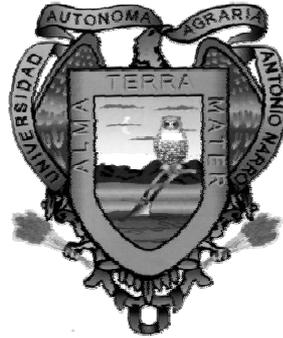


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

UNIDAD LAGUNA

División Regional de Ciencia Animal



**“IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS EN BOVINOS PRODUCTORES DE
LECHE EN MÉXICO”.**

POR:

HÉCTOR COLÍN GÓMEZ

MONOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

UNIDAD LAGUNA

División Regional de Ciencia Animal

MONOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA

**“IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS EN BOVINOS PRODUCTORES DE
LECHE EN MÉXICO”**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA

PRESIDENTE DEL JURADO

DR. JESÚS ENRIQUE CANTU BRITO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

M. V. Z. JOSE LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

UNIDAD LAGUNA

División Regional de Ciencia Animal

MONOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA

**“IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS EN BOVINOS PRODUCTORES DE
LECHE EN MÉXICO”**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA

ASESOR PRINCIPAL

DR. JESÚS ENRIQUE CANTU BRITO

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

"ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

División Regional de Ciencia Animal

MONOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA

POR

HÉCTOR COLÍN GÓMEZ

**“IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS EN BOVINOS PRODUCTORES DE
LECHE EN MÉXICO”**

**MONOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA ELABORADO BAJO LA SUPERVISIÓN
DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA Y APROBADA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOOTECNISTA

PRESIDENTE: DR. JESÚS ENRIQUE CANTU BRITO

VOCAL: MVZ. RODRIGO SIMON ALONSO

VOCAL: IZ. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS

VOCAL SUPLENTE: MC. JOSE DE JESUS QUEZADA AGUIRRE

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2008

Agradecimientos

A Dios:

Por darme la oportunidad de estar vivo y a través de él encontrar la salida cuando creía no encontrarla, en esos momentos de desesperación, encontrar en él, calma y tranquilidad gracias Dios por cuidar de mí.

A mis padres:

Por haberme dado la vida, por haber cuidado de mí durante muchos años tan difíciles gracias mamá por nunca darte por vencida y estar siempre tratando de darnos lo mejor, gracias por sacrificar lo tuyo para dárnoslo a nosotros. Gracias papá por haber hecho de mí una persona con principios por haberme enseñado a respetar para ser respetado.

A mi flaca:

Gracias luz por haber estado estos tres últimos años conmigo, gracias por soportarme todo este tiempo, por ayudarme en todo y por estar ahí cuando te necesitaba, gracias mi flaca eres la mujer que nunca pensé conocer.

A mis compañeros, amigos, maestros y a mi alma terra mater:

Por compartir las clases y gran parte de su vida conmigo en esta nuestra universidad, muchas experiencias que quedan grabadas buenas y malas gracias por estar siempre, siempre compartiendo.

DEDICATORIAS

A mis padres

El señor J. Refugio Colín Bernal y la señora Elena Gómez Alcántara, por haberme dado todos estos años de estudios y por alentarme a seguir cuando yo quería dejar los estudios ya que sin la ayuda de ustedes esto jamás hubiera sido posible, espero haber logrado darles una satisfacción. A Dios le pido que me los cuide y permita estar muchos años más juntos.

A mis hermanos

A mis hermanas Verónica y Jaqueline quienes son las mujeres más lindas, a ellas por ser como son conmigo espero nunca cambien y sigan siendo tan sencillas y humildes como siempre, para ustedes con mucho cariño. A mis dos hermanos Ricardo y Cuco por aquellos años en la infancia y por siempre apoyarme.

A mis primos, primas, familia y a mis amigos.

A todos los que creyeron en mí y que me dieron de alguna forma su apoyo.

INDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivos específicos.....	2
3. HISTORIA.	3
3.1. Brucelosis en México.....	5
4. IMPORTANCIA.	8
5. ETIOLOGIA.	9
5.1. Prevalencia en humanos	10
5.2. Fuentes de infección y la transmisión	10
5.3. Otras fuentes de contaminación y transmisión	11
5.4. Vías de penetración.....	12
6. PATOGENIA Y SIGNOLOGIA.	14
6.1. Respuesta inmune.	15
6.2 Signos.	16
7. DIAGNOSTICO	17
7.1. PRUEBA DEL ANTÍGENO BRUCELAR AMORTIGUADO O DE TARJETA.....	18
7.1.1. Introducción.	18
7.1.2. Material	19
7.1.3. Metodología	21
7.2. PRUEBA DE RIVANOL	22
7.2.1. Fundamento de la prueba.....	22

7.2.2. Reactivos para la prueba	23
7.2.3. Procedimiento de la prueba	24
7.2.4. Interpretación de la prueba	25
7.3. FIJACION DE COMPLEMENTO	26
7.3.1. Fundamento de la prueba.....	26
7.3.2. Materiales y métodos	27
7.3.3. Procedimiento de la prueba	29
7.3.4. Calculo de la dilución de trabajo	32
8. VACUNACION	36
8.1. VACUNA CEPA 19	37
8.2. VACUNA RB51	39
9. PROGRAMA DE CONTROL Y ERRADICACION.	42
10. CONCLUSIONES.	43
11. REFERENCIAS.	45

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

1. Tabla 1.- Análisis de costos de un aborto producido por brucelosis en una vaca o vaquilla a los 6.5 meses de gestación, bajo las condiciones de la Comarca Lagunera. (I/1998)	8
2. Figura 1. Prueba de tarjeta, donde se muestran material, sueros, antígenos al 3 y 8% así como una reacción positiva y negativa.....	22
3. Tabla 2.- Interpretación de la prueba de rivanol.....	25
4. Figura 2.- Antígeno y solución para realizar la prueba de rivanol en bovinos.	26
5. Tabla 3. Titulación del complemento	31
6. Tabla 4.- Titulación del complemento (cálculo de c'h50)	32
7. Tabla 5.- Preparación de diluciones de hemolisina	33

01.- INTRODUCCION

También conocida como enfermedad de Bang, fiebre ondulante y aborto contagioso, causado por bacterias del genero Brucella. Es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano que se caracteriza por producir problemas reproductivos y productivos que afectan a gran parte de los animales domésticos y al hombre por lo que se le considera una zoonosis de gran importancia.

Las bacterias del genero Brucella sp. Cocobacilos gram negativos no esporulados, sin capsula, aflajelados, no productores de toxinas, son parásitos intracelulares facultativos, muy resistentes a temperaturas extremas. La brucelosis bovina es causada en la mayoría de los casos por Brucella abortus siendo una enfermedad enzootica que presenta una distribución mundial aun cuando hay varios países y regiones del mundo en donde ha sido erradicada.

La brucelosis es una enfermedad que se ha observado desde tiempos antes de Cristo pero no fue sino hasta 1886 que Bruce aisló por primera vez el agente etiológico de la brucelosis a partir del bazo de un soldado que murió de la infección.

La principal forma de transmisión son los partos, abortos o desechos vaginales de animales infectados entre los que entran las placentas que son una fuente importante de contaminación y los perros o carnívoros que contribuyen de manera indirecta a la transmisión por el acarreo de las mismas en el hato. La vía de entrada es a través de las mucosas orales, respiratorias, conjuntivales, la ingestión de alimentos y agua contaminadas con heces, orina o secreciones uterinas. Los recién nacidos se infectan principalmente por el consumo de calostro o leche contaminada.

La Brucella abortus es una bacteria que causa grandes pérdidas económicas a los establos, en las vacas produce abortos a partir del quinto mes de gestación lo que

nos resulta en ciclos reproductivos más largos y costosos, crías débiles y alta mortalidad de becerras, baja la producción de la leche viéndose hasta en un 30%, baja la fertilidad aumentado los gastos por inseminación también se incrementan los gastos por medicamentos.

Para el manejo del hato comenzaremos con un muestreo sanguíneo para identificar los animales positivos y segregarlos a los que sean económicamente redituables y eliminar a los positivos no redituables, eliminación de placentas y fetos abortados de los corrales, construcción de parideros individuales, no ofrecer a las becerras calostro ni leche que provenga de vacas positivas, será mejor utilizar sustitutos, desinfectar los parideros utilizando desinfectantes específicos, evitaremos tener vacas con retención de placenta con vacas aparentemente sanas y vacunar el ganado con la finalidad de aumentar la inmunidad del hato.

2.- OBJETIVO.

El objetivo principal de esta monografía es copilar información reciente que despierte inquietud y sea de gran utilidad para el estudiante de MVZ creando conciencia del gran impacto económico que representa la brucelosis, así como la transmisión al humano a través del consumo de lácteos y del personal que manipula el ganado lo que se traduce en una zoonosis. Contener información del agente etiológico, la signología y patología que cursa la enfermedad para así poder crear un programa para su control y posterior erradicación de la enfermedad tomando en cuenta las medidas de bioseguridad adecuadas así como la vacunación.

2.1.- Objetivos específicos

a).- Realizar un breve recuento de la Brucella al paso del tiempo haciendo mención de quien descubrió la bacteria, y cuales son sus características propias.

b).- Ofrecer información detallada de las diferentes formas de de eliminación y entrada de la brucella tanto al animal como al hombre para y así conocer las formas de transmisión.

c).- Dar una breve descripción de la signología que cursa la enfermedad y poder conocer las pérdidas económicas en las diferentes etapas de la enfermedad y en las diferentes edades de lo animales.

d).- Una vez que obtuvimos las bases y conocemos la bacteria al igual que sus formas de transmisión crearemos estrategias que nos lleven al control y posterior erradicación de la Brucella evitando las grandes pérdidas que causa.

3.- HISTORIA

Consultando algunos textos de historiadores de la medicina, éstos refieren que la brucelosis es una enfermedad que se conoce desde la época de Hipócrates, es decir, hace 2400 años; sin embargo, las primeras descripciones de la enfermedad fueron realizadas por Cleghom en 1751 (Suárez, 2003). Fue en el año 1861 en la mediterránea isla de Malta que se describe la enfermedad por primera vez, por Marston, veintiséis años después lejos estaba de imaginar Bruce que su nombre se inmortalizaría ante la historia tras obtener por primera vez del bazo de cuatro pacientes una cepa de Brucella melitensis.

Conocida mundialmente como Fiebre de Malta, Fiebre de Gibraltar, Fiebre del Mediterráneo, Fiebre de Barcelona o Fiebre Ondulante, la brucelosis fue descrita en 1895 por el danés Bang el cual observó que el aborto contagioso en el ganado vacuno se debía a la infección con Brucella abortus, por su parte Zammit detectó la enfermedad en el hombre causada por la bebida de la leche de cabra fresca.

(Hoeprich, 1985). Bräwer y Lehnent entre 1878 a 1880 determinaron el carácter infeccioso de los abortos en bovinos. (García et al. 1988; Bofill et al. 1996).

Debido al gran número de humanos infectados, esta enfermedad despertó gran interés en investigación; así en 1897, Huges presentó una de las descripciones mas completas de la enfermedad y en ese mismo año, Wright y Semple, desarrollaron un método diagnóstico con base en la propiedad aglutinante del suero sanguíneo de los enfermos. En 1904 se nombró una comisión en Inglaterra, la cual presidió el mismo Bruce, para investigar la forma de transmisión al humano y al año siguiente, 20 años después el primer aislamiento del *Micrococcus melitensis*, se determinó la forma de contagio para el humano. Esto gracias a los trabajos del Dr. Zammit, quien determinó anticuerpos aglutinantes en el suero de cabra y del Dr. Horrocks quien aisló el germen causal de la Fiebre del Mediterráneo a partir de la leche y la orina de cabras. Los estudios realizados por estos científicos permitieron establecer la importancia epidemiológica que tienen los animales (en este caso las cabras) en la transmisión de la brucelosis y al mismo tiempo permitieron establecer las primeras medidas de control de esta enfermedad, las cuales consistieron en prohibir el consumo de la leche sin hervir entre las fuerzas inglesas, lo que disminuyó notablemente el número de personas enfermas de la fiebre de Malta, abatiendo el número de defunciones por esta causa, al ver estos resultados, la población civil adoptó las medidas propuestas por la armada inglesa, disminuyendo la morbilidad en humanos a seis casos por 1000 habitantes.(Suárez, 2003 ;Benítez, 1979).

Durante la primera mitad del siglo XX se consideró que la enfermedad estuvo ampliamente distribuida, estimándose 7 casos por cada 1000 habitantes.

Once años después del descubrimiento de Bruce (1897), el Dr. Bang en Dinamarca aisló el agente etiológico del aborto infeccioso de los bovinos, al cual se le da el nombre de Bacilo de Bang. No fue sino hasta 1910 que MacNeal y Kerr confirmaron su presencia en los Estados Unidos como causante de la enfermedad que producía aborto en el ganado, entidad que era reconocida desde el siglo XIX. En 1911 los doctores Schroeder y Cotton, aislaron el microorganismo partir de leche de vaca y los doctores Mohler y Traum de amígdalas de niños que consumían esta leche, estableciendo el papel que juegan los bovinos en la transmisión de la enfermedad. (Suárez, 2003)

Posteriormente se estableció la importancia de la brucelosis transmitida por la leche de vacas infectadas al referir la alta incidencia de aislamiento del agente causal a partir de la leche (11%) y de la extensa distribución de la enfermedad al aislarse del 19% de los establos que distribuían el producto. (Malvin, 1918)

Otros estudios demostraron la relación existente entre el *Micrococcus melitensis* y el Bacilo de Bang, estableciéndose de esta forma la presencia de brucelosis en los Estados Unidos, siendo el método de transmisión para el humano, los bovinos infectados y el agente causal el Bacilo de Bang, ya que en ese entonces no se había informado de la infección por *M. melitensis* en América. (Evans, 1917).

3.1.- Brucelosis en México

En México la brucelosis se conoce desde 1906 y desde entonces son muchas las publicaciones que describen la presencia de la enfermedad en diferentes especies de animales y humanos. (Suárez ,2003; Guemez,

1994;Vargas, 1978).

De acuerdo a las investigaciones bibliográficas realizadas por los doctores Villela y Silva hace más de 50 años, fue el Dr. Carbajal en 1906 quien sospechó de la presencia de brucelosis en México al estudiar un caso de fiebre remitente de donde intentó el aislamiento del *M. melitensis*, refiriendo al Dr. Valenzuela quien un año antes había sospechado que sus enfermos de fiebres remitentes estuvieran enfermos de Fiebre de Malta. Así se sucedieron los informes de casos sospechosos de brucelosis y en 1912 el Dr. Reséndiz, en Querétaro, relaciona la enfermedad con la importación de cabras murcianas en 1910. (Suárez, 2003)

Otro valioso reporte fue realizado por el doctor Recio en el año 1918 quien fue el primero en descubrir la brucelosis en el ganado bovino importado de los Estados Unidos. Se inician desde entonces los reportes de esta enfermedad en nuestro país de la cual no existían referencias durante la colonia española, aunque el aborto de las vacas fue un signo conocido por los veterinarios de la época, pero se atribuía a otras causas. (Curbelo y Márquez, 1950)

El Dr. Tomás Perrín fue el primero en intentar el aislamiento del agente etiológico en México sin éxito, siendo el Dr. Manuel Vergara en 1921, quien aísla por primera vez al *M. melitensis*, exponiendo sus trabajos en el VI Congreso Médico Nacional, lo que fue confirmado en 1923 por Placeres con estudios bacteriológicos y serológicos. Posteriores a estos informes se sucedieron gran cantidad de estudios encaminados a conocer la distribución de la enfermedad en el país, encontrándose que los estados más afectados eran los del centro de la república, mismos en donde la explotación del ganado caprino es importante.

Es relevante el trabajo de una vida dedicada a la investigación del Dr.

Maximiliano Ruiz Castañeda, quien dedicó gran parte de su tarea científica al estudio de la brucelosis en México, con contribuciones que le merecieron reconocimiento a nivel internacional. El Dr. Castañeda publicó a nivel nacional e internacional artículos científicos, revisiones y libros en temas tan variados como historia de la brucelosis, estudios epidemiológicos, de patogenia, de relación huésped-parásito, métodos de aislamiento, identificación e investigaciones sobre los antígenos de *Brucella* y su uso en diagnóstico y tratamiento, así como el uso de diferentes drogas en el tratamiento de pacientes brucelosos. (Suárez,2003)

En nuestro país en el año 1939 se creó un Comité Nacional con el objetivo de organizar la lucha contra la brucelosis, pero este nunca cumplió el reglamento elaborado. En el año 1944 se designa una comisión conjunta de los Ministerios de Salubridad y de Agricultura con igual destino.

Miranda en el año 1953 e independientemente Stinner, propusieron planes para el control de la enfermedad en el país, pero fracasaron en los intentos, entre otras causas por el reducido número de animales y el bajo nivel de diagnóstico existente. (Fernández, 1982).

Sin embargo después de varios años surgió la Comisión Nacional de Control de Tuberculosis y Brucelosis (CONATB), y se publicó la NORMA OFICIAL MEXICANA DE LA CAMPAÑA DE ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS EN LOS ANIMALES (NOM.ZOO.041-1995), la cual continúa vigente hasta la fecha. En esta Norma se especifica que el control de la enfermedad lleva como fundamento el diagnóstico, el sacrificio o la segregación de los animales reactivos, así como la vacunación masiva. La norma considera el uso de vacunas oficialmente reconocidas por la campaña para tal fin, incluyendo a las vacunas Cepa 19 y la RB51. Pero también pone énfasis a la

aplicación de medidas sanitarias, un estricto control de la movilización y la ejecución de cuarentenas.

4.- IMPORTANCIA

La brucelosis es considerada como una de las zoonosis de mayor importancia y distribución en el mundo, la cual causa pérdidas considerables debido a la presencia de factores como abortos, infertilidad, pérdida de reemplazos y baja en la producción de leche en bovinos en la mayoría de los países

La pérdida económica anual debida a la presencia de brucelosis solo para América Latina ha sido calculada en \$600 millones de dólares. En Estados Unidos de América, se estableció, el programa de erradicación de brucelosis en el año de 1954. Observándose una reducción de 124000 hatos infectados en ese año a solo 15000 hatos para el año de 1998, decreciendo con esto las pérdidas económicas de 400 millones de dólares americanos a solo 2.5 millones por año aproximadamente. (Meljen, et, al. 1998)

En México, la brucelosis continua siendo uno de los principales problemas zoonosarios que aquejan a la ganadería nacional, el cual no ha sido posible cuantificar, ya que no existen datos disponibles sobre la prevalencia real en el ganado bovino. La brucelosis esta ampliamente distribuida siendo el sureste la zona de mayor incidencia y en menor proporción la zona norte del país. (Isloor, 1998)

Tabla 1.- Análisis de costos de un aborto producido por brucelosis en una vaca o vaquilla a los 6.5 meses de gestación, bajo las condiciones de la Comarca Lagunera. (I/1998)

Costos \$	Vaca adulta	Vaquilla primer parto
Alimentación (75d x \$27.5/cab/d)	2062.50	1650.00
Prod. De leche/ vaca (26l/d x75d x \$2.52)	4914.00	4158.00
Perdida de semen (3.0 dosis/ gestación)	500.00	250.00
Perdida del remplazo	250.00	250.00
Total	500.00	500.00
	\$8226.50	\$6808.00

(Flores, 1998)

5.- ETIOLOGIA

La brucelosis está catalogada como una de las zoonosis más importantes del país por que además de su impacto en la salud pública, por ser una enfermedad invalidante para el humano, provoca importantes pérdidas económicas en la ganadería nacional. En los últimos años, la Secretaría de Salud ha incluido a la brucelosis dentro de las zoonosis consideradas en los Programas Nacionales de Salud. Entre 1984 y 1994, se elaboraron las Normas Técnicas de los componentes del Programa de Zoonosis, que posteriormente se convirtieron a Normas Oficiales Mexicanas, de observancia en todo el territorio nacional; entre ellas, se encuentra la NOM-022-SSA2-1994, para la prevención y

control de la brucelosis en el hombre en el primer nivel de atención. (Leucano y Domínguez, 1998).

Es importante señalar que Brucelosis es una de las enfermedades incluidas en la lista B de enfermedades de acuerdo a las disposiciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), es decir, se trata de una enfermedad de notificación obligatoria, sin embargo la información epidemiológica sobre brucelosis en las Américas suele ser deficiente, pues frecuentemente está presente sin ser notificada adecuadamente, o bien existen sesgos propiciados por los estudios de diagnóstico dirigidos en ciertas regiones al muestrear continuamente a los mismos hatos cada vez. (Carrillo, 1987)

5.1.- Prevalencia en humanos

Cada año existen alrededor de medio millón de casos de brucelosis humana en el mundo, la prevalencia más alta en el hombre se encuentra en los países con tasas elevadas de brucelosis por *Brucella melitensis* en caprinos, ovinos o en ambas especies. En América Latina, los países donde se registra el mayor número de casos son, Argentina, México y Perú, por lo que esta enfermedad es considerada como un serio problema de salud pública y requiere de la atención de los diferentes sectores de la población que se encuentran relacionados. (Adch y Szyfres, 1988).

5.2.- Fuentes de infección y la transmisión

La fuente primaria de infección está representada por las hembras grávidas que, al abortar o parir, expulsan grandes cantidades de Brucellas con el feto, el líquido amniótico y las membranas fetales. También pueden difundir la enfermedad las hembras que, poco después de abortar, eliminan Brucellas con la secreción vaginal,

y vacas que al parecer sanas, segregan leche que contienen Brucellas. En menor grado pueden contribuir a la contaminación del campo las materias fecales de terneros que se alimentan de leche contaminada, ya que no todas las Brucellas se destruyen en el tracto digestivo. Los toros sin infección no la contraen por cubrir a vacas infectadas, pero si la tienen, pueden infectar a éstas, aunque muy raras veces. En las demás especies, ocurre en forma similar. Las secundarias más importantes desde el punto de vista práctico lo constituyen las membranas fetales, el líquido amniótico y el feto infectado, pues contienen cantidades enormes de Brucella y pueden infectar fuertemente la cama y el suelo de los establos, el pienso y hasta en algunas circunstancias de mala higiene y cuidado, el agua de bebida.

A la infección de los establos puede contribuir también la leche, pues, aproximadamente la mitad de las vacas infectadas, después de abortar o parir, eliminan Brucella con la leche durante semanas, meses y años; sobre todo en aquellas salas de ordeño donde la higiene es muy deficiente y que al ordeñar, se dejen caer al piso los primeros chorros de leche (despunte). Algunos planteamientos hechos sugieren que puede eliminarse la Brucella por la orina, pero no puede fijarse de antemano si tal orina contribuye a la difusión de la infección y hasta qué punto (Mederos et al. 1981; Carter, 1985).

Se ha documentado además, que al menos de manera experimental, las garrapatas del género *Amblyoma* spp, son capaces de vehiculizar a las bacterias de un hospedador enfermo a otro sano aún de especie distinta, ya que su ciclo biológico se completa tras la infestación de cinco hospedadores entre los que podrían incluirse hasta individuos de sangre fría como anfibios y reptiles. (FCA de MVZ de M , 1996)

5.3.- Otras fuentes de contaminación y transmisión

Otro aspecto que debe considerarse dentro de la transmisión y mantenimiento de la enfermedad en las regiones afectadas, es la presencia de mamíferos silvestres infectados. Al respecto existen evidencias de poblaciones de bisontes americanos, venados y alces que se encuentran infectados con *Brucella abortus* en las reservas naturales que se han dejado en los Estados Unidos de Norteamérica para la conservación de esas especies y que han resultado responsables de brotes de brucelosis en unidades de producción bovina colindantes que se habían mantenido libres de la enfermedad por años. (Cook, et, al. 1997. Dubray, Limet, 1987. Gilsdof, et, al. ,2001.)

5.4.- Vías de penetración

La vía de penetración más importante es el tracto gastrointestinal por ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas. Las vacas tienen además la costumbre de lamer membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos, que contienen todos ellos gran número de *Brucella* y constituyen una fuente de infección muy importante. El instinto de las vacas de lamer los órganos genitales de otras vacas contribuye también a la transmisión de la infección, sin embargo algunos autores consideran que el contagio por vía cutánea tiene por lo menos, la misma importancia, por ejemplo: se pueden producir infecciones mediante las camas infectadas, cuando haya lesiones en las tetillas o en los extremos de los miembros o en el espacio interdigital que faciliten la penetración del agente patógeno en capas profundas de la piel, al ordeñar, quizás puedan introducir *Brucella* en la piel de los pezones las manos humedecidas con leche infectada. La vía vaginal fue utilizada por Bang y otros para reproducir experimentalmente la infección. Según los experimentos realizados, al parecer se necesitan un gran número de gérmenes (sin precisar cifras) para infectar una vaca por esta vía. Por otra parte, no hay dudas de que la vía

intrauterina que se emplea en la inseminación artificial es muy importante en la transmisión de la infección. En ambientes cerrados, es probable que la infección se transmita por aerosoles.

La vía aerógena de penetración ha sido demostrada experimentalmente. La infección artificial se consigue a través de la conjuntiva tras la inoculación de *Brucella* en ese sitio (Mederos et al. 1981; Bofill et al. 1996).

Por lo que respecta a las formas de transmisión, se han señalado tanto la transmisión horizontal como la vertical. En el primer caso, se verifica por la libre convivencia entre animales sanos y enfermos, dentro de los cuales pueden ocurrir las infecciones ínter especie; es decir, un bovino bruceloso podría infectar a un ovino, porcino, cánido o caprino y viceversa si se encuentra afectado con cualquiera de las especies lisas del género *Brucella*, aunque las especies rugosas podrían potencialmente hacerlo también en un momento dado. (López, Santiago, et, al. 1991).

La transmisión vertical se da por la infección del feto in útero debido a que su madre se encuentra afectada con alguna de estas bacterias. Esta última situación está debidamente sustentada y constituye uno de los mayores problemas en los planes de lucha que se tienen contra la enfermedad, ya que si el producto se infecta dentro del primer tercio de la gestación y no es abortado, los epítomos de la bacteria serán reconocidos como propios por el sistema inmune y así las pruebas diagnósticas convencionales serán incapaces de identificarlos, por lo que este individuo jugará un papel como portador asintomático dentro de la explotación. (Tizard, 1997).

El riesgo de infección aumenta por la incorporación de animales, con desconocimiento de la situación epizootiológica, así como por la densidad de los

animales en un rebaño. En un estudio realizado por Sánchez (1987), en el municipio de Manzanillo determina que en el 100% de las cooperativas estudiadas se detectaron violaciones graves en el traslado de animales. El 33.3% de ellas resultaron con bovinos reactores positivos a Brucelosis bovina como resultado de intercambio de animales o traslado sin control veterinario, en un estudio determinaron que el tamaño del rebaño se asoció positivamente con la seroprevalencia, manteniéndose esta relación de forma constante a lo largo del período analizado. (Aldiri et al. 1992)

6.- PATOGENIA Y SIGNOLOGIA

Para el establecimiento de la enfermedad, una vez que la bacteria ha ingresado al organismo, es fagocitada por neutrófilos y macrófagos tisulares, los cuales al ver afectado su mecanismo óxido reactivo que impide el estallido respiratorio y con ello la fusión del complejo fago-lisosoma, permiten que la bacteria se multiplique dentro de ellos hasta causar su destrucción, con esto, más bacterias se encontrarán disponibles en los sitios de entrada y serán fagocitadas por otros macrófagos que se encargarán de llevarlas a los nódulos linfáticos regionales más cercanos para ser presentados a los linfocitos CD4+ cooperadores y con ello establecer las respuestas inmunes humoral y celular. (Carter y Changappa, 1994. Cheville, et, al. 1996).

En el caso de la primera, la célula CD4+ recluta linfocitos B que serán transformados en células plasmáticas que liberarán inmunoglobulinas M y G (IgM e IgG) primordialmente y que serán utilizadas para la opsonización y fagocitosis de más bacterias por macrófagos y neutrófilos, lo cual favorece la infección intracelular, pero de manera indirecta debido a su antigenicidad permitirá el

diagnóstico serológico. (Cheville, et, al. 1994. Díaz, 1998. Tizard, 1997)

6.1.-Respuesta inmune

La respuesta inmune celular estará mediada por linfocitos CD8+ citotóxicos/ supresores reclutados por el linfocito CD4 que a su vez liberarán linfocinas y linfoquinas que servirán para “armar” poblaciones específicas de macrófagos especializados en destruir parásitos intracelulares como las brucelas y para destruir poblaciones celulares infectadas por la bacteria e incapaces de destruirla. Los macrófagos que fagocitan brucelas y son incapaces de destruirlas llevan a las bacterias a los órganos que constituyen el sistema fagocítico mononuclear (hígado, bazo, pulmón, riñón, sistema nervioso central y la médula ósea). (Kunkle, et, al. 1995. Olsen, 1997. Roop 1987)

Asimismo, las bacterias también son conducidas a otros tejidos con abundancia de macrófagos y células fagocíticas como nódulos linfáticos inguinales y supramamarios, la placenta y el epitelio germinativo del epidídimo de los machos donde se encuentran las células de Sertoli. Al llegar las bacterias a la placenta o células de Sertoli en el epidídimo, los linfocitos CD8+ y los macrófagos armados inducen un severo daño tisular que se manifiesta de dos formas; en la hembra se produce una necrosis cotiledonaria consecuencia de reacciones de hipersensibilidad de tipo III y IV que inducen hipoxia y sufrimiento fetal lo que induce por parte del producto la liberación de cortisol y que conlleva a el desencadenamiento del trabajo de parto y por tanto al aborto y, en el macho la destrucción de células de Sertoli expone a las células de Leydig y espermatozoides al sistema inmune, lo que trae como consecuencia también, una reacción de hipersensibilidad de tipo IV con lo que

sobreviene la orquitis irreversible. (Sánchez, 1999. FCA de MVZ de M, 1996. Tizard, 1997).

Tanto en los animales como en el hombre, la liberación de Igs M y G que opsonizan bacterias y la liberación de linfocinas y linfoquinas procedentes de linfocitos CD8+, promueven los efectos colaterales de éstas últimas, en particular de la presencia del Interferón Gamma y los Factores de Necrosis Tumoral y, los cuales en su conjunto son los verdaderos responsables del severo aumento de temperatura. Así, cada vez que se eleva la temperatura, gran cantidad de bacterias se encuentran circulantes en la sangre y la linfa. Cuando estas bacterias son fagocitadas, la temperatura corporal regresa a la normalidad. Esta última situación es la que explica la presencia de las fiebres recurrentes. (Palmer, Cheville, 1997. Plommet, 1987.)

6.2.- Signos

La presencia de aborto, nacimiento de crías débiles, mortalidad neonatal por arriba del 10% dentro de los primeros 30 días de vida, retenciones placentarias, infertilidad, disminución en la producción láctea, aumento en el número de días abiertos, mastitis crónica, pérdida de la condición general y merma hasta en un 30% de la vida productiva útil de los reproductores de un hato o rebaño, son signos que sugieren fuertemente la presencia de brucelosis clásica, los cuales pueden verse reforzados por la presencia de artritis crónicas que involucran la espina dorsal y las rodillas de los animales. Las hembras más jóvenes del rebaño y las gestantes son las susceptibles, por lo que la mayoría de los signos pueden observarse en estos individuos. (Al-Khalaf, et, al. 1992. Banai, et, al. 1995. Corbel, 1997)

Dado que el aborto es el signo clínico más importante en la manifestación de la brucelosis clásica, reviste particular interés considerar que éste se presenta en

hembras que se encuentran dentro del grupo de los animales gestantes en el que se incluyen hembras domésticas y silvestres de todas las edades e incluso múltiparas. Por otra parte, si la infección ocurre en un hato o rebaño anteriormente libre, el índice de abortos puede aumentar significativamente hasta que la infección se establece en el mismo. (Díaz, et, al. 2001)

Una vez establecida la brucelosis en el rebaño, la mayoría de las hembras que abortaron se recuperarán y podrán llevar gestaciones normales y a término debido a que adquieren resistencia uterina a la infección, ya que pueden controlar la placentitis; no obstante, mantienen un importante papel en la transmisión de la enfermedad, ya que las bacterias seguirán siendo eliminadas con los loquios, leche, membranas fetales y otras secreciones de estos animales. Por lo anterior, la mayoría de los abortos en los rebaños afectados, se circunscriben a las primíparas o a hembras de reciente introducción procedentes de hatos o rebaños libres de la infección. (Al-Khalaf, et, al. 1992. Martínez y Herrera, 2001).

7.- DIAGNOSTICO

El diagnostico de la brucelosis bovina se realiza fundamentalmente por métodos serológicos y en la mayoría de los países se utilizan una metodología con dos o tres técnicas. En nuestro país, se utiliza la prueba el antígeno buferado de placa (BPA) como prueba tamiz y los sueros reaccionantes deben ser procesados con las pruebas, lenta en tubo (Wright) y 2-marcaptoetanol (2ME) en forma simultanea. Además, se utiliza la prueba de fijación de complemento como definitivo en ocasiones que las técnicas nombradas no puedan arribar a un diagnostico correcto, esta metodología a demostrado se muy eficaz en el diagnostico de la enfermedad sin embargo se puede objetar su lentitud y también su toxicidad del 2-ME. Otros

países usan Rosa de Bengala como prueba tamiz y Rivanol como complementaria pero siempre o una combinación de todas las técnicas mencionadas debido a la falta de subjetividad y en algunos caso de especificidad y sensibilidad en las técnicas en uso se a desarrollado y validado otras técnicas diagnosticas, ELISA de competición y Polarización Fluorescente (ya recomendadas en el Manual Standard de la OIE en su edición 2000. (Samartino, 2000)

7.1.- PRUEBA DEL ANTÍGENO BRUCELAR AMORTIGUADO O DE TARJETA

7.1.1.-Introducción

Esta prueba del antígeno brucelar amortiguado recibe diversos nombres, tales como: Rose Bengal Plate Test (RBPT); L'Epreuve A L'Antigene Tamponne (EAT); así como Prueba de Tarjeta o Card Test. En 1967 Pietz y Schilf desarrollaron este antígeno acidificado tamponado estable, que consiste en una suspensión de *Brucella abortus* cepa 1119-3 a una concentración celular del 8%, amortiguada con ácido láctico a un pH 3.65 ± 0.05 y teñida con una solución de rosa de bengala al 2%.

Es un procedimiento cualitativo, rápido, de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución y que detecta principalmente anticuerpos IgG₁ y en menor grado IgM. Sirve como prueba tamiz por su alta sensibilidad y permite reducir el número de pruebas diagnósticas necesarias para controlar y/o erradicar la brucelosis en un rebaño o hato. Se fundamenta en que las IgG₁ específicas contra *Brucella* son activas a un pH de 3.6, lo que determina la especificidad de la prueba.

Se han desarrollado numerosas investigaciones estudiando la sensibilidad de este antígeno, por ejemplo: Nicoletti (1967) encontró que en hatos infectados, de

272 sueros de bovinos analizados, 177 fueron positivos a la prueba de tarjeta, mismos que habían sido negativos a la prueba estándar de tubo (SAT); aislando además *Brucella abortus* en 39 de estos 177 animales. Davies (1971) al estudiar un total de 22,162 sueros, encontró una alta correlación (97.1%) entre la prueba de tarjeta y la de fijación de complemento (FC'), además de que la primera tiene una gran sensibilidad. Pilet y col. (1972) experimentaron con las pruebas de SAT, FC y tarjeta en 1000 sueros de animales y humanos infectados o vacunados, encontrando una correlación del 89% entre pruebas y demostrando una alta concordancia entre la prueba de FC' y la prueba de tarjeta.

Díaz Aparicio y col. (1993) demostraron que en ovinos y caprinos la modificación en concentración del antígeno de tarjeta del 8% al 3%, aporta resultados más fieles al aumentar la sensibilidad hasta en un 98% en la detección de animales positivos. Esta modificación ya ha sido incluida en la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales; en la Norma Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995, requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales y en la Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria.

7.1.2.- Material

Originalmente se comercializaba el paquete de prueba con una tarjeta de cartón, pudiendo sustituirse ésta por:

Una placa de cristal o acrílico de 35 X 20 cm aproximadamente, dividida en cuadros de 2 x 2 cm.

Una placa de fibracel pintada de esmalte blanco mate.

Una placa de porcelana blanca con cavidades para depositar el suero y el antígeno.

Pipeta serológica de Bang

Se utiliza para depositar 0.03 ml del suero problema, liberando el suero de la marca.....0.12 a la 0.15 ml indicada en la pipeta. La pipeta de Bang se utilizó durante mucho tiempo para depositar las cantidades exactas de suero en las pruebas de placa o tubo, actualmente se pueden utilizar pipetas serológicas comunes o bien pipetas automáticas de volumen variable para depositar 30 μ l.

Gotero para el antígeno

Este debe estar previamente calibrado para liberar 0.03 ml equivalente a 30 microlitros (μ l). Este tipo de gotero es común en el desarrollo de la prueba rápida en placa, debiendo ser previamente lavado con agua destilada y secado, también pueden utilizarse pipetas automáticas de volumen variable para depositar 30 μ l.

Antígeno

Se utiliza el antígeno brucelar amortiguado estable de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, con una concentración celular del 8% para bovinos o bien del 3% para ovinos y caprinos, en un amortiguador de lactato a un pH de 3.65 ± 0.05 y teñido con una solución de rosa de bengala al 2%.

Sueros a probar

Se recomienda que los sueros de bovinos, caprinos y ovinos, se obtengan de preferencia con material nuevo para evitar la presencia de hemólisis que pueden causar reacciones falsas positivas.

Sueros testigos

Se preparan y titulan sueros especie-específicos para cada especie de bacterias del género *Brucella* con la finalidad de utilizarlos como controles positivos y negativos

7.1.3.- Metodología

Los sueros y el antígeno deben estar en temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos antes de realizar la prueba.

1.- Depositar una gota de 0.03 ml (30 μ l) del suero problema sobre la placa seleccionada.

2.- Depositar una gota de 0.03 ml (30 μ l.) del antígeno al 8% ó al 3% junto al suero.

3.- Mezclar perfectamente el antígeno con el suero, utilizando para cada muestra el extremo de un aplicador o agitador.

4.- Después de mezclados, se imprime a la placa un ligero movimiento rotatorio, pudiendo utilizarse también un aparato mezclador, durante cuatro minutos.

5.- Pasados los cuatro minutos se procede de inmediato a efectuar la lectura. La observación de la aglutinación en las placas, deberá realizarse a través de un transiluminador de luz blanca, o bien utilizando una fuente de luz indirecta .

Interpretación de la prueba

Se considera una reacción positiva (+) cualquier grado de aglutinación y una reacción negativa (-) cuando no hay aglutinación.

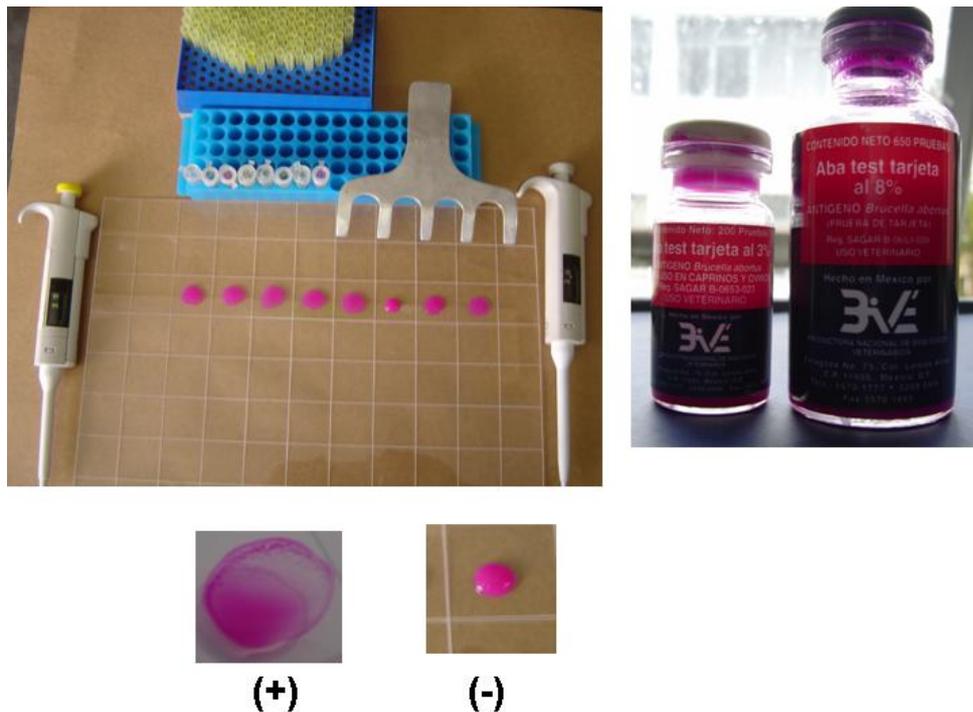


Figura 1. Prueba de tarjeta, donde se muestran material, sueros, antígenos al 3 y 8% así como una reacción positiva y negativa.

7.2.- PRUEBA DE RIVANOL

7.2.1.- Fundamento de la prueba

Es una prueba de aglutinación directa en placa para el diagnóstico complementario de la brucelosis, funciona como una alternativa para examinar los sueros positivos a la prueba de tarjeta (PT). Detecta anticuerpos en el suero de bovinos del tipo IgG contra cepas lisas del género *Brucella* (*Brucella abortus*,

Brucella melitensis y Brucella suis). Por la acción química del Rivanol sobre las IgM, precipita esta inmunoglobulina que se encuentra en el suero. Esta fusión Rivanol-IgM es separada del resto de las inmunoglobulinas por centrifugación a 3,000 rpm, quedando en el sobrenadante las inmunoglobulinas IgG. Con el cual, se efectúa la prueba de aglutinación en placa. Esta prueba es complementaria y corrobora los resultados obtenidos con otras pruebas en el suero de animales sospechosos de padecer infecciones causadas por bacterias del género Brucella como lo refiere Velázquez y col. Para efectos de campaña, se recomienda su realización en sueros de bovinos, que previamente resultaron positivos a la prueba de tarjeta (NOM-056-ZOO-1995). Por lo que corresponde, a su utilización en caprinos Díaz y col., encontraron que esta prueba no ofrece ninguna ventaja para ser utilizada en el diagnóstico de la brucelosis caprina como prueba confirmatoria.

7.2.2.- Reactivos para la prueba

a) Antígeno preparado específicamente para la prueba de Rivanol; compuesto por una suspensión inactivada de Brucella abortus cepa 1119-3 en fase lisa, a una concentración del 4% de células completas, pH de 5.8 ± 0.4 , en presentación de 20 ml, como lo refiere Alton y col.

b) Solución de Rivanol al 1%, la cual se utiliza en proporción peso sobre volumen (P/V); esta solución se prepara de la siguiente manera: 1 gramo de Rivanol (lactato de 2 etoxi-6,9-diamino acridina), el cual es un derivado del colorante naranja de acridina, se disuelve en agua destilada estéril mezclado por agitación magnética durante 1 h. Envasado en forma estéril en frascos de 20 ml de color ámbar y el cual debe conservarse en refrigeración a 4°C protegido contra la luz .

Condiciones ambientales de los reactivos y muestras

Para el procesamiento de los sueros sospechosos al igual que el antígeno, deben sacarse del refrigerador cuando menos 30 a 60 minutos antes de realizar la prueba, con el propósito de que ambos estén a una temperatura óptima de laboratorio (22-25°C) al momento de procesar la prueba.

7.2.3.- Procedimiento de la prueba

Después de que los sueros, la solución de Rivanol y el antígeno, han alcanzado la temperatura ambiente se realiza la prueba de la siguiente manera: en tubos de 13 X 100 mm colocar 0.4 ml (400 µl) de solución de Rivanol por cada muestra y agregar 0.4 ml (400µl) de suero, mezclar inmediatamente por agitación evitando que el contenido entre en contacto con la piel, incubar en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos para precipitar las IgM. Con el sobrenadante de color amarillo claro se efectúa la prueba de aglutinación en una placa de vidrio o acrílico dividida en cuadros de 3 X 3 cm. Con micropipetas de volumen ajustables 2 a 40 µl y de 20 a 200 µl o con una pipeta serológica de 0.2 ml, medir del sobrenadante 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml (equivalentes a 80, 40, 20, 10 y 5 µl, respectivamente) y depositarlas en la primera columna (5 cuadros) de la placa, estos volúmenes de muestra, en orden de izquierda a derecha y de arriba a abajo. Posteriormente con el gotero o micropipeta, agregar 0.03 ml (30 µl) del antígeno para la prueba de Rivanol a cada muestra. Mezclar con palillos de madera o un agitador múltiple de acero inoxidable, empezando por la dilución más alta, mezclar la reacción en la placa extendiendo cada muestra 2 cm de diámetro aproximadamente y se mezclan todas las reacciones con 5 movimientos oscilatorios y se incuban en reposo por 6 minutos a temperatura ambiente. Al término del tiempo, agitar la placa por rotación 5 veces

más y proceder a realizar la lectura sobre un transiluminador de luz blanca o de un aglutinoscopio hecho de madera.

7.2.4.-Interpretación de la prueba

Se considera una reacción positiva (+) cuando hay aglutinación completa y los grumos formados en la mezcla están separados del líquido claro, los resultados se interpretan considerando la dilución más alta donde se presenta dicha aglutinación. Una reacción negativa (-) no presenta ningún grado de aglutinación.

Tabla 2.- Interpretación de a prueba de Rivanol

Dilución del suero tratado con Rivanol (V/V).	1:25 80 µl	1:50 40 µl	1:100 20 µl	1:200 10 µl	1:400 5 µl
Antígeno liso de <i>B. Abortus</i> Cepa:1119-3	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Grados de aglutinación*					
Muy intensa	++++	++++	++++	++++	++++
Intensa	+++	+++	+++	+++	+++
Moderada	++	++	++	++	++
Leve	+	+	+	+	+

No aglutinación	Negativ o	Negativ o	Negativo	Negativo	Negativo
-----------------	--------------	--------------	----------	----------	----------

*Grado de aglutinación observados en el suero de bovinos tratados con Rivanol y antígeno de Brucella.

En bovinos no vacunados se considera positiva una aglutinación a partir de la dilución 1:25 y en bovinos vacunados se considerará sospechosa. Con esta prueba, una aglutinación en la dilución 1:50 se considera positiva para bovinos vacunados.



Figura 2. Antígeno y solución para realizar la prueba de Rivanol en bovinos.

7.3.- PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

7.3.1.- Fundamento de la prueba

Charles Bordet demostró que el suero fresco contiene un sistema de proteínas séricas funcionalmente ligadas que interactúan unas con otras para

producir hemólisis, entre otras funciones. Demostró también que al calentar el suero a 56°C se pierde la acción hemolítica, a este sistema termolábil le llamó complemento. La prueba de fijación del complemento (FC') es muy usada para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, caprinos, ovinos, equinos, suinos y humanos. En rumiantes, el anticuerpo principal que fija el complemento es la IgG₁. La IgG₂ no fija el complemento y es capaz de evitar la fijación del complemento por otras inmunoglobulinas, produciendo un fenómeno de positividad pro-zona, que consiste en que en las primeras diluciones sea negativa o débilmente positiva y en las diluciones mayores sea intensa.

Se describe como una prueba positiva con el título donde se fija el complemento correspondiente a la mayor dilución. La prueba de fijación del complemento consta de dos etapas: La primera consiste en que la mezcla del antígeno y el anticuerpo tienen la propiedad de unirse con una cantidad exacta de complemento. Esta combinación no produce reacciones fácilmente demostrables; es necesario agregar, después del período de fijación del complemento, un indicador adecuado. Este indicador es el glóbulo rojo (GR) de carnero sensibilizado con hemolisina específica.

Si el complemento ha sido fijado en la reacción primaria, ya no queda complemento disponible para lisar los glóbulos rojos sensibilizados del sistema indicador; no se produce hemólisis y esto representa una prueba positiva, es decir, el suero contiene anticuerpos con Brucella. Por otra parte, si no se fija el complemento en la reacción primaria, queda en disponibilidad para reaccionar con los glóbulos rojos de carnero sensibilizados y se produce la hemólisis, lo que representa una prueba negativa.

7.3.2.- Materiales y reactivos

Tubos de 13 X 100, gradillas para tubos, microplacas de poliacrílico de 96 pozos con fondo de “U”, pipetas de gota de 25 ml, pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml., micropipetas de volumen ajustable en μl , “baño María”, espejo lector y centrífuga refrigerada con cabezal para microplacas.

Solución de cloruro de sodio amortiguada con veronal (SAV)

Se prepara de la siguiente manera: 83 g de cloruro de sodio, 10.19g de barbiturato de sodio, 34.58 ml de ácido clorhídrico 1N, 5 ml de solución concentrada de calcio y magnesio. Disolver en 2 litros de agua destilada en matraz aforado y ajustar el pH a 7.3 ± 1 . Esta es una solución concentrada cinco veces (5X), la cual se esteriliza y se envasa en frascos de 40 ml y se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para usarla, diluir un frasco de 40 ml en 160 ml de agua destilada enfriada en hielo; mantenerla en hielo y usarla antes de 24 horas.

Solución concentrada de calcio y magnesio

Se utilizan 20.33 g de cloruro de magnesio hexahidratado y 4.41 g de cloruro de calcio dihidratado. Disolver con agua destilada en matraz aforado de 100 ml y aforar; distribuir en viales con seis ml y conservar en refrigeración.

Solución de Alsever

Anticoagulante y preservativo para suspender sangre de carnero. Se prepara de la siguiente manera: 1.866 g de glucosa anhidra, 0.418 g de cloruro de sodio, 0.800 g de citrato de sodio, 0.055 g de ácido cítrico. Disolver en agua destilada y aforar a 100 ml. Esterilizar por filtración con membrana de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ o en autoclave a 10 libras durante 20 minutos.

Se emplean partes iguales de solución de Alsever y de sangre de carnero y se mezclan. Dejar madurar durante cinco días en refrigeración antes de usar los glóbulos rojos; después pueden ser usados hasta los 60 días. Para usarlos se ponen 10 ml de glóbulos rojos y se lavan dos veces por centrifugación con SAV a 2,000 rpm durante cinco minutos, en tubos de 50 ml llenos de SAV y un tercer lavado en tubo de 15 ml lleno con SAV a 2,000 rpm durante diez minutos.

Preparación del Complemento

Suero de varios cuyes, separado tan pronto como sea posible en centrífuga refrigerada. Se reúnen todas las fracciones y se reparten en viales estériles de un ml con volúmenes de 0.25 y 0.50 ml; los que se conservan en congelación a -70°C. También se puede liofilizar y conservar en refrigeración a 4°C.

Hemolisina

Es suero hiperinmune de conejo anti-glóbulos rojos de carnero. Se consigue comercialmente, diluido al 50% con glicerol. Se conserva en refrigeración a 4°C.

Estandarización de glóbulos rojos

Estandarización de la suspensión de glóbulos rojos al 2%. Después de los lavados, los glóbulos rojos (GR), se suspende un ml en 42 ml de SAV.

7.3.3.- Procedimiento de la prueba

Se calibra el espectrofotómetro a cero con agua destilada, a una longitud de onda de 540 nm. En tubos con 3.4 ml de agua destilada agregar 0.6 ml de suspensión de glóbulos rojos. Leer la densidad óptica (D.O.), empleando agua destilada como blanco. Ajustar la concentración al 2% aplicando la formula siguiente

Diluyente por agregar = $\frac{\text{D.O. suspensión} - \text{D.O. 2\%}}{\text{D.O. 2\%}}$ X volumen de la suspensión.

D.O. 2%

Por ejemplo:

D.O. de la suspensión	= 0.71
D.O. de la suspensión al 2%	= 0.6 + 0.005
Volumen de la suspensión	= 43 ml

Diluyente por agregar = $\frac{0.71-0.6}{0.6}$ X ml = 7.9 ml

0.6

Agregar 7.9 ml de SAV y volver a valorar la D.O. que debe ser 0.6 (+) 0.005

Titulación del complemento

- Preparar y estandarizar una suspensión de glóbulos rojos al 2%
- Preparar una solución concentrada de complemento 1:10 y conservar en refrigeración.
- Preparar una dilución de titulación del complemento con SAV, que puede ser 1:200, 1:400, etc.

d) Preparación de una dilución 1:200 de complemento: agregar 0.1ml de complemento diluido 1:10 a 1.9 ml de SAV frío.

e) Titulación del complemento

Incubar a 37 °C por 30 minutos, agitando ligeramente a los 15 minutos. Retirar del “baño María” y agregar 2 ml de SAV frío a cada tubo. Centrifugar a 2,000 rpm durante cinco minutos. Leer la D.O. a 540 nm, empleando SAV como blanco. Calcular el porcentaje de hemólisis en cada tubo.

Tabla 3.- Titulación de complemento

		TUBOS						
		1	2	3	4	5	6	
Y= hemólisis	Compl. 1:200	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	% de =
	SAV	1.2	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	
	GRs.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	

D.O. X 100

D.O. de suspensión al 2 %

Ejemplo:

D.O. = 0.2

D.O. de la suspensión al 2%=0.6

Y = % de hemólisis = $\frac{0.2 \times 100}{0.6} = 33.3\%$

0.6

Calcular los valores de $Y/(100 - Y)$. Graficar dosis de complemento contra $Y/(100 - Y)$ en papel logarítmico en ambos ejes.

Tabla 4.- **Titulación del complemento (calculo de C'H 50)**

# Tubo	Dosis de C'(ml)	D. Óptica (540 nm)	% Hemólisis	Y/C100- Y)
1	0.3			
2	0.4			
3	0.5			
4	0.6			
5	0.7			
6	0.8			

Localizar la intersección de la línea vertical 1 con la curva, punto que corresponde al 50% de hemólisis. Ubicar en el eje de las ordenadas la dosis de complemento. Se emplean cinco dosis hemolíticas de complemento al 50% ($5C'H_{50}$) en la prueba.

7.3.4.- Cálculo de la dilución de trabajo

El volumen de titulación del complemento es $2 \times 0.25 = 0.5$ ml (dos veces el volumen estándar de la macro-reacción). La dilución de la titulación del complemento es 200 sobre 5 dosis hemolíticas de complemento al 50% (5×0.42)

Factor de dilución X.

$$200: (5 \times 0.42): X: 0.05$$

$$X = \frac{200 \times 0.5}{5 \times 0.42} = \frac{100}{2.1} = 47$$

Como se partió de la dilución concentrada de complemento 1:10, la dilución de esta solución diluida será: $47/10 = 4.7$. La dilución concentrada de complemento diluida 1:10, debe ser diluida 4.7 veces, para llevarla a la dilución de 1.47 que se requiere para usarla en la prueba diagnóstica.

Titulación de la hemolisina

A) Suspensión estándar de glóbulos rojos al 2%

B) Dilución 1:10 del complemento.

C) Dilución de titulación del complemento: 1:200

D) Dilución 1:100 de la hemolisina.

E) A partir de la solución 1:100 de hemolisina hacer diluciones crecientes.

Tabla 5.- **Preparación de diluciones de hemolisina.**

Cantidad	Diluyente	Final
1 ml (1:100)	+ 4 ml SAV	1:500
3 ml (1:500)	+ 3 ml SAV	1:1000
0.5 ml (1:1000)	+ 1 ml SAV	1:1500

1 ml (1:1000)	+ 1 ml SAV	1:2000
1 ml (1:1000)	+ 2 ml SAV	1:3000
1 ml (1:1000)	+ 3 ml SAV	1:4000
1 ml (1:1000)	+ 4 ml SAV	1:5000
1 ml (1:5000)	+ 1 ml SAV	1:10000

Sensibilización de GR

En una gradilla con ocho tubos agregar 1 ml de glóbulos rojos estandarizados en cada tubo; agregar 1 ml de cada dilución de hemolisina a cada uno de los ocho tubos con glóbulos rojos; mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos, para que ocurra la sensibilización de los glóbulos rojos, agitando cada 5 minutos.

Titulación por duplicado

Colocar en una charola con hielo y agua, una gradilla con dos series de ocho tubos de 15 X 100 mm. Por duplicado, agregar a cada tubo un ml de diluyente SAV y 0.5 ml de complemento a la dilución de titulación (1:200). Agregar en forma progresiva de dilución 0.5 ml. Del sistema hemolítico (hemolisina glóbulos rojos); mezclar bien. Incubar en “baño María” (en camisa de agua caliente) a 37 °C durante 30 minutos, agitando ligeramente a los 10 y 20 minutos. Sacar los tubos del “baño María”, agregar 2 ml de SAV frío y centrifugar a 2,000 rpm., durante 5 minutos. Leer la D.O. del sobrenadante, en el espectrofotómetro a 540 nm, calibrando a cero con SAV como blanco.

Calcular el porcentaje de hemólisis en cada tubo

La D.O. correspondiente a 100% de hemólisis es 0.6, y si en un tubo se encontró una D.O. de 0.21, el % de hemólisis será:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{0.21 \times 100}{0.6} = 35\%$$

Graficar el porcentaje de hemólisis en papel cuadrulado de 2 cm por lado. Se determina el valor de las abscisas así: A partir del origen hacia la derecha se marca un punto en el décimo cuadrado que corresponde al valor 500 de la dilución. El punto 1000 se determina dividiendo 500 entre el recíproco de la dilución.

$$\frac{500}{1000} = 0.5$$

1000

$$\text{Para 5000: } \frac{500}{5000} = 0.1$$

5000

Trazar la curva, a partir de cierto valor, la gráfica tiende a una recta horizontal, lo que indica que los valores son casi iguales (curva de meseta). Agregar 25% al valor límite y esta será la dilución de la hemolisina a emplear en la prueba.

Antígeno

El antígeno que se emplea en la prueba de fijación del complemento es el que se usa para la prueba de aglutinación lenta en tubo; se diluye 1:200 con SAV frío.

Inactivación del complemento.

El suero fresco contiene complemento y también presenta actividad anticomplementaria; esta actividad anticomplementaria se puede incrementar por la proliferación de bacterias si no se conserva el suero en congelación; se reduce por centrifugación al eliminar el paquete bacteriano. El poder hemolítico del complemento en el suero se elimina por inactivación. El suero humano se inactiva a 56°C, y el de rumiantes a 58-60°C. La inactivación debe hacerse como paso previo a la prueba diagnóstica, durante 30 minutos.

La reacción de fijación del complemento y las inmunoglobulinas IgM e IgG

Si los sueros son inactivados a 58-60 °C, la prueba detecta las gammaglobulinas IgM e IgG. Si se calientan a 65°C, se inactivan las inmunoglobulinas IgM y la reacción podrá ser:

Negativa. Sí fue positiva al inactivar a 58-60°C y negativa al inactivar a 65°C, se considera una respuesta inmune a la vacunación.

Positiva. Sí fue positiva a las dos pruebas, se considera una respuesta inmune a la enfermedad natural, ya que las gammaglobulinas IgG son termoestables.

8.- VACUNACION

La brucelosis es una de las zoonosis más importantes en México y en muchos otros países en los que la enfermedad es enzoótica. El reto principal para los investigadores a lo largo de poco más de un siglo ha sido el desarrollar un inmunógeno ideal, capaz de conferir una sólida y prolongada inmunidad a los animales vacunados, además de ser inocua, de fácil aplicación, de bajo costo y que no interfiera con las pruebas de diagnóstico que se utilizan de manera rutinaria para

la identificación de los animales enfermos. Desafortunadamente a pesar de los grandes esfuerzos realizados a lo largo de tantos años, y de la enorme cantidad de recursos destinados a este fin aún no se logra obtener. (Flores, 2003).

8.1.- VACUNA CEPA 19

En 1923 se logró el aislamiento de una cepa de *Brucella abortus* a la que se identificó como Cepa 19, que posteriormente sería utilizada por Buck en 1930 para desarrollar la vacuna como se le conoce en la actualidad. La vacuna es producto de un proceso de atenuación de la cepa 19, la cual originalmente era un cultivo virulento al que se dejó a temperatura ambiente durante varios meses, al replicarla se encontró que había sufrido modificaciones en su virulencia, de manera que se evaluó como vacuna con los resultados que todos conocemos. Entre sus cualidades destaca la estabilidad de la cepa, la cual durante décadas se ha mantenido atenuada, sin que se hayan encontrado indicios de que pudiera revertir a la virulencia. Desde su desarrollo en 1930 hasta nuestros días la vacuna cepa 19 ha sido objeto de infinidad de investigaciones y ha sido utilizada en la mayoría de países en los que se llevan a cabo programas para la prevención y el control de la enfermedad en bovinos. (Samartino, 2005. Bosseray y Plannet, 1990).

Se trata de una cepa lisa, gram negativa, que posee íntegro su lipopolisacárido (LPS) incluyendo la cadena "O", motivo por el cual los animales vacunados desarrollan anticuerpos aglutinantes que reaccionan con los antígenos utilizados en las pruebas para el diagnóstico de la enfermedad. Se acepta que esta vacuna es capaz de inducir protección satisfactoria a por lo menos el 70% de los animales vacunados. El título de UFC en esta vacuna es de 5×10^{10} ., y es una excelente

herramienta para el combate de la brucelosis, especialmente países en los que los índices de prevalencia son elevados, ya que al ser utilizada de manera complementaria con los procedimientos de diagnóstico y sacrificio, ha permitido que muchos países hayan logrado la erradicación. (Blasco, 2001).

Durante casi medio siglo el uso de la vacuna cepa 19 estuvo restringido a la vacunación de becerros de 4 a 6 meses de edad, puesto que en animales mayores es posible que ocurra una proliferación y la permanencia de la cepa vacunal en los animales, con la consecuente producción de anticuerpos que interfieren con diagnóstico, además al utilizar la misma dosis de vacuna que se administra en becerros para la inmunización de hembras gestantes la vacuna es capaz de ocasionar abortos. Esto representaba una seria limitante para los programas de control en países como México.

Este problema fue parcialmente resuelto en la década de los 70's gracias a las investigaciones de Nicoletti y col. (Nicoletti, 1978)

El hecho de que los animales vacunados, ya sea como becerros con dosis clásica o como animales mayores a los 8 meses con dosis reducida, inducen la producción de anticuerpos que persiste hasta por 8 meses después de la vacunación, representa una fuerte limitante en el avance de la Campaña Oficial para el combate de la Brucelosis en bovinos de México, puesto que se generan conflictos para la movilización y la comercialización de animales vacunados, durante el tiempo que transcurre desde la vacunación hasta la desaparición de los anticuerpos. Por otra parte, ha ocurrido que animales vacunados sean vendidos o movilizados a pesar de presentar anticuerpos aglutinantes, con el argumento de que tales anticuerpos son producto de la vacunación, tratándose en realidad de animales enfermos, lo que a la

postre representa la diseminación de la enfermedad en otros ranchos o establos, e inclusive a otras regiones del país. (Blasco, 2001)

8.2.- VACUNA RB51

En las últimas décadas la investigación ha generado tecnología diagnóstica más confiable y mejores vacunas para su aplicación en las campañas contra la brucelosis, como es el caso de vacuna RB51, la cual se desarrolló en los 80's, elaborada con una cepa rugosa de *Brucella abortus*. (Schuri, 1991). Esta característica se debe al hecho de que carece de la cadena "O" del LPS que poseen las bacterias Gram negativas en su pared celular y que en el caso de las cepas lisas de los miembros del género *Brucella* son responsables de inducir la producción de anticuerpos séricos, que se identifican mediante las pruebas clásicas de aglutinación utilizadas para el diagnóstico; por esta razón la vacuna RB51 además de inducir una respuesta inmunológica efectiva, similar a la cepa 19, posee la cualidad de no interferir con el diagnóstico, lo que hace de ella una valiosa herramienta para el control de la brucelosis, puesto que se puede identificar animales infectados independientemente de la fecha de vacunación.

Es importante señalar que la ausencia de la cadena "O" antes mencionada no implica que la vacuna sea incapaz de inducir una respuesta inmunológica. Cada bacteria posee un enorme número de determinantes antigénicos, los cuales actúan de manera conjunta para estimular una sólida inmunidad en los animales vacunados.

La vacuna RB51 induce la producción de anticuerpos que se pueden identificar con otros métodos diagnósticos como la inmunodifusión o la Fijación de Complemento,

motivo por el cual se logra proteger con ella a los animales sin interferir con los procedimientos de diagnóstico rutinarios.

Al igual que en el caso de la vacuna Cepa 19, la RB51 está disponible en el mercado en dos presentaciones, la clásica para becerras y la presentación en dosis reducida para vacas. Existe, al igual que ocurre con la cepa 19, la probabilidad de que de 1 a 2 % de las vacas gestantes aborte como resultado de la vacunación.

La aplicación en animales infectados en proceso de incubación puede dar como resultado que a los pocos días después de la aplicación de la vacuna se desenmascare la infección, por lo que tiene cierto valor diagnóstico. (Bosserey, y Plommet 1990. Roerink, 1996). Es probable que la revacunación de animales previamente vacunados con la cepa 19 desarrolle anticuerpos aglutinantes como resultado de la estimulación de la memoria inmunológica.

En México la vacuna RB51 se utiliza de manera oficial por la campaña de control de la brucelosis, desde 1996. Es evidente que desde su entrada al mercado el número de animales que se vacunan en este país aumentó considerablemente.

Esta vacuna ha sido investigada con relación a su capacidad de proteger al ganado caprino. Se tienen en estudio más de 13,000 cabras vacunadas en el municipio de Perote, Ver., con resultados satisfactorios. (Herrera, et al. 2003. Martínez et, al. 2003). Con estos datos como soporte así como por los resultados de otros autores, en el año 2005 la SAGARPA, por conducto de la Dirección General de Salud Animal, autorizó a un laboratorio para producir y comercializar este biológico para la vacunación de cabras en México.

Actualmente se han comercializado poco más de 100 mil dosis de esta vacuna, la cual posee la ventaja de no interferir con las pruebas de rutina utilizadas para el diagnóstico mediante pruebas de aglutinación serológica; además, se trata de un microorganismo con mayor grado de atenuación que la cepa vacunal Rev. 1, lo que representa una importante ventaja pues no implica riesgos para la salud pública. (CDC, 1998).

LA CAMPAÑA OFICIAL CONTRA LA BRUCELOSIS EN LOS ANIMALES EN MÉXICO

La Campaña contra la Brucelosis en los animales en la República Mexicana se estableció oficialmente el 8 de Agosto de 1971, fecha en la que apareció publicado en el Diario Oficial de la Federación, el Reglamento que habría de regir sus actividades 21. En este Reglamento se estableció que las vacunas Cepa 19 y Rev. 1 son las vacunas oficiales para prevenir la brucelosis en el ganado bovino y caprino respectivamente. En la última década del siglo XX se generó la Norma Oficial Mexicana de la Campaña de Erradicación de la Brucelosis de los Animales (NOM. ZOO.041-1995). Esta NOM se ha sometido a algunos procesos de modificación y continúa vigente 22. En ella se señala el uso las vacunas Cepa 19 y Rev. 1 en presentaciones de dosis completa para becerras y cabritas y las dosis reducidas para la vacunación de vacas y cabras adultas. La Rev. 1 es considerada también como vacuna oficial para proteger ganado ovino contra la infección por *Brucella melitensis*.

Destaca el hecho de que la NOM menciona que es obligatoria la vacunación en todo el territorio nacional. Por otra parte, incluye un artículo en el que otorga facultades a

la Secretaría para autorizar otros inmunógenos; con base en este artículo se autorizó el uso de la vacuna RB51 para la inmunización de cabras.

9.- PROGRAMA DE CONTROL Y ERRADICACION

El programa de control y erradicación en nuestro país será bajo la norma

NOM-041-ZOO-1995 Campaña Nacional Contra la Brucelosis de los animales

La presente norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas para la prevención, control y erradicación de la brucelosis bovina en todo el territorio nacional.

La vigilancia y aplicación de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y a los gobiernos y municipios de las entidades federativas y del Distrito Federal, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales y de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

La ejecución de las disposiciones contenidas en esta Norma compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las Delegaciones de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, así como a los propietarios de ganado, médicos veterinarios, personal de rastros y plantas de sacrificio, organismos de certificación, personas vinculados a la movilización y comercialización del ganado.

DISPOSICIONES GENERALES

La campaña se orienta a la especie bovina en lo que se refiere a brucelas lisas (B.

abortus, B. melitensis)

El propósito de la campaña consiste en el control y erradicación de la enfermedad en todo el territorio nacional.

La responsabilidad de operar los programas estatales de la campaña, debe compartirse entre el Gobierno Federal, los Gobiernos Estatales, los Gobiernos Municipales, Comités Estatales de Fomento y Protección Pecuaria y Productores.

Los Médicos Veterinarios responsables deberán notificar por escrito, por lo menos con 5 días de anticipación, a la Subdelegación de Ganadería, a la Subdelegación Agropecuaria o Distrito de Desarrollo Rural, la programación de actividades de la Campaña. Cuando se trate de animales sujetos a comercialización inmediata, esta notificación deberá efectuarse por lo menos con un día de anticipación de la fecha de realización de las pruebas diagnósticas.

La protección de estados, regiones, zonas o hatos libres de la enfermedad o en etapas avanzadas del programa, se efectuará mediante el estricto control de la movilización animal.

Los bovinos positivos a cualquiera de las pruebas diagnósticas oficiales de brucelosis, serán comercializados sólo para su sacrificio, salvo que estos sean castrados para enviarse a engorda.

La duración de la campaña será hasta declarar oficialmente libre de brucelosis a todo el país. En esas circunstancias se levantará la Campaña y esta Norma dejará de tener efecto.

10.- CONCLUSIONES

La brucelosis es una enfermedad mundial que ocasionó un gran número de muertes en humanos lo cual ha sido casi eliminado gracias a los conocimientos obtenidos por

los estudios que han realizado aquellas personas dedicadas a la investigación en medicina.

En los bovinos la brucelosis sigue siendo un problema que ocasiona grandes pérdidas a causa de abortos, baja de la producción, mayor gasto en alimentación, crías débiles, infertilidad, mayor gasto de semen, más problemas al parto, mayor número de enfermas y aumento en la tasa de desechos. Todo esto nos lleva a tener una menor producción ya aumentar los gastos ocasionando pérdidas a la ganadería del país.

Por lo cual debes crear un programa de control en donde se agá un muestre de sangre para identificar en el establo a los animales positivos y eliminar a los animales no redituables. Debemos tomar las medidas preventivas adecuadas para evitar el contagio en el hato si no somos hato libre entonces debemos vacunar para así aumentar la inmunidad del hato.

11.- REFERENCIAS

- Al-Khalaf, S.A.S., Mohamad, B.T., Nicoletti, P. (1992): Control of brucellosis in Kuwait by vaccination of cattle, sheep and goats with *Brucella abortus* strain 19 or *Brucella melitensis* strain Rev. 1. *Trop. Anim. Health Prod.* 24(1), 45-49.
- Banai, M., Abramson, M., Mayer, I., Chechik, K., Hoida, G., Zamir, O., Bardenstein, S., Cohen, A. and Davidson, M. (1995): Problems associated with the persistence and possible horizontal transfer of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine in connection with serological surveillance in Israel. In: *FAO/WHO/OIE Round Table on the Use of Rev. 1 Vaccine in Small Ruminants and Cattle*, (21-22 September),. (Garin-Bastugi, B., and Benkirane, A. eds.), pp. 69-76, 1996. CNEVA Alfort, France.
- Bang, B., The etiology of epizootic Abortion, *J. Comp. Pathol. Ther.* 10, 125, 1897.
- Bosseray, N. and Plommet, N. (1990) *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Rev1 and *Brucella abortus* S 19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. *Vaccine*, vol 8, pp 462- 468, Oct. 1990.
- Carter, G.R. y Chengappa, M.M. (1994): *Bacteriología y Micología Veterinarias*, Editorial Manual Moderno, 2ª Edición, México, D.F., pp: 351 - 360.
- CDC (1998) Human exposure to RB5, CDC- *MMWR*, March 1998/47(09);172-175.

- Cheville, N. F. (1993): Development of vaccines and diagnostic reagents for eradication of bovine brucellosis. *Agri-Practice* 14:9-13
- Cheville, N.F.; Jensen, A.E.; Morfitt, D.C.; Stabel, T.J. (1994): Cutaneous delayed hypersensitivity reactions of cattle vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*, using brucellins prepared from various brucellar strains. *Am. J. Vet. Res.* 55(9), 1261-1266.
- Cook, W. E., E. S. Williams, E. T. Thorne, T. J. Kreeger, G. S. Stout, S. Pistono, F. Enright, P. Elzer, and G. Schurig. (1997): Pathogenicity of intramuscularly injected *Brucella abortus* strain RB51 in male elk calves. Wildlife Disease Association Annual Conference. St. Petersburg, Florida.
- Corbel MJ (1997): Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, 3:213-21.
- Del Río Vargas, J.: Campaña Nacional Contra la Brucelosis en México, Antecedentes y Estrategias. Foro Nacional Sobre Brucelosis (memorias), INIFAP/UNAM, pp.:84-105, México, 1978.
- Diario Oficial de la Federación. Agosto 8 del 1971.
- Díaz, A.E. (1998): Pruebas de Diagnóstico en Población Animal. Memorias del Tercer Foro Nacional de Brucelosis. Acapulco, Guerrero, México, pp: 63-77
- Díaz, A.E., Hernández, A.L., Valero, E.G. Arellano, B. y colaboradores (2001): Diagnóstico de Brucelosis Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGARPA / IICA., México, D.F.
- Dubray G. And Limet, J. (1987): Evidence of Heterogeneity of Lipopolysaccharides among *Brucella* Biovars in Relation to A and M Specificities. *Ann. Inst. Pasteur / Microbiol.* 138: 27 -37.

- Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México, A.C.(1996): Manual de Actualización Técnica para la Aprobación del Médico Veterinario Zootecnista como Unidad de Verificación en Tuberculosis Bovina y Brucelosis. FedMVZ México, D.F. pp: 41 - 63.
- Isloor S. Renu Karadhya GJ. Rajassekhar M. A serological survey of bovine brucellosis in India. Rev Tech Int Epz 1998: (17) 781-785.
- Kunkle, R. A., Steadham, E. M., and Cheville, N. F. (1995): Morphometric analysis of CD4+, CD8+, and T-lymphocytes in lymph nodes of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strains RB51 and 19. Vet. Immunol. Immunopathol. 49:271-279,
- Martínez – Herrera, D.I. (2001): Determinación de *Brucella melitensis* cepa Rev-1 a partir de leche de cabras vacunadas. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, México Palmer MV, Cheville NF (1997): Effects of oral or intravenous inoculation with *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in Beagles. Am J Vet Res ;58:851-856.
- Martínez Herrera, D.; Abeledo G, M.; Rodríguez Chessani, M A.; Flores C, R.; Batalla Campero, D, Rivera R, E. L.; Juárez S. María Eugenia; Vallecillo M, A. J.; Millán M, D. A.; Bautista B,R.; Acosta M, E. A.; Luna Martínez, J. E. Evaluación de la eficacia de la cepa RB51 de *Brucella abortus* en la prevención de brucelosis caprina. Rev. Salud Anim. Vol.25 No. 2 (2003): 98-103. Cuba.
- Martínez. H.D., Abeledo, GMA., Soto RI., Durand DR, Bulnes GC, Flores CR, Batalla, D, Rivera, REL, Vallecillo MAJ, Espinosa MSM, Gómez PJG, Bautista, BR.: Determinación de la Inocuidad de la Cepa RB51 de *Brucella abortus*.

Utilizada como Vacuna en Caprinos, Rev. Salud Anim. Vol. 25 No. 2 (2003): 98-103. Cuba.

- Meljen MJ. Flores JL Control Sanitario DE producción lacteos como medida de prevención de la brucelosis. Memoria del III foro nacional de brucelosis, SAGARPA, Acapulco, Guerrero, Mexico. 1998: 33 – 46.
- Nicoletti, P., Jones, L., Berman, D.T.(1978) Adult Vaccination with Standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in a dairy herd infected with brucellosis. JAVMA: 1445-1449.
- Norma Oficial Mexicana de la Campaña de Erradicación de la Brucelosis en los Animales: NOM-ZOO-041-1995.
- Plommet, M., Bosseray, N., Lantier, F., Bernard, F., Pardon, P., & Rodolakis, A., (1987): Simultaneous Vaccination by Three Living Attenuated Strain of Brucella, Salmonella and Chlamydia in Mice. Vaccine 5: 27-32.
- Roerink, J.H.G.(1966) A non-agglutinogenic *Brucella abortus* vaccine, (Thesis) Drukkerij Koeldijk C.V., Amsterdam.
- Roop II, R.M., Preston-Moore D., Bagchi T. & Schurig G.G. (1987). Rapid Identification of smooth Brucella species with a monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol., 25, 2090-2093
- Samartino Luis. (2005)Brucellosis Vaccines, Memorias de Brucellosis 2005, Internacional Research Conference, Mérida, Yuc., México, Octubre 15 a 19 del 2005, pp.: 31-41.
- Samartino Luis. Brucellosis Vaccines, Memorias de Brucellosis 2005, Internacional Research Conference, Mérida, Yuc., México, Octubre 15 a 19 del 2005, pp.: 31-41.

- Schurig G., Roop M., Bagchi T., Boyle S., Buhrman D., Sriranganathan, N., 1991: Biological properties of RB51: A stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 28, 1971.
- Suárez Güemes Francisco. Coordinador del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la producción y de la Salud Animal Universidad Nacional Autónoma de México. 2003.
- Suárez-Güemes F., Díaz Aparicio E., Mancera Martínez A., Vázquez Navarrete J., Flores Castro, R.: XXV Años de aportaciones al Estudio de la Brucelosis Animal en México. Premio CANIFARMA, 1994 (memorias).
- Tizard, I. (1997): Inmunología Veterinaria. 5ª Edición, Editorial Interamericana, México Acha, P.N.y Szyfres, B. (1988): Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales, OPS 2ª Edición, Washington, D.C., EUA, pp: 14 – 36.