción es positiva mucho antes que con la prueba de aglutinación en tubo y otras pruebas, esto se debe a que la acidez del antígeno inactiva a las IgM y solo deja aglutinar a las IgG (1, 26, 28, 30, 32).

PRUEBA DE RIVANOL: Esta prueba fue desarrollada por Anderson (1964), es un método cuantitativo y rápido, complementario a la prueba de tarjeta, para aquellos sueros que resultan positivos a ella. El reactivo de rivanol en una primera etapa precipita la albúmina y las macroglobulinas (IgM) del suero de bovinos, mediante el uso de cantidades iguales de suero y una solución al 1% de rivanol, queda un precipitado y un sobrenadante del cual solo se detectan exclusivamente las IgG.

Sin embargo, para que la prueba pueda ser efectiva se emplea un antígeno de B. abortus especial, que es altamente sensible, con el fin de compensar el efecto de la dilución de los anticuerpos (1, 2, 20, 44).

PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR) CON HAPTENO NATIVO (HN): Fue descrita originalmente por Díaz y col. en 1979. Es una prueba confirmatoria sencilla y económica que ha demostrado su efectividad en bovinos y caprinos. En el ganado bovino, la prueba presenta una alta especificidad para diferenciar animales con infección demostrada por aislamiento bacteriológico de los vacunados con cepa 19. En algunos estudios realizados por Berman y Jones mencionan que en la vacunación de adultos con la cepa 19, su especificidad es del 80%, superior al

66% de la Fijación del complemento. Esta prueba ha sido aplicada al diagnóstico de la brucelosis bovina dentro de programas de control con buenos resultados (4, 6, 15, 17, 24).

PRIMOAISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO: El diagnóstico bacteriológico es más seguro pero tardado, en el se aísla el microorganismo a partir de muestras obtenidas de animales que han resultado positivos en las pruebas serológicas. Actualmente se cuenta con medios de cultivo selectivos y enriquecidos que permiten un buen crecimiento en el primoaislamiento, inhibiendo eficazmente otros microorganismos contaminantes, el aislamiento de una cepa de Brucella spp implica su identificación y tipificación

El conocimiento de la especie y del biotipo es indispensable para el estudio de una población afectada. La existencia de excelentes medios selectivos permite aislar fácilmente las brucelas a partir de secreciones vaginales y de la leche de las vacas infectadas. El medio selectivo más utilizado para el aislamiento de Brucella es el medio Farrell creado en 1974. Hay métodos de tinción que permiten poner de relieve a las brucelas, pueden hacerse en frotis de membranas fetales, contenido gástrico de fetos, exudado vaginal, semen de carnero, etc. Los resultados positivos y negativos pueden confirmarse mediante el cultivo. En general se utilizan dos métodos: el método de Ziehl-Neelsen modificado y el de Köster modificado. (2, 5, 7, 11, 16, 40).

CONCEPTOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

Existen dos parámetros empleados para medir la capacidad de una prueba diagnóstica en cuanto a la diferenciación entre los animales que tienen la enfermedad y de los que no la padecen.

SENSIBILIDAD: Es la capacidad de la prueba para identificar de manera exacta a los animales que tienen la enfermedad, es decir, dar al individuo como positivo, se expresa en porcentaje.

ESPECIFICIDAD: Es la capacidad de la prueba para proporcionar datos negativos cuando los individuos investigados realmente no presentan la enfermedad problema, expresada también en porcentaje.

En la actualidad no existe una prueba diagnóstica para brucelosis que tenga 100% de sensibilidad y especificidad, sin embargo se requiere de sensibilidad y especificidad alta para el diagnóstico oportuno de cualquier enfermedad (36).

La sensibilidad y especificidad se calcula por medio de las siguientes fórmulas:

Sensibilidad: positivos verdaderos

$$\frac{\text{positivos verdaderos}}{\text{positivos verdaderos} + \text{negativos falsos}}$$

Especificidad: negativos verdaderos

$$\frac{\text{negativos verdaderos}}{\text{negativos verdaderos} + \text{positivos falsos}}$$

La brucelosis plantea un doble problema el sanitario y el económico:

a) Desde el punto de vista de la salud pública es transmitido directa o indirectamente del animal al hombre. Como la enfermedad no se transmite normalmente de un ser humano a otro, la profilaxis se reduce a la lucha y eliminación de la infección en los animales afectados.

b) Las principales pérdidas económicas por la brucelosis en los bovinos son por abortos o nacimientos prematuros, infertilidad, disminución en la producción láctea, castigo en el precio de los animales infectados y disminución de las ventas de leche y subproductos lácteos (30, 31).

En el hombre produce incapacidad laboral, con la consiguiente pérdida económica, una fuente importante de infección para el hombre es la leche de vaca, el contacto con fetos abortados o vacas del matadero, la característica de la enfermedad es una fiebre recurrente u ondulante, su distribución geográfica es mundial.

En México la brucelosis más común es la producida por B. melitensis (85%), aunque en el último año el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Nutrición, ha reportado un incremento en la frecuencia de B. abortus, según la Secretaría de Salud, se registran anualmente un promedio de 6,500 casos. Esta cifra representa sólo los casos registrados de pacientes que demandan atención médica, por lo que se considera que sólo representa al 30% de la población afectada.

Según la Dirección General de Epidemiología de México los estados del país con mayor incidencia de brucelosis en humano son: Guanajuato, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Zacatecas, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Cd. México y Oaxaca; recientemente se ha extendido hacia el sureste (3, 9, 30, 31).

Todos los animales infectados, enfermos o aparentemente sanos constituyen una fuente de infección potencial de brucelosis; pueden ser portadores del germen durante toda su vida y contagiar a otros animales; los microorganismos se excretan por productos de abortos, placentas, sémen, leche, heces y orina.

En México son excepcionales los lugares en donde no se presenta.

Los índices de prevalencia son menores en el norte del país, lo cual puede explicarse por las características ecológicas de aquellos lugares en donde los índices de los agostaderos impiden la elevada densidad de población bovina, por el contrario lo que sucede en las zonas de alta prevalencia en donde la densidad de población es elevada proporcionando la diseminación de la enfermedad (45).

Las vacunas juegan un papel muy importante en el control de la brucelosis, limitando su difusión y reduciendo su impacto económico.

La B. abortus cepa 19 fue desarrollada para la inmunización del ganado vacuno, existen muchas pruebas de que dicha cepa es estable y de que no recupera la virulencia, incluso después de pases repetidos en animales gestantes. La Campaña Nacional contra la brucelosis dispone para la vacunación en bovinos 2 tipos de vacunas con cepa 19; una considerada como vacuna en dosis clásica para vacunar becerras de 3 a 6 meses de edad que debe contener por lo menos 1×10^{10} UFC de Brucella por mililitro de vacuna reconstituida y se aplicarán subcutáneamente una dosis de 5 ml de vacuna de B. abortus cepa 19 (5×10^{10} UFC) no debe utilizarse en hembras mayores de 6 meses ni menores de 3 meses, ni animales gestantes o machos.

Existe otro tipo de vacuna para hembras mayores de 6 meses, incluso gestantes, denominada vacuna de dosis reducida, este tipo de vacuna puede aplicarse a partir de los 18 meses, en el caso de que hayan sido vacunadas con la dosis clásica a la edad de 3 a 6 meses, o bien puede aplicarse a hembras mayores de 6 meses que no recibieron la vacuna con dosis clásica, esta debe contener un título de 3×10^8 a 3×10^9 UFC por cada dosis, equivalente a 2 ml (30, 31, 38, 40).

Se ha demostrado que este tipo de vacuna provee una protección comparable a la de la dosis completa, con menos reacciones adversas tales como: menos reacciones posvacunales y una rápida disminución de los anticuerpos posvacunales. La vacunación de las terneras con cepas completas da una protección durante 5 o más preñeces y una seguridad de un 70 a 75% (3, 26).

Los hatos lecheros con repetidas inmunizaciones en un período corto de tiempo, tienen problemas de diagnóstico.

La revacunación única es una práctica reconocida por la Norma Oficial Mexicana contra la brucelosis, sin embargo no se conoce cual es la especificidad de las pruebas serodiagnósticas para poder llegar a diferenciar bovinos vacunados de infectados .

La revacunación es una herramienta poco estudiada ya que no se sabe a ciencia cierta si ayuda o no al control de la brucelosis, sin embargo, en la cuenca lechera de Tizayuca , Hgo se tomó la decisión de revacunar a todo el ganado a los 9 meses siguientes de la vacunación, fueron apareciendo nuevas vacas infectadas pero a pesar de esto el problema se redujo considerablemente.

Se optó entonces en 1983 por establecer un programa, fundamentando en vacunar becerras de 3 a 6 meses de edad con la vacuna estándar, todos estos animales serían revacunados con dosis reducida al entrar a su primer servicio de inseminación artificial. En ese año se sacrificaron 67 animales, lo que representa el 0.36% de la población.

Para 1987 solamente se presentaron 5 casos de vacas rectoras, es importantes señalar que esa cuenca está ubicada en una área enzoótica para brucelosis (30, 31).

OBJETIVO GENERAL.

Llevar a cabo la evaluación de la prueba de Inmunodifusión Radial con hapteno nativo, como prueba confirmatoria, para el diagnóstico de brucelosis, en un hato bovino vacunado y revacunado repetitivamente con la dosis reducida de Brucella abortus cepa 19 y que presenta problemas reproductivos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Evaluar las pruebas de tarjeta como tamiz y de rivanol como complementaria a esta, para determinar el porcentaje de animales positivos en un hato lechero con antecedente reproductivos y con repetidas revacunaciones con la dosis reducida de Brucella abortus cepa 19.

2.- Evaluar la prueba de Inmunodifusión Radial con hapteno nativo(HN), como prueba confirmatoria a las pruebas oficiales (Tarjeta y Rivanol) para diferenciar anticuerpos por vacunación de anticuerpos por infección.

3.- Realizar el estudio bacteriológico para intentar el aislamiento de Brucella y determinar si las cepas aisladas son vacunalés o de campo.

MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en un rancho ubicado en Cuautitlán, Edo. de Méx. El cual se encuentra a una altura de 2252 mts. sobre el nivel del mar, en un terreno plano con una inclinación del 5-10% aproximadamente. El clima que presenta es templado subhúmedo y lluvias en verano, la temperatura varía de entre 12 y 16° C y la precipitación pluvial varía de 600 a 800 mm.

Se utilizó un hato lechero de 300 vacas Holstein, 200 de ellas con diferente producción lechera, y el resto vaquillas de reemplazo y vacas secas, cuyas edades fluctúan entre los 2 y 6 años, vacunadas y revacunadas con la dosis reducida de B. abortus cepa 19, con antecedente de problemas reproductivos como son: abortos, expulsiones fetales y retenciones de placenta.

1.- Material y metodología para muestreo.

Se obtuvieron muestras serológicas de 300 bovinos, por punción en la vena coccígea, utilizando tubos vacutainer de plástico.

1.1.- Estudio serológico.

Se realizaron dos tomas de muestra a intervalo de 6 meses, obteniendo muestras serológicas de 300 bovinos, realizando la primera toma de muestras el día 01 de diciembre de 1995 y la segunda muestra tomada el día 09 de julio de 1996, siendo trabajadas ambas muestras en los laboratorios de la planta pasteurizadora Alpura. Se seleccionaron de este último muestreo 90 muestras serológicas de aquellos animales que presentaban antecedentes de problemas reproductivos recientes (aborto, retención de placenta y expulsión fetal).

Las muestras se mantuvieron en congelación, para ser sometidas a tres pruebas diferentes que fueron: Tarjeta, Rivanol e Inmunodifusión Radial (solo a las 90 muestras, para diferenciar a los animales infectados de animales vacunados).

Las muestras se trabajaron en los laboratorios del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SAGAR, Localizado en el Km. 15.5. de la carretera federal México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, México, D.F.

2.- Material y metodología para aislamiento.

Se obtuvieron 90 muestras de exudado vaginal y leche, obtenidas de los 4 cuartos de las vacas en producción, colocándolas en tubos de vidrio con tapón de rosca estériles, manteniéndolas

en congelación. Las muestras de exudado vaginal se depositaron en medios de Stuart, conservándose en refrigeración.

2.2.- Estudio bacteriológico.

Se intento el aislamiento de B. abortus, a partir de estas muestras, sembrandolas en medios selectivos de Farrel, el cual contiene:

1.- Base de agar Brucella.

2.- Suero de ternera estéril al 5%.

3.- Suplemento selectivo (Oxoid SR083A) conteniendo antibiótico y agentes antimicrobianos como:

- | | |
|---------------------|--|
| a) Bacitracina | 25 mil Unidades Internacionales/ml |
| b) Polimixina B | 5 mil Unidades Internacionales/ml |
| c) Cyclohexamida | 100 µg/ml |
| d) Vancomicina | 20 µg/ml |
| e) Ácido nalidixico | 5 µg/ml |
| f) Nistatina | 100 mil Unidades Internacionales/ml (1). |

Las muestras de leche fueron centrifugadas, sembrando la grasa y el sedimento, incubandolas a 37°C en condiciones de velobiosis (5-10% CO₂) durante 10 días aproximadamente.

A las colonias sospechosas se les realizaron las siguientes pruebas:

* *Tinción de Gram*: Para observar su morfología y pureza.

* *Pruebas bioquímicas*: Se realizaron las pruebas bioquímicas de: triple azúcar hierro (TSI), urea, ácido sulfhídrico, citrato y oxidasa.

* *Prueba de dependencia de colorantes*: A ambas muestras se les realizó la susceptibilidad a colorantes sembrándolas en medios de: Tionina, Safranina y Fucsina básica a diferentes concentraciones.

* *Prueba de reacción con antisueros monoespecificos*: Las muestras se sometieron a una reacción con antisueros A y M para conocer el biotipo al que pertenece la bacteria.

* *Prueba de fagotipificación*: Para la elaboración de esta prueba se emplearon los fagos: Wb, Tb, Iz Fi.

* *Prueba de sensibilidad a antibióticos*: Esta prueba se realizó como complemento a las pruebas bioquímicas, realizando el crecimiento en medios con penicilina, estreptomycin y meso eritritol para determinar si la cepa era vacunal o de campo (1).

PRUEBA DE TARJETA.

Se empleó el antígeno de PRONABIVE, para su realización se requirió de una pipeta micrométrica, con la cual se colocaron 30µl del suero problema sobre una placa de vidrio, agregando posteriormente 30µl del antígeno, se mezclaron y se agitaron durante 4 minutos por rotación, realizando la lectura con la ayuda de una fuente luminosa.

Interpretación de resultados:

Negativo (-): Color rosado uniforme sin aglutinación.

Positivo (+): Cualquier grado de aglutinación (1).

PRUEBA DE RIVANOL.

Se utilizó el antígeno de PRONABIVE, realizándola de la siguiente manera: se mezclaron 0.4 ml de suero problema con 0.4 ml de solución de rivanol, se dejaron reposar durante 30 min centrifugándose después a 3000 rpm durante 5 min. Posteriormente se tomó el sobrenadante con una pipeta de 0.2 ml y se hicieron las diluciones correspondientes (0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 ml) en una placa de vidrio, se agregaron 30µl de antígeno para la prueba de rivanol, se mezclaron de menor a mayor concentración, se agitaron 4 veces y se dejó reposar durante 6 min, la lectura se realizó con la ayuda de una fuente luminosa.

Interpretación de Resultados:

Negativa (-): No hay aglutinación.

Positiva (+): Hay aglutinación completa.

El resultado se expresa en función de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

En animales no vacunados cualquiera que sea el título obtenido (a partir de 1:25), se interpreta como infectado por el tipo de inmunoglobulinas que detecta (IgG).

En animales vacunados la aglutinación completa en 1:25 se considera sospechosa, pero a partir de 1:50 será positiva (1).

PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR) CON HAPTENO NATIVO (HN)

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO DE HN.

Se utilizó la cepa de *B. melitensis* 16M. Se realizaron cultivos para la preparación de extractos celulares, los cuales se mantuvieron a 37° C durante 48 h. Las células se cosecharon por filtración tangencial, en un sistema Pellicon (Millipore Corp), provisto de un filtro PTHK 000C5 (Millipore Corp).

Las células fueron resuspendidas en agua destilada en la proporción de 30 g de peso húmedo por 100 ml. Esta suspensión se esterilizó a 120 ° C durante 15 min y tras enfriarla a temperatura ambiente; los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12 x g durante 15 min.

El sobrenadante obtenido fue precipitado primeramente con tres volúmenes (300 ml) de etanol al 95 %, manteniendo la mezcla a 4° C durante 18 h, con agitación continua.

El precipitado (primer precipitado enriquecido en LPS), fue recolectado (5,000 x g, 4° C, 10 min) en agua destilada y dializada contra agua destilada (2 x 100 volúmenes), a 4° C y liofilizado. Al sobrenadante agua-etanol del primer precipitado, se le añadieron dos volúmenes (200 ml) de etanol al 95 % y la mezcla se mantuvo a -20°C durante 18 h. El precipitado resultante (segundo precipitado, HN) se recolectó por centrifugación (5.000 x g, 5°C, 5 min), se dializó contra agua destilada y se liofilizó. (13)

METODOLOGÍA DE LA IDR CON hapteno nativo (HN).

Preparación de las soluciones:

*** Solución A (solución amortiguadora de boratos glicina pH 7.8)

Glicina	7.13 g
Cloruro sódico	5.73 g
H ₂ O destilada	450 ml

Llevar el pH a 7.8 con Na Oh, 1 N (4 g/100 ml de H₂O)

Aforar con H₂O hasta 500 ml.

*** Solución B (Agarosa)

Agarosa (alta pureza)	0.8 g
Azida de sodio	50 mg
H ₂ O destilada	50 ml

Calentar H₂O, añadir azida y la agarosa agitando y calentar en baño María a 100°C hasta que quede transparente y sin grumos.

*** Solución C (Stock HN)

1 mg de HN en 1 ml de H₂O destilada.

Preparación del gel:

Suficiente para tres placas (3ml/placa) los cálculos son para 250 µg de HN/ml como concentración final. Habitualmente el título de HN es de este orden o inferior.

* * Disolver 1 g de NaCl en 5 ml de solución A.

- * * Añadir 200 μ l de la solución C a 5 ml de la sol A + NaCl, y mezclar.
- * * Calentar la mezcla anterior en baño María a 60 °C.
- * * Añadir 5 ml de solución B, previamente fundida y mezclar.
- * * Vertir la mezcla (con pipeta caliente) en las placas (3 ml/placa o cantidad que proporcione un espesor del gel de 2 mm).
- * * Dejar solidificar 15 min pero esperar 24 h antes de emplearlas.
- * * Las placas se pueden almacenar en refrigeración y cerradas durante 15 días.

Desarrollo de la Prueba:

Perforar pocillos con sacabocado a una distancia mínima de 4 mm entre ellos y extraer el gel con aguja o pipeta Pasteur conectada al vacío.

Llenar los pozos con suero (10-15 μ l) e incubar las placas cerradas a temperatura ambiente durante 24 h.

Utilizar un control de un suero positivo y un negativo.

*** Resultados e interpretación de la prueba:

Si los sueros son positivos, aparecerá un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo.

*** Realización de la Prueba con los sueros problemas:

Se utilizaron 4 placas de gel, las cuales contenían solución de antígeno de hapteno nativo (1 μ g/ml), solución de Inmunodifusión radial (IDR) de gel, solución amortiguadora de glicina. Se colocaron 0.02 ml de cada uno de los 90 sueros problemas en cada uno de los pozos que tienen las placas de gel, se dejaron incubando durante 24 h a temperatura ambiente, realizando la lectura al día siguiente (15, 16).

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en la primera toma de muestras de la población total (300 bovinos), fue realizado el 01 de diciembre de 1995, y nos muestra la situación en la que se encontraba el hato en relación a la presencia de Brucella, teniendo un 52.3 % de positivos a lo que se refiere a la prueba de tarjeta utilizada como tamiz y un 32.6% de positivos a la prueba de rivanol, considerando como positivos a todos aquellos animales con títulos mayores o iguales a 1:50. (CUADRO 1)

De acuerdo a los resultados recabados de la primera toma de muestras se llevo a cabo un segundo muestreo de toda la población, el cual se realizó el 09 de julio de 1996, observando una disminución de reactores positivos a las pruebas iniciales, en donde se obtuvo un 45% de positivos a tarjeta y un 23.6% de vacas positivas a rivanol. (CUADRO 2)

De los resultados obtenidos en el último muestreo, se seleccionaron 90 sueros de aquellos animales con problemas reproductivos recientes (aborto, expulsión fetal y retención de placenta) y que recibieron más de una revacunación, obteniendo un 97.8% de vacas positivas a tarjeta y un 76.4% de positivos a rivanol, llevando estos últimos a la prueba de inmunodifusión radial para diferenciar a los verdaderos animales infectados de los vacunados, encontrando un 21.1% de positivos a dicha prueba. (CUADRO 3)

Del estudio bacteriológico realizado a las 90 muestras de exudado vaginal y leche solamente se lograron aislar tres (3.3%) cepas de campo de B. abortus biotipo I.

CUADRO I.

**RESULTADOS A LA PRUEBA DE TARJETA Y RIVANOL DEL
PRIMER MUESTREO REALIZADO EL 1 de diciembre de 1995
DE 300 BOVINOS**

RESULTADOS	TARJETA	RIVANOL
POSITIVOS	157 (52.3%)	98 (32.7 %)
NEGATIVOS	143 (47.6%)	202 (67.3 %)
TOTAL	300	300

NOTA: En la prueba de rivanol se dieron como positivos con títulos \geq de 1:50.

CUADRO 2.

RESULTADOS A LA PRUEBA DE TARJETA Y RIVANOL DEL SEGUNDO MUESTREO REALIZADO EL 9 de julio de 1996

RESULTADOS	TARJETA	RIVANOL
POSITIVOS	135 (45 %)	71 (23.7 %)
NEGATIVOS	165 (55 %)	228 (76.3 %)
TOTAL	300	300

NOTA: En la prueba de rivanol se dieron como positivos con títulos $\geq 1:50$.

CUADRO 3.

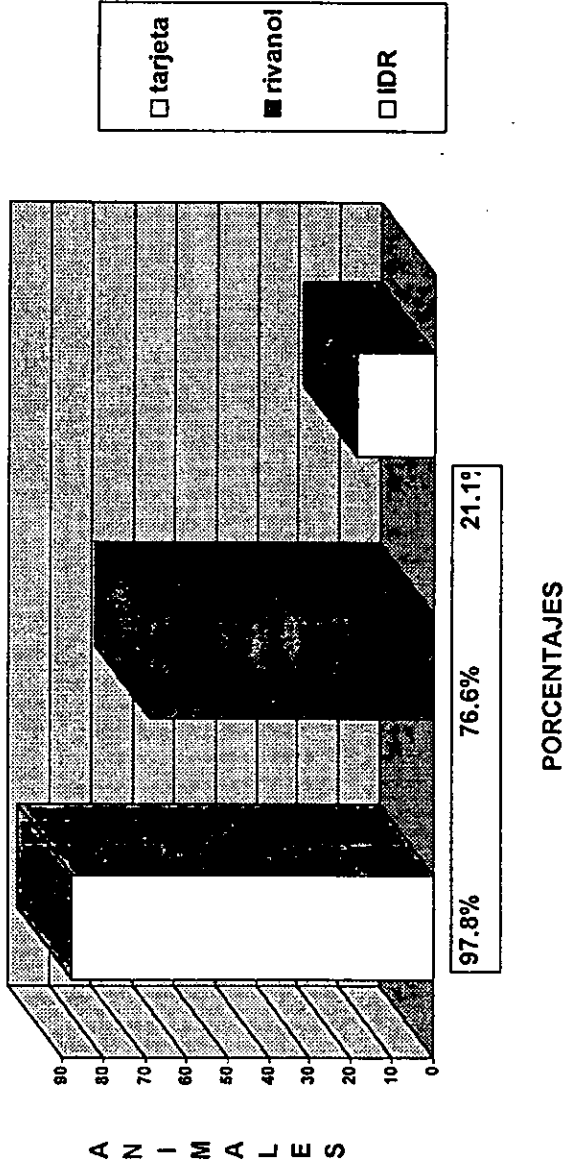
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE TARJETA, RIVANOL E INMUNODIFUSIÓN RADIAL DE 90 VACAS CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS Y REPETIDAS REVACUNACIONES.

RESULTADOS	TARJETA	RIVANOL	IDR
POSITIVOS	88 (97.8 %)	69 (76.7 %)	19 (21.1 %)
NEGATIVOS	2 (2.2 %)	21 (23.3 %)	71 (78.9 %)
TOTAL	90	90	90

NOTA: Los sueros positivos en rivanol fueron considerados desde títulos $\geq 1:50$

GRAFICA I.

PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS A LAS PRUEBAS DE TARJETA, RIVANOL E INMUNODIFUSIÓN RADIAL EN 90 ANIMALES CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS



DISCUSION.

Pinochet y col., (1991) realizaron un estudio en hembras adultas, a las cuales revacunaron con dosis reducida (4.5×10^8 UFC) por vía conjuntival, las cuales habían sido vacunadas con dosis completa de B. abortus cepa 19, entre los 3 y 8 meses de edad, formando 2 grupos, uno experimental revacunado y un grupo control, realizaron muestreos periódicos, llevando a cabo pruebas serológicas para dar seguimiento a la curva de anticuerpos, encontrando que en los animales revacunados no se presentó ningún caso, a diferencia del grupo control, en el cual algunos animales se llegaron a infectar.

Aparicio (1997) llevó a cabo un estudio serológico y bacteriológico en un hato bovino con problemas de brucelosis, los que revacunó con dosis reducida de B. abortus cepa 19, a una población de 72 vacas vacunadas con dosis normal de cepa 19 de B. abortus, entre los 3 y 6 meses de edad, revacunándolas con dosis reducida (3×10^9 UFC/ml) por vía subcutánea, en edad adulta, empleando diversas pruebas serológicas, para conocer la especificidad de esta, en donde no se presentaron nuevos reactores a la enfermedad después de la revacunación.

Flores (1980) en la cuenca lechera de Tizayuca Hgo, realizó un estudio en donde vacunó becerras de 3 a 6 meses con dosis normal ($5-6 \times 10^9$ UFC) de cepa 19 de B. abortus en donde observó que la prevalencia y el número de vacas seropositivas aumentó, decidiendo revacunar a todo el ganado con dosis reducida (3×10^9 UFC) por vía subcutánea, tomando a la vez medidas de prevención más estrictas, logrando con esto que el número de animales desechados disminuyera.

Por lo tanto estos estudios muestran que el empleo de la revacunación única además de estar autorizada por la Norma Oficial Mexicana, puede ser una práctica útil que puede emplearse como ya lo demostraron los autores anteriores en hatos localizados en zonas enzoóticas, en donde los animales se encuentren más expuestos a contraer la infección y cuando el uso de la vacunación única con dosis normal no proporcione la protección necesaria.

Pero el empleo de la revacunación repetida, como es el caso del estudio que realizó, en donde se trabajaron con animales que habían recibido más de una revacunación (2 a 6) si es una práctica que además de no estar autorizada hasta el momento por la Norma Oficial Mexicana, presenta desventajas las cuales dificultan el diagnóstico de brucelosis.

El uso de una revacunación constante puede llegar a provocar en los animales un respuesta de hipersensibilidad tardía o tipo IV debido a la constante administración del antígeno (10, 19, 31).

La revacunación dificulta el diagnóstico serológico, debido a la persistencia de anticuerpos, los métodos o pruebas convencionales no permiten diferenciar a corto plazo entre la persistencia de

títulos vacunales residuales y los originados por una infección de campo, esto impide la eliminación temprana de animales positivos a infección natural. (25)

La revacunación repetida puede provocar un aumento en la posible eliminación del microorganismo vacunal a través de la leche, ya que con una sola revacunación se presenta desde un 0.5% a un 2% en vacas revacunadas con dosis reducida (27).

Dentro de cualquier hato bovino, el uso de la revacunación repetida provoca un aumento en los gastos de inversión, originando por lo tanto un desequilibrio económico para el ganadero.

La prueba de tarjeta es una de las pruebas oficiales según la Norma Oficial Mexicana para el diagnóstico de brucelosis bovina, y mostró en este estudio una especificidad de 51% en los dos primeros muestreos y un 2.2% en los 90 animales que presentaron problemas reproductivos, cabe destacar que el hato se encuentra es una zona donde la prevalencia es baja, lo que difiere con estudios realizados por Nicoletti y col.,1996; Morgan y col., 1969; Davies y col., 1997; Pinochet., 1991; en donde trabajaron con la prueba de tarjeta en becerras vacunadas con dosis completa (5 x 10⁹ UFC) cepa 19 de B. abortus y revacunadas con dosis reducida de B. abortus, realizando un solo muestreo, obteniendo hasta un 45% de especificidad, dada por la respuesta posrevacunación y a la alta prevalencia de brucelosis que existía en la zona donde se encontraba el hato.

Esto demuestra que la prueba de tarjeta es la que tiene menos capacidad para diferenciar a los animales infectados de los revacunados, ya que es una prueba que detecta la presencia de cualquier tipo de anticuerpo circulante, ya sea de origen vacunal, por infección ó por cepas de campo, dando un alto número de falsos positivos (28).

Como se puede observar también en el estudio, la prueba de tarjeta puede dar como positivos a los 9-10 meses posrevacunación, que fue lo que sucedió con algunos de los 90 animales con problemas reproductivos, que dieron como positivos, cuando en los estudios anteriores, algunos de ellos habían sido negativos.

La Norma Oficial Mexicana (NOM) contra la brucelosis bovina establece a la prueba de rivanol como una prueba complementaria a la de tarjeta, siendo de tipo cuantitativa, y que se realiza para diferenciar animales vacunados de infectados.

Reyes (1996) realizó un estudio en un hato bovino de Cuautitlán, en donde obtuvo una especificidad del 95% en la prueba de rivanol a los 210 días posvacunación con dosis normal de cepa 19 de B. abortus.

García y col.,1993; elaboraron un estudio en Tamaulipas en donde encontraron una especificidad del 75% a rivanol a los 250 días posvacunales.

Aparicio (1997) obtuvo también una especificidad del 85 % a los 270 días posrevacunación en un hato bovino con problemas de brucelosis .

La prueba de rivanol en el estudio realizado proporciona un 73% de especificidad, esta prueba es considerada como una de las pruebas complementarias para diferenciar a los animales infectados de los vacunados, pero igualmente que en los casos anteriores esta prueba no fue efectiva para diferenciar los anticuerpos de infección de los anticuerpos vacunales, esto puede deberse a la respuesta que da la revacunación , en donde se provoca la producción de anticuerpos de tipo IgG en mayor cantidad y IgM en menor cantidad, es por ello que la prueba de rivanol al detectar solamente anticuerpos IgG de tipo "infeccioso" llegue a reaccionar ante los anticuerpos que se dan por la revacunación dando así, resultados falsos positivos.

Díaz (1993) realizó un estudio empleando diferentes polisacáridos y sueros de vacas infectadas con B. abortus biotipo 1, teniendo un grupo control y un grupo experimental, observando que la IDR da en los bovinos vacunados una alta especificidad y en los infectados una alta sensibilidad, principalmente cuando se utiliza HN. de B. melitensis 16M.

Berman y Jones (1979) realizaron un estudio con 23 vacas preñadas, las cuales fueron vacunadas con dosis reducida (5×10^9 U.F.C./ml) y a las cuales se les realizaron muestreos periódicos, realizando la prueba de tarjeta, rivanol y fijación del complemento, realizando la prueba de inmunodifusión radial a todos los animales positivos a rivanol, demostrando que la IDR fue la que menos resultados falsos positivos presento, seguida de la fijación de complemento, llegando a la conclusión que la IDR tiene la capacidad para descubrir animales positivos después de la vacunación con dosis reducida.

Reyes (1996) realizó un estudio en donde probó la especificidad y sensibilidad de diferentes pruebas diagnósticas en becerras de 3-9 meses vacunadas con dosis normal de cepa 19 de B. abortus encontrando que la prueba de IDR fue la segunda prueba más específica para diferenciar animales infectados de vacunados después de ELISA-C ya que detectó solo 7 muestras como positivas a los 30 días después de la vacunación.

Aparicio (1997) realizó un estudio en bovinos revacunados con dosis reducida cepa 19, realizando muestreos periódicos obteniendo que la IDR resulto ser positiva en 6 animales infectados 30 días posrevacunación.

Estos estudios realizados sobre la prueba de Inmunodifusión Radial tienen relación con el trabajo realizado, ya que al igual que ellos los animales eran revacunados, pero con la diferencia de que estos animales contaban con más de una revacunación (2 a 6), la IDR pudo en realidad

diferenciar a los animales infectados de los vacunados, mostrando un 79 % de especificidad, la cual se debe al empleo del hapteno nativo. Berman y Jones (1979) encontraron que el empleo del hapteno nativo en una solución de gel de agarosa la cual contenía un 10% de NaCl precipitaba rápidamente los anticuerpos, de igual manera como lo haría el LPS.

Algunos de los resultados positivos que se obtuvieron con la IDR coincidieron con el aislamiento que se realizó.

Angulo y col., 1982; realizaron un estudio en el Estado de México, en donde recolectaron 100 muestras de leche, sembrándolas en medios Farrell, de los 100 aislamientos de B. abortus en 61 casos se determinó el biotipo; 34 de ellos correspondieron al biotipo 4; 24 al biotipo 1 cepa de campo. Los biotipos 2, 7 y 9 se aislaron en una ocasión y en ningún caso se recuperó cepa vacunal.

En este trabajo se obtuvo que en el estudio bacteriológico realizado a las 90 muestras de exudado vaginal y leche solo se lograron aislar 3 cepas de campo de B. abortus biotipo 1, en este caso tampoco se pudo recuperar cepa vacunal.

Lo cual resulta comprensible considerando el bajo porcentaje de eliminación del microorganismo vacunal a través de la leche.

CONCLUSIONES.

El repetido uso de la revacunación de hembras adultas con dosis reducida (3×10^9 UFC) cepa 19 de B. abortus dificulta el diagnóstico y la capacidad de diferenciar entre animales infectados de los revacunados.

El empleo de la revacunación repetida es una práctica no autorizada por la Norma Oficial Mexicana, pero la revacunación única sí sería un método ideal para aplicarlo en hatos localizados en zonas endémicas, en donde los animales se encuentren en mayor riesgo de contraer la infección y cuando la vacunación única con dosis clásica (5×10^{10} UFC) sea insuficiente para prevenir a los animales contra la brucelosis.

La prueba de Inmunodifusión Radial es una prueba barata y que presenta alta sensibilidad y especificidad, la cual puede ser considerada como una prueba de gran valor, ya que puede ser utilizada en áreas donde se lleva a cabo la revacunación de ganado adulto, en donde este sistema en ocasiones puede provocar dificultad para diferenciar a los animales que se encuentran infectados de los animales vacunados y que dificulta su diagnóstico por las pruebas oficiales, las cuales en ocasiones proporcionan falsos positivos.

El empleo de una prueba diagnóstica tamiz como es la prueba de tarjeta aunada a la IDR podría ser una herramienta útil dentro de un programa de control en grandes hatos bovinos y en áreas donde la incidencia sea demasiada alta.

LITERATURA CITADA.

- 1.- Alton, G.G. and Jones, L. M.: Laboratory Techniques in Brucellosis, 2nd de. FAO-WHO. Geneve. 1976.
- 2.- Aparicio, B. A.: Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con problemas de brucelosis revacunado con dosis reducida de cepa 19 de Brucella abortus. Tesis de Licenciatura. FES-C UNAM. 1997.
- 3.- Avila, G.J.: Abortos causa y prevención. FMVZ. XIX. Congreso Nacional de Buiatria. 1995.
- 4.- Berman, D., Jones, L.: Radial immunodiffusion a confirmatory test bovine brucellosis. Ann. Sci. 6: 271-286. 1980.
- 5.- Biberstein, E.L.: Review of veterinary microbiology. Blackwell Scientific Publications. 1990.
- 6.- Blasco, J. M., Díaz, A. E., Díaz, R., Marín, C., Moriyón, I.: Diagnóstico de Brucella melitensis en ovinos usando inmunodifusión radial con hapteno nativo. CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR. 1995.
- 7.- Blood, D. C.: Medicina veterinaria. 5a de. Interamericana. México, 1985.
- 8.- Boschiroli, L.: Construcción y caracterización de una mutante de Brucella abortus por inactivación de un gen que codifica una proteína de 26 kDa. Arch. Med. Vet. 27: 103-111. 1995.
- 9.- Campos, L.H.: La Salud Animal en México. Informe Anual de la dirección General de Salud Animal, D.G.S.A, SARH, México, 1994
- 10.- Campos, S. A.: Protección postvacunación de vacas adultas con Brucella abortus cepa 19 en dosis reducida. Ava. Cien. Vet. 7: 95. 1992
- 11.- Carter, G. R., Chengappa, M. M.: Essentials of veterinary bacteriology. México. 1991
- 12.- Claro, M. A.: Determinación de incidencias de Brucelosis en ganado bovino lechero en la región de Ixmiquilpan, Edo. Hgo. (Valle Mezquital). Tesis de licenciatura. FES-C. UNAM. 1988.
- 13.- Cheville, F. N.: Development of vaccines and diagnostic reagents for eradication of Bovine Brucellosis. Agri-practice. 14: 9-13. 1993.
- 14.- Díaz, A. E.: Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina. Tesis doctoral. Navarra, Esp. 1993.
- 15.- Díaz, A. E., Hernández, A. L.: Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para el diagnóstico de brucelosis. CENID- Microbiología, INIFAP- SAGAR.
- 16.- Díaz, R., Blasco, J.: Diagnóstico inmunológico. Bovis. 9: 55-69. 1986.

- 17.- Diaz, R.; Garatea, P.; Jones, L.; Moriyón.: Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for the differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.* 10: 37-41. 1979.
- 18.- Dieguez, B. E.: Presencia de anticuerpos contra *Brucella* en los animales del zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México. Tesis de licenciatura. FMVZ. UNAM. 1995.
- 19.- Domínguez, L. O.: Revacunación de terneras con *Brucella abortus* cepa 19 en dosis reducida. *Ava. Cién. Vet.* 7: 96. 1992.
- 20.- Falcón, A.; García, L.; Rosales, J.: Prevalencia de brucelosis en tres municipios del sur de Tamaulipas. *Téc. Pecu. Méx.* 31: 97-101. 1993-
- 21.- Folch, H.: Propiedades mitogénicas y caracterización de diferentes fracciones polisacáridas obrenidas de dos especies de *Brucella*. *Arch. Med. Vet.* 27: 85-92. 1995.
- 22.- Gómez, H. P.: Mecanismos de protección inducidos por proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepa RB51. *Arch. Med. Vet.* 27: 65-75. 1995.
- 23.- González, G. A.: Estudio de la prevalencia de brucelosis bovina en el Ex-Lago de Texcoco, Méx. Tesis de licenciatura. FES-C. UNAM. 1984.
- 24.- González, S. E.: Determinación de brucelosis en cabras empleando la prueba de inmunodifusión radial y el antígeno Poli-B. Tesis de licenciatura. FES-C. UNAM. 1989.
- 25.- Hitos, F.; García, S.; Angulo, G.: Aislamiento de *Brucella abortus* biotipos 1, 2, 4, 7 y 9, a partir de muestras de leche procedentes de bovinos Holstein adultos revacunados con dosis reducida de la cepa 19 y su relación con la prueba de fijación del complemento. *Vet. Méx.* 14: 35-38. 1983.
- 26.- Juárez, P. M.: Empleo de antígenos solubles de *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* para diferenciar bovinos infectados de vacunados, utilizando la prueba de inmunodifusión doble. Tesis de licenciatura. FMVZ. UNAM. 1982.
- 27.- Luna, J. E.; Jaramillo, C. J.: Estudio de la brucelosis en hatos lecheros en una zona conurbada de la Ciudad de México. *Vet. Méx.* 27: 11-116. 1992.
- 28.- Mancera, M. A.: Pueba de antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta. Curso teórico práctico de diagnóstico de brucelosis animal. SARH, México. 19-21. 1994.
- 29.- Manual Merck de veterinaria 7a. De Merck and Co., Inc., New Jersey, USA. 1988.
- 30.- Material para actualización técnica en brucelosis y tuberculosis bovina. "Programa de acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas". SARH, México. 1990.
- 31.- Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis y brucelosis bovina. FMVZ, SARH. 1994.

- 32.- Morgan, B. M.: The Rose Bengal Okate Agglutination Test in the Diagnosis of Brucellosis. *Vet. Rec.* 85: 636-641. 1969.
- 33.- Morgan, W.J.: "the diagnosis of *Brucella abortus* infection in Britain". *Bovine Brucellosis: An International Symposium, Crawford Hidalgo*, 21-29, 1977.
- 34.- Morilla, G. A.: *Manual de Inmunología*. 2a. ed. Diana. México. 1986.
- 35.- Morín, R. J.: Prevalencia de tuberculosis y brucelosis bovina en la unión de productores de leche de valles centrales de Oaxaca. Tesis de licenciatura. FES-C. UNAM. 1995.
- 36.- Morton, R.F.: *Bioestadística y Epidemiología*, 2a edición, México D.F., Editorial Interamericana. 5920.
- 37.- Nicoletti, P.: Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. *JAVMA*. 178: 143-145. 1981.
- 38.- Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis en Animales y su Prevención y Control en Humanos. 1996 Diario oficial de la Federación. 20 de Agosto, México.
- 39.- Oñate, A. A.: Proteína de 18.5 kDa un antígeno interesante en *Brucella*. *Arch. Med. Vet.* 27: 93-102. 1995.
- 40.- Pérez, P. J.: Evaluación serológica de la vacuna de *Brucella abortus* cepa rugosa mutante por transposición en un hato de bovinos con brucelosis. Tesis de Licenciatura. FES-C UNAM. 1997
- 41.- Reyes, P. R.: Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina. Tesis de licenciatura. FES-C UNAM. 1996.
- 42.- Suárez, G. F.: Descripción y Generalidades de Brucelosis. Curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis y brucelosis. SARH-FMVZ, 165-171. México, D. F. 1994.
- 43.- Trenado, P. S.: Producción bovina. Informe de servicio social, actividades desarrolladas en los subprogramas de leche de calidad, nutrición y reproducción. Tesis de licenciatura. FES-C. UNAM. 1997.
- 44.- Vázquez, J.: Preparación de antígenos rugosos y diagnósticos de la brucelosis. Memorias del curso teórico práctico y diagnóstico de brucelosis animal. CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR. 1994.
- 45.- Xolalpa, C. V.: Evaluación financiera de un programa de control de la brucelosis bovina en la comarca lagunera (1987-1990). *Vet. Méx.* 24: 127-134. 1993