

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE SALUBRIDAD E HIGIENE



Criterios de bioseguridad para eliminar la prevalencia de *brucella* en un hato lechero.

Por:

ALICIA SARAHI MONTAÑO RAMÍREZ

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Diciembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
 DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
 DEPARTAMENTO DE SALUBRIDAD E HIGIENE

Criterios de bioseguridad para eliminar la prevalencia de *brucella* en un hato lechero.

Por:

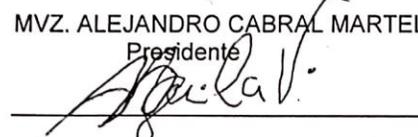
ALICIA SARAHI MONTAÑO RAMÍREZ

MOGRAFIA

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:

	
MVZ. ALEJANDRO CABRAL MARTELL Presidente	DR. AGUSTIN CABRAL MARTELL Vocal
	
DR. ALFREDO AGUILAR VALDÉS Vocal	DR. LUIS FELIPE ALVARADO MARTINEZ Vocal Suplente
	
MC. J. GUADALUPE RODRIGUEZ MARTINEZ Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal	



Torreón, Coahuila, México

Diciembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE SALUBRIDAD E HIGIENE

Criterios de bioseguridad para eliminar la prevalencia de *brucella* en un hato lechero.

Por:

ALICIA SARAHI MONTAÑO RAMIREZ

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

MVZ ALEJANDRO CABRAL MARTELL

Asesor Principal

DR. AGUSTIN CABRAL MARTELL

Coasesor

DR. ALFREDO AGUILAR VALDÉS

MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MORALES

Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Diciembre 2019



AGRADECIMIENTO.

Agradezco principalmente a Dios por la vida que me ha dado y haberme dado la oportunidad de emprender un camino rodeada de lo que más me encanta, los animales y mi familia.

Doy gracias a mis padres, María Ofelia Ramírez Martínez y Víctor Manuel Montaña y Salazar, que me han apoyado hasta el último momento; a mi hermano, José Manuel Montaña Ramírez que en todo momento ha estado para mí.

A mi hijo Ian Abraham, que siendo el motor de mi vida, me impulsa a practicar el “MAGIS” es decir dar más de mí para lograr un poco más.

Agradezco también a mi novio Joe Peña Hilario, quien con amor ha brindado apoyo hacia toda situación que sobrellevo y me alienta a lograr mis sueños.

Brindo perdurable agradecimiento a mis maestros y médicos quienes han confiado y creído en mí para ser una gran profesionalista.

A todos quienes me han apoyado doy infinitas gracias

DEDICATORIA.

Dedico mi trabajo a mi familia, padre, madre, hermano y novio; sin embargo, lo dedico principalmente a mi hijo Ian Abraham Montaña Ramírez, quien ha pasado junto a mi toda prueba que se me ha presentado a lo largo de mis estudios y ejercicios profesionales. Ese pequeño que llegó a bendecir mi vida en el momento ¡menos esperado!, por el todos los días vuelvo a levantarme para seguir luchando y cumplir los sueños en mente.

Estoy orgullosa de mi misma, ya que con esfuerzo, dedicación y amor he ido logrando cada reto que me propongo, al ser pequeña soñaba con gran entusiasmo el ser Médico Veterinaria, es por eso que también dedico mi trabajo a mis abuelos Ofelia Martínez Murillo y Juan Ramírez Rivera y a todos mis tíos a quienes amo con mi corazón, por formar parte de mis raíces.

RESUMEN

La brucelosis una enfermedad infecto contagiosa, zoonótica causada por bacterias del género *Brucella*. Es un ejemplo de la falta de interacción de los sectores de salud de las ramas pública y veterinaria. Este artículo revisa las generalidades de esta enfermedad y sus antecedentes, así como la estructura celular bacteriana, la fisiopatología y las vías de contagio.

Es importante que el sector salud tenga presente la importancia de esta enfermedad, para que los médicos puedan recibir capacitación sobre su prevención, diagnóstico y tratamiento. Con estas medidas se podrán realizar diagnósticos oportunos y diseñar campañas para la adecuada aplicación de medidas preventivas, lo que podría reeditar en la disminución de los casos reportados de este padecimiento.

PALABRAS CLAVE: *Brucella*, Zoonosis, Prevalencia, Erradicación, Bioseguridad.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
INTRODUCCIÓN	1
1 OBJETIVO GENERAL	3
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 SINONIMIA	3
2.2 HISTORIA DE LA BRUCELOSIS	4
2.3 Desarrollo y extensión en México	6
2.4 GENERALIDADES DE LA BRUCELLA	9
2.5 CUADRO CLÍNICO	11
2.6 MECANISMO DE TRANSMISIÓN	12
2.7 SOBREVIVENCIA	14
2.8 SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA	16
3.- PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	18
3.1 MÉTODOS DIRECTOS:	18
3.2 MÉTODOS INDIRECTOS:	19
4.- BIOSEGURIDAD	31
5.- PROCEDIMIENTOS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA	31
.....	42
7.- CONCLUSIONES	42
8.- BILIOGRAFIA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1 ESPECIES DEL GÉNERO BRUCELLA	1
Ilustración 2 Producción Nacional de leche de bovino	9
Ilustración 3 Clasificación de especies Brucella	10
Ilustración 4 FORMAS DE TRANSMISIÓN	15
Ilustración 5 VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	15
Ilustración 6 PATOGENIA B. ABORTUS.....	17
Ilustración 7 TRÁNSITO INTRACELULAR DE B. ABORTUS	18
Ilustración 8 PRUEBA ROSA DE BENGALA.....	21
Ilustración 9 Pruebas diagnosticas.....	25
Ilustración 10 Interpretación de los resultados en las pruebas confirmatorias	29
Ilustración 11 Pruebas Confirmatoria de México	30
Ilustración 12 Personal de Comité de Campaña, desinfectando al llegar al Hato	38
Ilustración 13 Personal de Comité de Campaña, desinfectando camas de Hato.....	39
Ilustración 14 Datos de desinfectantes	40
Ilustración 15 Personal de Campaña tomando muestras sanguíneas.....	42
Ilustración 16 Trabajando	43

INTRODUCCIÓN

México está ubicado en una de las regiones del mundo con mayor prevalencia de brucelosis bovinaⁱ, al nivel nacional, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), a través de la Dirección de Salud Animal conduce la campaña nacional de prevención y control de brucellaⁱⁱ.

México es uno de los principales países ganaderos de América Latina; es también uno en los que la brucelosis sigue siendo un gran problema zoonosario; la amplia diseminación de la enfermedad en bovinos, caprinos y muy probablemente en porcinos ha dificultado grandemente la eficacia de medidas preventivas y de control establecidos desde hace algunas décadas.ⁱⁱⁱ

La brucelosis es una enfermedad contagiosa, principalmente del ganado rumiante y la fauna silvestre, que tiene consecuencias importantes en la salud pública y animal y en el comercio internacional. La infección es causada por bacterias del género *Brucella*, las principales en la región a estudiar son: (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. Suis*)

//

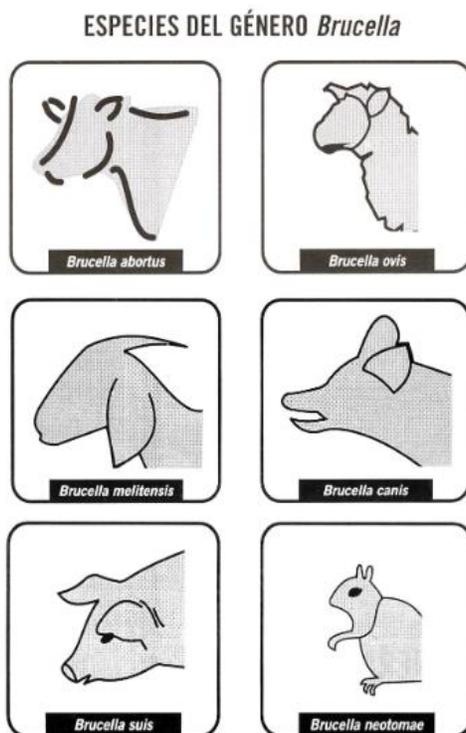


Ilustración 1 ESPECIES DEL GÉNERO BRUCELLA

Siendo estas las que plantean graves problema al ganado, los seres humanos y la fauna silvestre. En el ganado, las manifestaciones más importantes de la infección son el aborto, la mortinatalidad y el nacimiento de crías débiles. Muchos animales infectados son asintomáticos pero puede excretar el organismo.

La brucelosis se mantiene en el reservorio animal pero puede transmitirse a los seres humanos como consecuencia de factores de riesgo y características de comportamiento, transmitiéndose por contacto directo con el ganado, particularmente por contacto con tejidos y líquidos del parto, o ingestión de leche o productos lácteos no pasteurizados. Sin embargo, no se transmite de los seres humanos al ganado. Por consiguiente, la eliminación de la enfermedad en los seres humanos no es posible sino mediante intervenciones orientadas estrictamente a los reservorios animales. Pese a los adelantos en materia de vigilancia y control, la prevalencia de la brucelosis va en aumento en muchos países en desarrollo debido a factores sanitarios, socioeconómicos y políticos^{iv}.

La *B. abortus* se encuentra en todas las regiones ganaderas del mundo, salvo en los países en que se ha erradicado, la mayoría de los países ha intentado, con mayor o menor éxito, combatir la brucelosis; como consecuencia, la distribución mundial de la enfermedad ha experimentado cambios a lo largo del tiempo. Actualmente, varios países desarrollados (como Australia, Canadá, Japón, Nueva Zelanda y países de Europa septentrional y central) han erradicado o reducido considerablemente la prevalencia de las infecciones por *B. abortus*, sin embargo, con la excepción de algunos países de Europa occidental, muy pocos han logrado erradicar las infecciones por *B. melitensis*, que suelen asociarse a enfermedades humanas más graves que las infecciones por *B. abortus*. En todo el mundo se han previsto o se han puesto en marcha programas de control, que adoptan diferentes enfoques y se centran en diferentes prioridades, en esta monografía se verán los puntos críticos en los establos lecheros, para idear una estrategia de bioseguridad y así poder acercarnos a la erradicación de la brucella (*B. abortus*) en la comarca lagunera.

1 OBJETIVO GENERAL.

Crear un protocolo de bioseguridad para lograr la erradicación de brucella abortus en la región lagunera

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 SINONIMIA

- ✓ Fiebre ondulante
- ✓ Fiebre recurrente
- ✓ Fiebre melitensis
- ✓ Fiebre Melitocócica
- ✓ Fiebre de Malta
- ✓ Fiebre de Traum
- ✓ Fiebre del Río Grande
- ✓ Fiebre caprina
- ✓ Fiebre de Chipre
- ✓ Enfermedad de Bang
- ✓ Fiebre de Gibraltar
- ✓ Fiebre sudoralis
- ✓ Fiebre del Mediterráneo



2.2 HISTORIA DE LA BRUCELOSIS

Durante la guerra de Crimea (1854-1856) se sospechó de una nueva infección, pues se observaron numerosos casos con fiebres prolongadas, los cuales se extendieron a los países del Mediterráneo, en particular a la isla de Malta. Tres años después, Marston hizo cuidadosos estudios clínicos y autopsias en los individuos con tales síntomas, detalló la enfermedad según apareció en la isla y confirmó la presencia del padecimiento en otras zonas.^v

En 1886, el médico inglés David Bruce aisló e identificó la cepa de *Brucella melitensis* a partir del bazo de un militar, la primera especie conocida del género. También demostró el alto grado de capacidad del microorganismo para producir la enfermedad y su diseminación a los diferentes órganos en un individuo infectado.^{vi}

La enfermedad en el ganado bovino fue percibida desde mediados del siglo XVIII, en 1864, Jenning señaló que el aborto ocurría “por simpatía”, ya que si una vaca preñada observaba abortar a otra, lo hacía también a los pocos días o semanas, por lo que recomendó el aislamiento de la vaca afectada. En 1895, en Dinamarca, Bang y Stribolt describieron también cuadros de brucelosis, ratificando que era el aborto su principal signo. Se supuso que el toro distribuía la enfermedad entre las hembras, y también la leche de vaca debido a la identificación de *Micrococcus abortus*, o bacilo de Bang, que hoy se conoce con el nombre de *Brucella abortus*, agente que ocasionaba la enfermedad en los humanos, lo que se confirmó mediante estudios epidemiológicos posteriores.^{vii}

En 1904 se nombró una comisión inglesa presidida por el doctor David Bruce (1855-1931) para revisar la enfermedad, la que toma su nombre de aquel. Un año más tarde, el doctor Zammit, miembro de la comisión, encontró reacciones positivas en casi la mitad de las cabras de Malta y que un número muy importante de ellas secretaba los organismos infecciosos a través de la leche. Este descubrimiento relacionó por primera vez la infección humana con la leche cruda de cabra, por lo que se prohibió su consumo y se redujo por consiguiente el número de personas enfermas y el número de muertes.^{viii}

A principios del siglo XX, la incidencia de brucelosis en los humanos aumentó en las zonas mediterráneas, y después la infección se difundió a los países europeos y sudafricanos. Pero el mayor conocimiento de la enfermedad y el desarrollo de los recursos de laboratorio dieron lugar a que se identificaran con mayor seguridad los casos. En 1909, en el sur de Francia se estudió la coincidencia entre una epidemia humana y los casos de abortos caprinos, al igual que en Rusia, donde también las infecciones de brucelosis eran más frecuentes cuando las borregas y las cabras abortaban. En 1910, los doctores Dalrymple-Champneys y Oxson dieron a conocer que la brucelosis había llegado a límites que comprendían, al norte, el litoral mediterráneo desde España a Turquía; al este, de Beirut a Jerusalén, y al sur, Túnez y Egipto.^x

En Estados Unidos el “aborto contagioso” era ampliamente conocido, pues se cree que la brucelosis había llegado muchos años antes a Texas y Nuevo México; sin embargo, los primeros casos se demostraron hasta 1905, lográndose también identificar al bacilo de Bang en la leche de vacas en apariencia sanas. Los doctores Mohler y Traum aislaron en 1914 el *Micrococcus suis* de cerdos prematuros y también de las amígdalas de niños que se alimentaban con leche cruda^x. Alice Evans, presidenta del Comité Interamericano de Brucelosis, estudió las bacterias de la leche y relacionó al bacilo de Bang con el *Micrococcus melitensis*. En 1920, las tres especies de bacterias descritas recibieron el nombre genérico de *Brucella* en honor al doctor David Bruce.^{xi}

En 1956, Buddle aisló del carnero la especie *Brucella ovis*, asociándola con algunos abortos en las ovejas; Stoenner y Lackman, en 1957, hicieron lo mismo con *Brucella neotomae*, especie que aloja el ratón del desierto, y finalmente Carmichael, en 1967, aisló e identificó como *Brucella canis* al agente del aborto contagioso en los caninos^{xii}.

La predominancia de casos producidos por *Brucella abortus* fue notable en las poblaciones pequeñas y en las zonas rurales y pronto se diseminó a Canadá y a Alaska. Grhenfeld y Butts, en 1934, consideraron que el contacto con las vacas era la principal fuente de infección para los humanos. Aunque Meyer y sus

colaboradores confirmaron los casos de brucelosis caprina, el contagio en humanos fue raro porque ahí se empleaba muy poco la leche de las cabras.^{xiii}

Se dice que, durante la conquista, la enfermedad se extendió a América Latina con las primeras cabras, pero hasta 1912 en Perú se notaron los primeros casos en humanos, y diez años después Morales Otero refirió abortos en el ganado bovino. En Argentina, D'Alessandro informó la aparición de la brucelosis bovina en 1930, Miravent reportó el hallazgo en humanos infectados y Fernández Ithurrat obtuvo *Brucella melitensis* de algunas cabras.^{xiv}

2.3 Desarrollo y extensión en México

En 1921, el Doctor Manuel Vergara planteó el problema de la existencia de la enfermedad en el estado de Puebla, pero no se confirmó hasta que Pláceres, en 1923, logra la identificación de *Micrococcus melitensis*, aislada originalmente en dos de los cinco casos clínicos descritos previamente por Vergara.^{xv}

El primer laboratorio especializado en brucelosis fue fundado en 1937 por el doctor Ruiz Castañeda, quien encaminó sus esfuerzos al conocimiento clínico. Debido al número de casos, la comunidad médica organizó el primer Congreso Nacional de la Brucelosis, acto que el siguiente año se realizó en Guadalajara, donde se dieron a conocer nuevas técnicas de laboratorio. Esto hizo que más casos humanos se lograran diagnosticar, y en el tercer Congreso, realizado en Guanajuato, se recopilaron datos del incremento de casos.^{xvi}

Ante la preocupación de conocer la magnitud real y la distribución de la enfermedad, así como otros aspectos epidemiológicos que orientaran la selección y el control, fue como surgieron los primeros estudios serológicos encaminados a determinar la frecuencia de individuos positivos en diversas zonas del país, como lo muestran los trabajos de Bustamante y Varela^{xvii} que, en 1943, para el Valle de Usumacinta, notificaron una seropositividad de 3.65 por ciento, con fluctuaciones entre 5 y 19.23 por ciento relacionada con una zona donde sólo existía la cría de cerdos. Años más tarde, Tovar estudió 37 000 sueros de braceros provenientes de 17 estados; la

positividad general apreciada fue de 2.7 por ciento. Ese mismo año, León y colaboradores¹⁵ estudiaron los sueros de 1 156 personas supuestamente sanas de la Ciudad de México y encontraron 9.3 por ciento de reaccionantes^{xviii}. En 1963, León y León comunicaron los resultados obtenidos al estudiar 4 181 individuos pertenecientes a siete localidades del centro del país y una de Sonora. La seropositividad promedio fue de 4.5 por ciento, con valores máximos de 23.6 por ciento para Mesillas, Zacatecas y de cero para Tecupeto, Sonora.^{xix}

Entre los estudios más recientes dados entre 1974-1975 se cuentan los de Onofre Muñoz y colaboradores , que realizaron en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) una encuesta seroepidemiológica en localidades urbanas del país, para lo cual emplearon la reacción de fijación en superficie. Sus resultados mostraron una distribución general del padecimiento con tres zonas de mayor prevalencia: la del Golfo de México, con 3.6 por ciento; la del noreste, con 2.6, y la del norte, con 2.4, con una media para el país de 1.6 por ciento^{xx}. Para 1976, Herrera y Santacruz, del IMSS, emprendieron una investigación con el mismo método empleado por Muñoz en habitantes de 30 comunidades rurales de la región ixtlera, que comprende parte de los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas, localizada en la zona de mayor notificación de casos de brucelosis humana. De 4 697 sueros analizados, 884 resultaron positivos, con una frecuencia relativa de 18.6 por ciento.

xxi

En 1996 se publicó en el *Diario Oficial de la Federación* la Norma Oficial Mexicana 041, en la cual se establecen los procedimientos de la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. A pesar de los esfuerzos, solo el norte de Sonora se encuentra libre de la enfermedad desde 1994; en fase de erradicación están Yucatán (2002) y el sur de Sonora (2003); el resto de los estados se encuentra en fase de control. ^{xxii}

En el territorio nacional, la mayor incidencia de brucelosis bovina se observa en el ganado estabulado y en áreas de alta densidad animal, como son las zonas centro, sureste y costeras. La brucelosis caprina tiene una distribución más amplia; se le

puede encontrar en todo el territorio nacional. La mayor frecuencia se registra en aquellas entidades con gran concentración de cabras: Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Querétaro y San Luis Potosí.^{xxiii}

Los esfuerzos encaminados para erradicar la brucelosis en animales consisten en minimizar o suprimir la incidencia de brucelosis humana. Es necesario dar a conocer la enfermedad, la forma de identificarla, la vacunación y eliminar los animales infectados. Llevar a cabo de manera permanente estas medidas permitirá controlar y erradicar la brucelosis en los animales, tras de lo cual habrá mayores oportunidades para las exportaciones e intercambios con los estados que poseen un mejor estatus sanitario

En México la industria lechera es la tercera actividad más importante dentro de la rama de alimentos; al cierre de 2018, la producción acumulada de leche de bovino alcanzó 12 mil 008 millones de litros, es decir 2.0% más que en 2017 y la elaboración de derivados y fermentos lácteos como quesos, crema y yogurt, alcanzó un volumen de un millón 150 mil toneladas, con un valor de 52 mil 104 millones de pesos^{xxiv}.

Es por eso que la leche como alimento debe ser inocuo y proveniente de vacas sanas para no ser promotor de enfermedades, tal como la que estamos estudiando, la brucella.



Ilustración 2 Producción Nacional de leche de bovino

2.4 GENERALIDADES DE LA BRUCELLA

Brucelosis, enfermedad causada por la bacteria intracelular facultativa *Brucella abortus*, es una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial que afecta principalmente al ganado bovino. La mayoría de las especies de *Brucella* pueden infectar a animales distintos de sus huéspedes, cuando están en contacto cercano. Las especies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* y las de mamíferos marinos son patógenas en humanos. ^{xxv}

El género *Brucella* está constituido por bacilos gram negativos pequeños, inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos. ^{xxvi} Tienen un metabolismo

oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares.^{xxvii}

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS^{xxviii}, las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas y su ultraestructura es semejante a la de algunas enterobacterias (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella landau*, *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli*) (5), aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa.^{xxix}

•Colonias lisas (S) Ag O +:
B. abortus, *B. melitensis*, *B. suis*

•Colonias rugosas (R) Ag O -:
B. ovis y *B. canis*.



Ilustración 3 Clasificación de especies Brucella.

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento, los neutrófilos y los macrófagos. La activación del complemento por las vía clásica y alterna juega un rol muy importante en la resistencia contra bacterias gram negativas. Existen controversias en cuanto a la capacidad que posee el LPS de *Brucella* de activar la vía alterna del complemento,^{xxx} sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana.^{xxx} Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella*. La opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Como ya se ha mencionado, *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la desgranulación de los gránulos de los neutrófilos, con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa. Se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evitan así su destrucción. Los neutrófilos de las distintas especies animales reaccionan en forma diferente ante *Brucella*.^{xxxii}

2.5 CUADRO CLÍNICO

La *brucella abortus* causa abortos en bovinos gestantes en la segunda mitad de la gestación (alrededor de 7 meses). La bacteria entra por vía de las membranas mucosas y pueden invadir ubre, ganglios linfáticos y útero. Cuando se sitúa en útero, causa placentitis aguda provocando aborto o mortinatos luego d 2 a 5 semanas después de la infección.

Uno de los signos más comunes en el aborto es la placenta con los cotiledones afectados que pueden variar de normales a necróticos, es decir, rojos – amarillos a negros, la zona intercoledonaria está focalmente engrosada con un aspecto húmedo y similar al “cuero”.^{xxxiii}

2.6 MECANISMO DE TRANSMISIÓN

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos. La activación del C por las vía clásica y alterna juega un rol muy importante en la resistencia contra bacterias gram negativas. Existen controversias en cuanto a la capacidad que posee el LPS de *Brucella* de activar la vía alterna del C^{xxxiv}, sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana. Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella*. La opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Como ya se ha mencionado, *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la desgranulación de los gránulos de los neutrófilos, con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa. Se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evitan así su destrucción.

Los neutrófilos de las distintas especies animales reaccionan en forma diferente ante *Brucella*. Así, los neutrófilos de los cobayos no son capaces de destruir las cepas lisas, mientras que la actividad bactericida de los neutrófilos bovinos frente a estas cepas es mayor que la de los neutrófilos humanos, no registrándose diferencias entre los dos últimos frente a las cepas rugosas.

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos. El ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS. Esta interacción induce también la producción de IL-12 que estimula las células NK y los linfocitos T colaboradores o helper (LTH) CD4+, que secretan IFN- γ , favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune predominantemente mediada por LTH1. Este subgrupo de linfocitos T estimula fundamentalmente la respuesta de tipo celular y participa en forma directa en la protección contra microorganismos intracelulares, ya que su amplio patrón de

citoquinas incluye IL 2, 3, 6, 12, TNF- α y sobre todo IFN- γ , esencial para la activación de macrófagos. Una vez fagocitada la bacteria, los macrófagos poseen la capacidad de destruirla inmediatamente, pero del mismo modo que ha sido descrito para los neutrófilos, Brucella es capaz de inhibir estos mecanismos de destrucción. El hierro presente en los macrófagos tiene un papel preponderante en la eliminación de los microorganismos ya que cataliza una reacción metabólica destinada a incrementar la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, fundamentales en la eliminación de patógenos intracelulares. Los linfocitos también son impactados por distintos antígenos de Brucella. Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro de la célula presentadora de antígenos y sus péptidos asociados a moléculas CMH clase I y II son presentados a los LTH CD4+ y LT citotóxicos (LTC) CD8+. Estos últimos son capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas con Brucella. El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar a los linfocitos B (LB) sin la participación de los LTH. Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos, en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados. Estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos en ciertas propiedades tanto in vitro como in vivo como, entre otras, la incapacidad de activar complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación. Para clarificar el rol de los anticuerpos que se originan durante la infección se han realizado numerosos ensayos experimentales en ratones, demostrándose que anticuerpos anti LPS inyectados en forma pasiva han logrado protegerlos contra infecciones posteriores.^{xxxv}

Por su parte, estudios efectuados en bovinos han demostrado que una elevada concentración de IgG durante una infección activa resulta perjudicial ya que inhibe la lisis complemento dependiente, promueve la fagocitosis de los microorganismos e incrementa la localización intracelular y la diseminación hacia los distintos tejidos. La participación de las citoquinas en el control de la brucelosis ha sido investigada mediante la inyección de citoquinas recombinantes o la inhibición de su actividad

con anticuerpos monoclonales específicos. La IL-1, IL-12, y el TNF- α participan en las etapas tempranas de la infección. El IFN- γ es una de las citoquinas más importantes en la resistencia contra la infección. El TNF- α parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados. Se ha detectado tanto en brucelosis humana como en ratones infectados experimentalmente un incremento en la producción de IL-6, aunque su rol no está completamente definido.^{xxxvi}

2.7 SOBREVIVENCIA

La *Brucella* puede propagarse en fomites, como los alimentos y el agua. En condiciones de humedad alta, temperaturas bajas y de poca luz solar, estos organismos pueden permanecer viables durante varios meses en el agua, fetos abortados, estiércol, lana, heno, materiales de trabajo e incluso la ropa^{xxxvii}. La *Brucella* puede resistir la desecación, en particular cuando existe material orgánico y puede sobrevivir en el polvo y el suelo. La supervivencia es más prolongada cuando la temperatura es baja, especialmente cuando está por debajo del punto de congelación, algunas especies de *Brucella* podrían usarse en ataques bioterroristas.



Ilustración 4 FORMAS DE TRANSMISIÓN

<i>Vía de infección</i>	<i>Puerta de entrada</i>	<i>Fuente de infección</i>	<i>Población de riesgo</i>
oral	mucosa digestiva	leche cruda, derivados lácteos	población en general
por contacto	piel erosionada, conjuntiva, mucosa nasal	productos animales contaminados: placenta, heces, secreciones vaginales	trabajadores en contacto con animales infectados o sus productos (veterinarios, matarifes, cuidadores), personal de laboratorio
respiratoria	mucosa nasal	aerosoles en laboratorios con muestras contaminadas, vacunas vivas, aerosoles en establos, lanas	personal de laboratorio, trabajadores de la lana, personal de limpieza de los establos.
parenteral	inoculación accidental, transfusiones	vacunas vivas, material biológico contaminado	personal de laboratorio, veterinarios, población en general.

Ilustración 5 VÍAS DE TRANSMISIÓN

2.8 SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

Las especies de *Brucella* varían en su distribución geográfica. *B. abortus* se encuentra en todo el mundo, en las regiones ganaderas con excepción de Japón, Canadá, algunos países europeos, Australia, Nueva Zelanda e Israel, donde ha sido erradicada. La erradicación de los rodeos domésticos es casi completa en EE. UU. *B. abortus* permanece en huéspedes de la fauna silvestre en algunas regiones, como el Área Mayor de Yellowstone de América del Norte.

Sin embargo, en algunos países en desarrollo estos programas de control no siempre se aplican basándose en una estrategia epidemiológicamente adecuada, ni se planifican y sostienen teniendo en cuenta un tiempo suficientemente largo para lograr sus objetivos iniciales. Para ayudar a los países miembros a poner en marcha, corregir y aplicar programas de lucha contra la brucelosis con el fin de controlar y erradicar la enfermedad en los seres humanos y los animales.

Un dato interesante es que en 1954 militares estadounidenses emplearon la especie *B. suis* como arma biológica. Afortunadamente los cambios en la política mundial hicieron que esta práctica se abandonara después de la convención sobre armas biológicas y tóxicas en 1972^{xxxviii}

2.9 PATOGENIA

Las especies de *Brucella* son patógenas intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos, y de los mecanismos efectores dependientes de anticuerpos; esto justifica la naturaleza crónica de la infección ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas tanto fagocíticas como no fagocíticas. Cuando estas bacterias ingresan al organismo pueden ser fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata. Si no son eliminadas llegan por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes pudiendo desde allí invadir el torrente sanguíneo, donde son fagocitadas por los PMN y macrófagos circulantes y transportadas, de esta manera, a los diversos órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares^{xxxix}. Los mecanismos de ingreso de la bacteria a estas células no están

suficientemente aclarados aunque se presume que el LPS y las proteínas de la membrana externa podrían participar en los mismos, mediante receptores tipo manosa o integrinas, respectivamente. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa^{xi} y en un factor de crecimiento conocido como eritritol, presente en tejidos placentarios animales, lo que explica la afección de *Brucella* por los mismos^{xii}. La supervivencia de *Brucella* dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidante^{xiii} y a la producción de GMP (guanosina 5´monofosfato) y adenina, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la desgranulación, la activación del sistema mieloperoxidasa-haluro y la producción del TNF- α ^{xiii}. El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. En los mamíferos rumiantes y en el ganado porcino la manifestación clínica es el aborto. En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio, sistema nervioso)

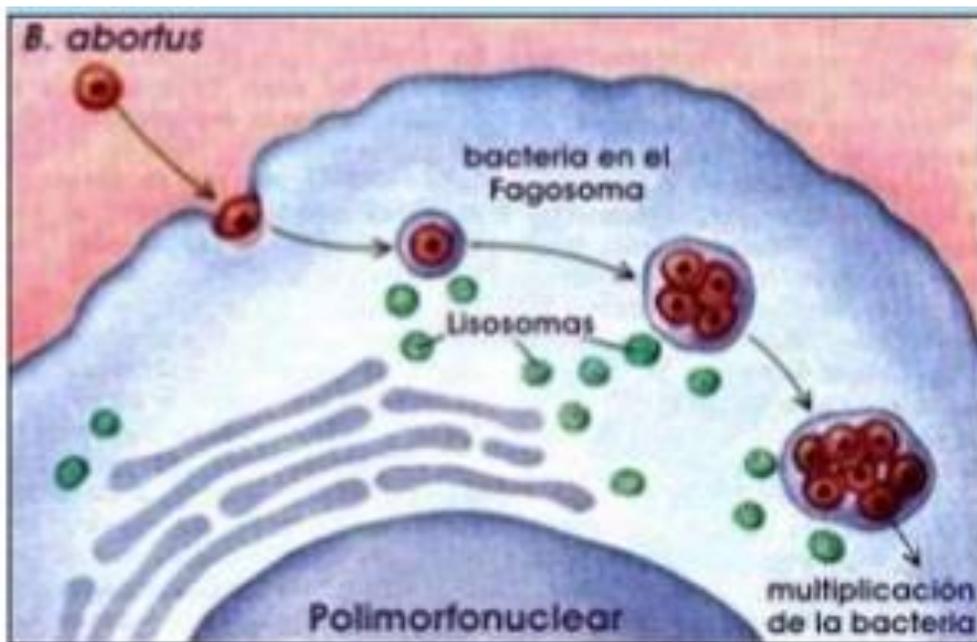


Ilustración 6 PATOGENIA *B. ABORTUS*



Ilustración 7 TRÁNSITO INTRACELULAR DE *B. ABORTUS*

3.- PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

3.1 MÉTODOS DIRECTOS:

Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales o del hombre. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria, frecuentemente a partir de hemocultivos.

La técnica más utilizada para realizarlos es la de Ruiz Castañeda, que consiste en la inoculación de sangre en frascos herméticamente cerrados que contienen,

simultáneamente, un medio líquido (caldo triptosa) y un medio sólido (agar triptosa). Los cultivos deben mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días debido a que las bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento. En los últimos años se han desarrollado sistemas de hemocultivo automáticos o semiautomáticos entre los que se destaca el Bactec, que permite detectar más del 95% de los cultivos positivos antes del séptimo día de incubación. A medida que progresa la enfermedad disminuye la probabilidad de positividad de los hemocultivos, por lo que se hace necesario el aislamiento a partir de ganglios linfáticos, hígado o bazo.^{xliv}

Para estudiar la presencia de antígenos de *Brucella* en distintos tejidos pueden emplearse los métodos:

- ELISA
- Inmunofluorescencia directa
- Hemaglutinación reversa
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2 MÉTODOS INDIRECTOS:

Las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado. Existen numerosas pruebas que están destinadas a detectar no sólo el mayor número de individuos infectados sino al mismo tiempo diferenciar entre infectados y vacunados, así como detectar las reacciones cruzadas.

La mayoría de las pruebas de laboratorio utilizan como antígenos suspensiones de *Brucella* en fase S o R, según la cepa bacteriana. Las cepas recomendadas por los organismos internacionales en la elaboración de los mismos son *B. abortus* 1119-3 ó 99S. Estos antígenos permiten detectar anticuerpos anti *B. abortus*, *suis* y *melitensis*, mientras que para anticuerpos anti *B. canis* y *B. ovis* se necesitan antígenos específicos de especie.

Dentro de las pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico se encuentran:

- A. Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT): es la más antigua (1897) y la más utilizada aún para el diagnóstico de brucelosis animal y humana. Bases metodológicas: se realizan diluciones crecientes del suero a investigar que se enfrentan con cantidades constantes de antígeno observándose la presencia o no de aglutinación luego de un período de incubación. De esa forma se determina el título como la máxima dilución aglutinante. Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%. Anticuerpos: IgM, IgG1 e IgG2. Título significativo: no existe consenso en cuanto al título que indica una infección activa, por lo que debe establecerse regionalmente.

- B. Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2- ME): es una variante de la anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de clase IgM. Bases metodológicas: se realizan simultáneamente las pruebas de aglutinación en tubo con y sin tratamiento del suero con 2-ME. La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM. Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%. Anticuerpos: IgG e IgM. Título significativo: mayor de 1:20.

- C. Reacción de Huddleson: es una reacción de aglutinación rápida en placa. Bases metodológicas: se enfrentan cantidades decrecientes del suero a investigar con cantidades constantes de antígeno y se observa la presencia o no de aglutinación. Existe una escala de títulos, establecida por convención, que permite la expresión de resultados. Antígeno: suspensión de *B. abortus* al 3-10% de gérmenes en fenol, con verde brillante y cristal violeta. Anticuerpos: IgM, IgG1, IgG2 e IgA. Título significativo: mayor de 1:40. En ocasiones se observa el fenómeno de prozona, donde puede estar ausente la aglutinación en los títulos más altos a causa de un exceso de anticuerpos. Este hecho debe tenerse en cuenta para evitar falsos resultados negativos por esa causa.

D. Prueba de Rosa de Bengala: es una prueba rápida en placa utilizada como tamiz. Bases metodológicas: se pone en contacto una alícuota del suero (30µL) con 30µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinaciones. Antígeno: suspensiones de B. Abortus al 8,5%, ajustadas a pH ácido, con el agregado del colorante Rosa de Bengala. Anticuerpos: IgM e IgG1. Se informa como positiva o negativa.

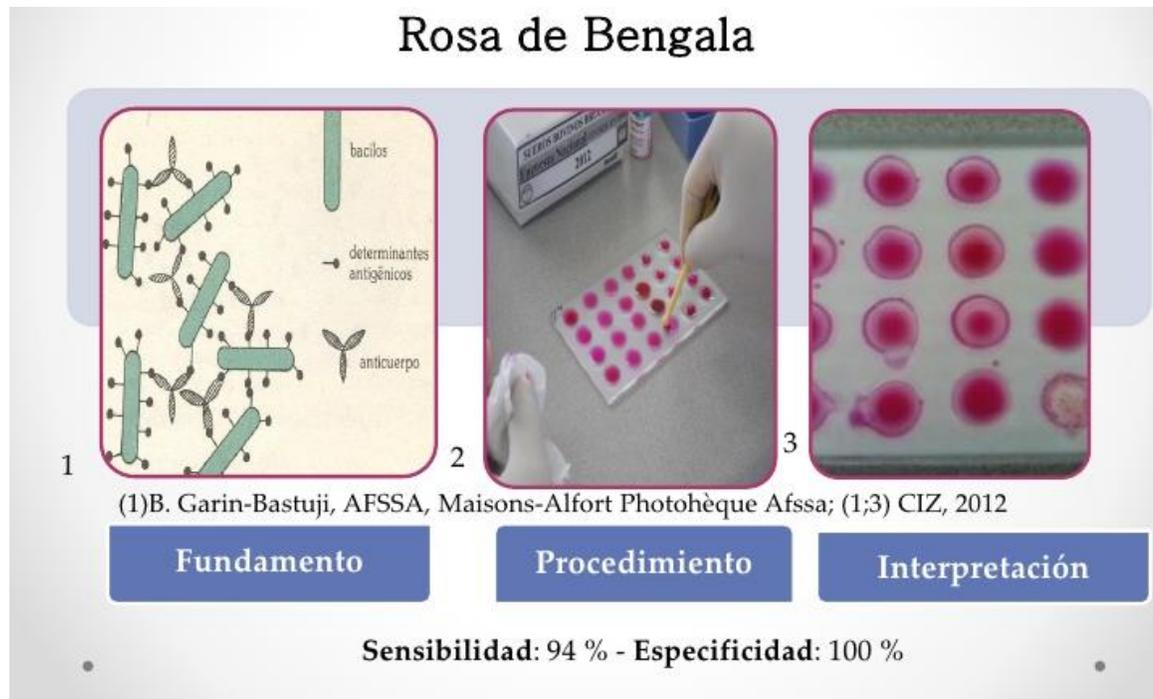


Ilustración 8 PRUEBA ROSA DE BENGALA

E. Antígeno Tamponado en Placa (BPA): es otra de las pruebas tamices que se realiza en placa. Bases metodológicas: se ponen en contacto 80 µL de suero con 30 µL de antígeno y se observa la presencia de aglutinación. Antígeno: suspensión de B. abortus al 11% con cristal violeta y verde brillante. Anticuerpos: IgM e IgG1. Se informa como positiva o negativa según el resultado de la aglutinación.

F. Prueba de Coombs: es una prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos. Bases

metodológicas: se realizan diluciones seriadas del suero a investigar, que se incuban con una suspensión antigénica de *B. abortus* para que se produzca la aglutinación mediada por los anticuerpos completos. Las suspensiones correspondientes a las diluciones mayores se lavan adecuadamente y se agrega suero antiespecie (Coombs) para detectar de esta forma la aglutinación mediada por los anticuerpos incompletos. Antígeno: suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%. Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes de la clase IgG. Título significativo: el título obtenido es, como mínimo el de la aglutinación de la primera etapa y frecuentemente mucho más elevado. Este incremento es tanto mayor cuanto mayor es la concentración de anticuerpos no aglutinantes o incompletos.

G. Fijación de complemento: es una prueba altamente específica y es la prueba de referencia internacional. Bases metodológicas: en la primera etapa de la reacción se incuban diluciones del suero inactivado con el antígeno y el complemento. En la segunda etapa se agrega el sistema hemolítico y se compara la hemólisis con los estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis. Antígeno: puede utilizarse una dilución 1:200 del antígeno empleado en la reacción de Huddleson, o un antígeno soluble denominado HS que se prepara a partir de una suspensión bacteriana tratada con solución salina caliente. Anticuerpos: IgG1. Título significativo: mayor de 1:20 .

H. Inmunofluorescencia indirecta: es una prueba de interacción primaria. Bases metodológicas: se incuban diluciones crecientes del suero a investigar sobre una impronta de *Brucella*. Se agrega luego el anticuerpo anti-especie marcado con una sustancia fluorescente y se observa en un microscopio de fluorescencia, determinándose el título. Antígeno: suspensión de bacterias fijadas a un portaobjeto. Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes. Título significativo: mayor de 1:80. El diagnóstico se puede establecer mediante serología materna combinada con los anticuerpos fluorescentes de la placenta y el feto, o el aislamiento de la *B. Abortus* de la placenta, desecho

(feto, descarga uterina)^{xiv} o bien mediante la prueba de inmunofluorescencia polarizada (PFP O FPA, por sus siglas en ingles), ésta es una innovación tecnológica y como mecanismo se inicia con las muestras a probar deben medirse inicialmente para obtener la lectura basal de autofluorescencia, posteriormente el antígeno conjugado con isotiocianato de fluoresceína es adicionado a la muestra y se deja que el antígeno y anticuerpo interactúen, después se vuelve a medir. Si hay anticuerpos específicos contra *Brucella abortus*, entonces el resultado será una lectura elevada. Esta prueba tiene una sensibilidad del 99.6% y especificidad de 99%, las cuales fueron obtenidas con muestras donde se tenía el aislamiento de *Brucella abortus* (aún no aprobada como prueba oficial, pero en mi testimonio puedo decir que es mucho más precisa y fácil al manejo), presenta una alta sensibilidad, especificidad y seguridad en los resultados, aún en zonas con vacunación^{xvi}. Esta técnica puede realizarse en sangre entera y leche. Bases metodológicas: los anticuerpos al unirse al antígeno cambian la velocidad de rotación de la molécula. Si se hace incidir un haz de luz fluorescente polarizada, el ángulo de difracción cambia en función del anticuerpo unido. Este cambio es medido por un detector que lo traduce en una señal. Antígeno empleado: PSO de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína. La interpretación de esta prueba es similar al ELISA-I.

- I. ELISA: es una técnica altamente sensible, específica y versátil, emplea muy pequeña cantidad de suero y da muy buenos resultados aun en presencia de hemólisis. * ELISA indirecto (ELISA-I): Bases metodológicas: el antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuban con el suero a investigar, posteriormente con un anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas. Antígeno: los antígenos pueden ser particulados o solubles, LPS u otras proteínas bacterianas. Se ha obtenido un antígeno libre de LPS (antígeno CP), que es altamente eficaz en detectar la respuesta a IgG durante una infección activa evitando al mismo tiempo las reacciones

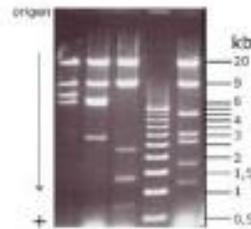
cruzadas debidas al LPS. Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes. La interpretación de esta prueba debe ser aún convalidada. * ELISA competitivo (ELISA-C): Bases metodológicas: se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epitope O del LPS-S, que compite con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima. Antígeno: LPS-S. Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes. Se consideran positivos aquellos sueros con un porcentaje de inhibición mayor del 28%.

J. Prueba de inmunodifusión en agar (IDAG): es una técnica de doble difusión en geles. Bases metodológicas: se efectúa la reacción de doble difusión del suero a investigar frente a un suero control observando las reacciones de identidad. Antígeno: antígeno soluble HS. Anticuerpos detectados: IgG e IgM.

Cultivo y pruebas bioquímicas

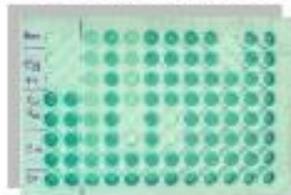


Biología molecular: PCR



Detección directa

ELISAs indirecta y competitiva



Fijación de Complemento

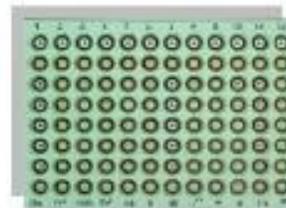


Ilustración 9 Pruebas diagnosticas

Los métodos sugeridos por la OIE (Organización Mundial de la Salud Animal) para el estudio de brucelosis en las distintas especies animales son^{xlvii}:

En bovinos:

- 1) BPA, Rosa de Bengala
- 2) Fijación de complemento
- 3) ELISA-I
- 4) ELISA-C
- 5) FPA.

En caprinos:

- 1) Rosa de Bengala
- 2) Fijación de complemento.

En ovinos:

- 1) Fijación de complemento
- 2) ELISA-I
- 3) IDAG

En porcinos:

- 1) BPA
- 2) Fijación de complemento
- 3) ELISA-C
- 4) ELISA-I
- 5) FPA.

En caninos:

- 1) Huddleson
- 2) Aglutinación con y sin 2- ME
- 3) Aglutinación lenta en tubo

- 4) ELISA-I
- 5) IDAG.

Para el diagnóstico de brucelosis humana se emplean habitualmente como pruebas tamices BPA, Rosa de Bengala o Huddleson y como pruebas confirmatorias aglutinación lenta en tubo con y sin 2-ME, Coombs y fijación de complemento.

Resultados de Diversas Pruebas de Diagnóstico de Brucelosis en bovinos

PRUEBA	Sensibilidad	Especificidad	Especificidad Vacunados**
Tarjeta	98.3*	68.8*	48.6**
Rivanol	99.2*	80.0*	
Tarjeta-rivanol (serie)	95.4*	84.2*	
PFP	99.0*	96.9*	99.2**
Fijación de Compl. (aC -)	97.1**	93.1**	49**
ELISA-I	100**	99.8**	56.3**
ELISA-C	100**	99.8**	97.7**

•Estudios de México ** Estudios Internacionales

Figure 1 comparativa de pruebas de diagnóstico de brucelosis en bovinos

Sin embargo en México se tiene como Pruebas Confirmatorias las siguientes^{xlviii}:

1. Prueba Presuntiva de Aglutinación con Antígeno Rosa de Bengala, método indirecto que emplea brucelas inactivadas y teñidas que mediante la observación de la aglutinación, demuestra anticuerpos específicos en el suero del paciente sospechoso de la enfermedad y deberá realizarse conforme a lo siguiente:

- Indicada en pacientes con sintomatología de brucelosis.
 - La muestra biológica requerida es suero del paciente o líquido cefalorraquídeo v Se utiliza un antígeno para buscar la presencia de un aglutinado de rosa intenso.
 - La interpretación del resultado es cualitativo (positivo o negativo), positivo presencia de aglutinación, negativo ausencia de aglutinación. Si el resultado es positivo (prueba presuntiva), debe confirmarse mediante las pruebas de SAT y 2-ME.
2. Prueba Confirmatoria de Aglutinación Estándar (SAT), consiste en la demostración de anticuerpos antiBrucella por aglutinación, utilizando bacterias inactivadas que permiten identificar inmunoglobulinas específicas de las clases IgM (demuestra infección en etapa inicial), IgG (demuestra infección en etapa crónica) e IgA (demuestra infección previa), deberá realizarse conforme a lo siguiente:
- Indicada en pacientes con sintomatología de brucelosis y prueba rosa de Bengala positiva.
 - Muestra requerida: suero, plasma o líquido cefalorraquídeo.
 - Emplea como antígeno una suspensión de Brucella abortus inactivada, no teñida, la cual se agrega a diluciones de la muestra problema en solución salina fenolada, se incuba y se busca la presencia de mallas de aglutinación.
 - El informe corresponde al título obtenido y este es considerado positivo con dilución igual o mayor a 1:80
3. Prueba Confirmatoria de Aglutinación en Presencia de 2- Mercapto Etanol (2-ME) para la demostración de anticuerpos antiBrucella por aglutinación en presencia de este reactivo, es similar a la prueba de SAT, pero al agregarse el 2-mercaptoetanol éste inactiva la IgM, por lo que de presentarse la aglutinación éstas serán de IgG; la prueba deberá realizarse conforme a lo siguiente:
- Indicada en pacientes con sintomatología de brucelosis, prueba rosa de Bengala positiva, se realiza simultáneamente con la prueba de

SAT. v Muestra requerida se utiliza suero, plasma o líquido cefalorraquídeo.

- Emplea como antígeno una suspensión de *Brucella abortus* inactivada, no teñida, la cual se agrega a diluciones de la muestra problema en solución salina 2 mercaptoetanol, se incuba y se busca la presencia de mallas de aglutinación.
 - El informe corresponde al título obtenido y este es considerado positivo con dilución igual o mayor a 1:20.
4. ELISA IgM: Prueba practicada en forma experimental por el LESP del SESA de San Luis Potosí, se aplica de manera simultánea con SAT y 2-ME en suero, en el momento en el que se sospecha clínicamente de la enfermedad o bien, durante los tres primeros meses del curso de la misma. v
 5. Aislamiento en Hemocultivo y Tipificación de la Bacteria: Existen mayores probabilidades de lograrlo al inicio de la fase febril de la enfermedad, pero no durante el pico febril y antes de dar inicio al tratamiento con antibióticos; la muestra puede ser sangre total, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o ganglios linfáticos, para los cuatro primeros se recomienda utilizar medio de cultivo bifásico de Ruiz-Castañeda, para ganglios linfáticos solución salina estéril, posterior a seis semanas de incubación de la muestra seleccionada se siembra en cualquiera de los siguientes medios de cultivo: agar sangre o agar soya tripticasa (TSA) o agar MacConkey durante 4-5 días; para que el técnico del laboratorio proceda a llevar a cabo los estudios de identificación de la especie y su tipificación de las brucelas aisladas. ^{xlix}

	Prueba		Interpretación
	SAT	2-ME	
a	Positivo	Negativo	Infección en etapa inicial
b	Positivo	Positivo	Infección de curso prolongado
c	Negativo	Positivo	Revisar técnica, repetir estudio
d	Negativo	Negativo	Repetir estudio, si se mantiene (-) se descarta brucelosis

Ilustración 10 Interpretación de los resultados en las pruebas confirmatorias

Prueba			Resultado	Interpretación
Rosa de Bengala	SAT	2-ME		
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Positivo	Negativo	Negativo	Indeterminado	Memoria inmunológica
Positivo	Menor 1:80	Negativo	Indeterminado	Paciente saliendo de la infección infección en curso
Positivo	Igual o mayor 1:80	Negativo	Positivo	Positivo
Positivo	Igual o mayor 1:80	1:20 o mayor	Positivo	Positivo
Positivo	1:20 o mayor	01:20	Positivo	Positivo

Ilustración 11 Pruebas Confirmatoria de México

La prueba de tarjeta se ha caracterizado por tener una alta sensibilidad, por lo que fue la prueba de tamiz oficial de la campaña nacional contra la brucelosis en los animales y está fundamentada legalmente en la NOM041-ZOO-1995^l. Sin embargo, la prueba no es confiable para diferenciar los anticuerpos vacunales o los pasivamente adquiridos por medio del calostro, de los anticuerpos causados por la enfermedad^{li}. En un estudio realizado por Aparicio et al.¹⁴ se menciona que utilizar una prueba diagnóstica de tamiz como la de tarjeta, aunada a la prueba de FPA, mejoraría considerablemente la capacidad de distinguir los anticuerpos vacunales de los anticuerpos causados por la infección.

La FPA es una prueba utilizada en diferentes países como método oficial de diagnóstico de brucelosis en bovinos, cerdos, bisontes y cérvidos. Esta prueba ofrece sensibilidad y especificidad muy elevadas en bovinos, superiores a las que se usan actualmente en México.

4.- BIOSEGURIDAD

Como la OIE nos comenta en su glosario, bioseguridad es un conjunto de medidas físicas y de gestión diseñadas para reducir el riesgo de introducción, radicación y propagación de las enfermedades, infecciones o infestaciones animales hacia desde y dentro de una población animal. ⁱⁱⁱ

La Bioseguridad se conceptualiza como las buenas prácticas de manejo que se realizan para controlar y prevenir las enfermedades que afectan la salud pública y animal; o bien como las medidas zoonosanitarias que evitan la introducción y difusión de la enfermedad en un hato ganadero.

5.- PROCEDIMIENTOS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

5.1 VACUNACIÓN

Desde el año 1906 se investiga el desarrollo de vacunas humanas inocuas y eficaces. La aplicación en el hombre de vacunas a gérmenes muertos o vivos atenuados se ha dejado de lado por su baja eficiencia y por las reacciones colaterales que producen.ⁱⁱⁱ Las vacunas elaboradas con complejos de proteínas y polisacáridos extraídos con ácido acético de la pared de *B. abortus* cepa S19 no han demostrado ser eficaces.^{iv} Otro tanto ocurre con las fracciones antigénicas insolubles en fenol de *B. melitensis* cepa M15 y *B. abortus* cepa S19. Debe, además, investigarse previamente si el individuo tuvo una primoinfección con el germen, ya que en este caso las citadas vacunas producen diversas reacciones adversas (dolor local, fiebre, eritema, mialgias). En cuanto a las vacunas para animales, las más ampliamente utilizadas se obtienen a partir de cepas vivas atenuadas.^{iv} En muchos países el control de la brucelosis en pequeños rumiantes se basa en el uso de la vacuna viva Rev 1, obtenida a partir de *B. melitensis*. Esta vacuna, cuando se administra en forma subcutánea, induce la producción de una intensa y prolongada respuesta de anticuerpos, en cambio, su administración en la conjuntiva, reduce significativamente la intensidad y duración de estas respuestas postvacunales^{vi}. En Argentina, hasta el año 1998 sólo se aplicaba en bovinos la vacuna elaborada a partir de *B. abortus* cepa S19. Esta cepa fue aislada en el año 1923 a partir de leche de vaca, como cepa virulenta, y se mantuvo a temperatura

ambiente durante un año en el laboratorio para obtener bacterias atenuadas. Es incapaz de crecer en presencia de eritritol, y aunque es de baja virulencia, la vacunación subcutánea en hembras preñadas puede ocasionar abortos. La principal desventaja de esta vacuna es que los anticuerpos generados interfieren en las pruebas diagnósticas más comúnmente utilizadas, que emplean antígenos con LPS-S. La semejanza antigénica, a nivel de esta molécula entre las cepas que se utilizan en vacunación y las cepas salvajes puede explicar la similitud de respuesta inmune que existe entre un animal vacunado y otro infectado. La mayoría de los animales con una infección activa presentan niveles elevados de anticuerpos anti-LPS. Estos anticuerpos también son producidos en los animales inmunizados con vacunas constituidas por bacterias vivas atenuadas en fase lisa, por ello resulta tan difícil discriminar entre ganado infectado y ganado sano vacunado. Para resolver este inconveniente se han desarrollado diversas estrategias. Una de ellas fue la de inmunizar con bacterias en fase rugosa, que no poseen polisacárido O en su LPS. La primera cepa bacteriana usada con este fin fue *B. abortus* 45/20, obtenida a partir de la cepa *B. abortus* 45 por 20 pasajes sucesivos en cobayos, que dejó de aplicarse ya que tendía a volverse lisa y virulenta. Otra cepa utilizada fue *B. abortus* RB51, seleccionada a partir de la cepa *B. abortus* 2308 en presencia de rifampicina. Es una cepa atenuada que no produce abortos cuando se inmunizan hembras preñadas, parecería ser de baja virulencia para el hombre, se aplica en una sola dosis y genera protección aún aplicada en forma oral.^{lvii} Esta vacuna es usada actualmente en los Estados Unidos como vacuna oficial y desde 1998 comenzó a aplicarse también en este país. Por otra parte se han obtenido mutantes que carecen del gen que codifica para la enzima involucrada en la síntesis del polisacárido O del LPS,^{lviii} a partir de *B. melitensis* y *B. suis* que fueron muy eficaces en generar protección, particularmente en ovejas, cabras y cerdos. Se están realizando estudios que tienden a identificar proteínas que pudieran usarse en el diagnóstico para luego anular su expresión en bacterias vivas atenuadas. Las mutantes así obtenidas no inducirían la producción de anticuerpos contra esta proteína, que podría ser empleada como antígeno en las distintas pruebas diagnósticas. De todas las proteínas investigadas hasta este momento la que ha logrado resultados más alentadores es la proteína periplásmica BP26 (Omp28). Se

han obtenido mutantes de *B. abortus* S29 que no expresan BP26 y se ha demostrado que generan protección en ratones. Por último se deben mencionar los ensayos de inmunización con plásmidos portadores de genes bacterianos que codifican para las proteínas L7/L12 y lumazina sintetasa que permiten obtener buenos resultados, aunque aún debe establecerse si este tipo de vacunación genera una protección prolongada^{lix}. Por lo expuesto, el gran capítulo de la vacunación, tanto en el hombre como en animales, se encuentra en intenso estudio y el futuro dirá si es posible disponer de una vacuna protectora y específica para el género, económica y de masiva disponibilidad y que permita diferenciar entre individuos vacunados e infectados.

Ya sabiendo la descripción de las vacunas, entenderemos lo que la Secretaría nos manda.

Todas las vacunas utilizadas en la campaña serán constatadas y autorizadas por la Secretaría debiendo probarse cada lote producido conforme a las disposiciones de la misma. En la campaña se deben utilizar vacunas vivas, atenuadas y liofilizadas, para prevenir la brucelosis en bovinos, caprinos y ovinos. Todas las vacunas deben aplicarse por vía subcutánea.

La vacunación para bovinos se ajustará a lo siguiente:

Las vacunas utilizadas para la inmunización deben estar elaboradas con la **cepa 19** de *Brucella abortus* u otra que autorice la Secretaría, la campaña utiliza 2 tipos de vacuna **cepa 19**: una considerada como vacuna en **dosis clásica** para prevenir la enfermedad en becerras de 3 a 6 meses de edad, y otra para hembras mayores de 6 meses, incluso gestantes, denominada vacuna de dosis reducida. Esta última puede aplicarse en hembras 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. También puede aplicarse en hembras mayores de 6 meses que no recibieron la vacuna con dosis clásica, así mismo, ninguna vacuna debe utilizarse para prevenir la brucelosis en bovinos machos, por lo tanto no debe aplicarse la vacuna cepa 19 a bovinos castrados. La vacuna clásica para becerras de 3 a 6 meses de edad debe contener por lo menos 1×10^{10} UFC de *Brucella* por cada mililitro de vacuna reconstituida. Las becerras

de 3 a 6 meses de edad, deben ser vacunadas con 5 ml de vacuna cepa 19 en dosis clásica, lo cual representa un mínimo de 5×10^{10} UFC de *Brucella*. No debe utilizarse en hembras mayores de 6 meses, ni menores de 3 meses de edad.

La vacuna **cepa 19 en dosis reducida**, debe contener un título de 3×10^8 a 3×10^9 UFC de *Brucella* por cada dosis, equivalente a 2 ml debe aplicar a hembras mayores de 6 meses de edad, aun gestantes. Bajo ninguna circunstancia se permitirá diluir la vacuna en presentación de dosis clásica, para obtener dosis reducidas.

En México esta vacuna se empezó a elaborar y aplicar en 1951, y a partir de 1997 en la campaña oficial se dejó de utilizar y fue reemplazada por la vacuna RB51. Sin embargo, a partir del 2006 se empezó a producir nuevamente la vacuna S19 y en la actualidad son aplicadas ambas vacunas de manera indistinta.

La campaña de vacunación utiliza dos modalidades de la vacuna S19: la primera es conocida como vacuna en **dosis clásica (Brucel N-19)**, la cual debe contener por lo menos 1×10^{10} UFC de *Brucella* por cada mililitro de vacuna reconstituida y se aplica a becerras de tres a seis meses de edad en dosis de 2 ml, que representa un mínimo de $2-8 \times 10^{10}$ UFC de *Brucella*.

La segunda se conoce como vacuna de **dosis reducida (Brucel R-19)** la cual se aplica a hembras mayores de seis meses de edad que no recibieron la vacunación con la dosis clásica, incluso aunque estén gestantes. La dosis reducida debe contener un título de 3×10^8 a 3×10^9 UFC de *Brucella* por cada dosis, equivalente a 2 ml. Por ningún motivo la vacuna en presentación de dosis clásica se puede diluir para obtener la vacuna de dosis reducida.

La cepa S19 es muy estable pues no se han observado cambios en su virulencia o inmunogenicidad. Con esta vacuna se ha logrado erradicar la brucelosis en varios países.

Sin embargo, se deben considerar los siguientes inconvenientes durante la vacunación:

- En animales adultos la persistencia de títulos serológicos contra una fracción del LPS dificulta el diagnóstico de la enfermedad.
- El riesgo de que provoque abortos es de 2 a 3%.
- En vacas en lactación se han observado infecciones mamarias persistentes debido a la excreción activa en la leche.

La **cepa RB51** es de morfología rugosa, pues carece de la cadena “O” del lipopolisacárido. Esta característica le otorga cierta ventaja, ya que **no induce la presencia de anticuerpos que puedan ser detectados durante los muestreos de las campañas oficiales para el diagnóstico de la enfermedad**; por tanto, es posible diferenciar los animales vacunados de los infectados.

Al igual que la cepa S19, en México se cuenta con dosis becerra y una dosis para animales adultos (dosis reducida). La dosis becerra contiene $1-3 \times 10^{10}$ UFC, mientras que la dosis reducida para vacas mayores de 12 meses de edad contiene $1-3 \times 10^9$ UFC. Otra ventaja de esta vacuna es su escasa virulencia residual, aunque se ha demostrado que la revacunación puede causar aborto y excreción de la bacteria en la leche y el exudado vaginal.

- *Brucelosis caprina*. En ganado caprino se recomienda iniciar con un programa de vacunación en el cual las hembras de tres a cuatro meses de edad deberán ser vacunadas aplicando una dosis única de la presentación clásica de la vacuna Rev (**Melirev N**)1 ($1-2 \times 10^9$) por vía subcutánea, esta vacuna protege al animal durante toda su vida. Cuando la vacuna se aplica a hembras mayores de seis meses de edad, la inmunidad tendrá una duración de 4 a 20 meses; además, al inmunizar a animales preñados

existe riesgo de provocar abortos. Por esta razón se recomienda que la vacuna se aplique exclusivamente a cabritas en el rango de edad recomendado. La Rev 1 es una cepa no dependiente de estreptomycin, de baja virulencia, altamente antigénica, estable y no revierte a patógena por pases continuos. La bacteria puede ser excretada esporádicamente en la leche de las hembras vacunadas. La vacuna RB51 en cabras no se debe de utilizar ya que no es efectiva contra *B. melitensis*.

- *Brucelosis ovina*. No existe vacuna para prevenir la brucelosis ovina ocasionada por *B. ovis*; sin embargo, la vacuna Rev 1 si previene la enfermedad provocada por *B. melitensis*. Esta vacuna se aplica por vía subcutánea a hembras de tres a cuatro meses de edad en dosis clásica, y en dosis reducida en hembras mayores de cuatro meses de edad, recomendándose la vacunación de hembras vacías. La cepa RB51 no confiere inmunidad contra *B. melitensis*.

El Médico Veterinario oficial o aprobado debe instrumentar la identificación permanente del animal mediante el arete oficial u otro medio de identificación que la Secretaría determine.

Hemos visto que es importante la vacunación, así como vimos el punto en que las cabras han sido actoras principales de la diseminación de brucellas, por lo tanto es clara la importancia de su vacunación en caprinos y ovinos.^{lx}

5.2 Control de la Incorporación de nuevos animales al hato

Todo animal que se pretenda incorporar a la UPP debe proceder de hatos libres de

enfermedades como brucelosis y tuberculosis; además, debe cumplir con otra prueba diagnóstica 60 días después de la última reportada para el animal, la cual se espera resulte negativa. Para reducir la posibilidad de entrada de otras enfermedades, se recomienda que los animales a incorporarse cumplan una cuarentena, es decir, que permanezcan aislados físicamente del resto del hato en un lugar apartado, lejos de las instalaciones principales en donde se encuentra el hato o rebaño, y no puedan entrar en contacto con éstos antes de pasar este periodo de aislamiento en el que se confirme clínicamente que el animal está sano. En los sistemas extensivos, el animal deberá permanecer aislado antes de ser incorporado a la pradera con el resto de los animales.

5.3 Prevención del contacto con animales de otros hatos

En explotaciones intensivas, como es un hato lechero, el contacto directo de los animales con otros ajenos a la UPP puede ser controlable debido a que el predio tiene delimitado el acceso, lo que impide el paso de personas y animales ajenos. En un hato lechero que cuentan con corrales cercadas es posible evitar este contacto; sin embargo, en áreas comunes el riesgo de mezclarse con otros es permanente. En este caso, para el uso de estos recursos de apacentamiento es muy importante establecer con la comunidad un reglamento en el que se estipule el manejo de los animales.

Debido al riesgo de transmisión de enfermedades, el personal que labora en el hato, deberá evitar en lo posible el contacto con animales de otros hatos. El médico veterinario también debe ser extremadamente precavido y asegurar una adecuada limpieza y desinfección de su ropa de trabajo, botas equipo y herramientas, así como la remoción física de la materia orgánica (sangre, heces y otros residuos).

En la medida en que sea posible, deberá evitarse la entrada de vehículos de proveedores o compradores al hato, debido a que estos vehículos generalmente recorren varias granjas y podrían acarrear materia orgánica potencialmente

contaminada. Es recomendable asignar áreas especiales para recibir insumos alimenticios, concentrados o implementos, o para entregar leche, animales, etc...

Al detectar un animal positivo a brucella, debe ser eliminado, cuando sea detectado y/o eliminado algún animal reactor en instalaciones de tipo intensivo, debe realizarse la desinfección química de la explotación afectada, en especial en aquellos sitios donde se alojaba dicho animal.

Para realizar la desinfección debe hacerse una limpieza mecánica previa y un lavado energético con agua y jabón, con el objeto de eliminar la materia orgánica (arco sanitario a la entrada, desinfección de camionetas y personal), los productos del aborto como fetos, placentas y membranas, deben ser incinerados o enterrados a una profundidad mínima de 1.5 metros y cubiertos con una capa de cal viva de al menos 2 centímetros de grueso, en lugares donde se asegure que no se contaminará materia orgánica o mantos freáticos.



Ilustración 12 Personal de Comité de Campaña, desinfectando al llegar al Hato

Todos los productos químicos desinfectantes utilizados en las actividades de la campaña, deben ser aprobados y registrados por la Secretaría o por la Secretaría

de Salud, se debe evitar todo contacto de los desinfectantes con alimentos tanto de consumo humano como animal.

Los desinfectantes recomendados para eliminar a la *Brucella* spp son:

1. Solución de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio
2. Solución de sosa cáustica al 2%
3. Suspensión de cal recién apagada al 15%
4. Emulsión de creolina al 5%
5. Solución de fenol al 1%
6. Otros desinfectantes que determine la Secretaría



Ilustración 13 Personal de Comité de Campaña, desinfectando camas de Hato

DESINFECTANTE	CONCENTRACION DE LA SOLUCION	TEMPERATURA DE LA SOLUCION	TIEMPO DE EXPOSICION
Solución de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio	2.5% de cloro activo	20° C	1 hora
Solución de sosa cáustica	2%	70°-80° C	3 horas
Suspensión de cal recién apagada	15%	Ambiente	1 hora
Emulsión de creolina	5%	60°-70° C	1 hora
Solución de fenol	1%	37° C	15 min.

Ilustración 14 Datos de desinfectantes

5.4 Restricción de los animales con posibles vectores

En todo hato se debe llevar un programa de control de roedores mediante cebos que se colocan principalmente en las áreas donde éstos anidan. Todos los accesos al rancho se mantendrán cerrados para evitar la entrada de todo tipo de animales. Además, se debe mantener estricta vigilancia para impedir que los animales de compañía como perros y gatos (ajenos y propios) tengan contacto con el ganado.

5.5 Manejo correcto de los fómites

Se debe de evitar el contacto directo de los animales con objetos inertes que fueron utilizados con otros animales o con sus desechos, debido a que éstos pueden servir de vehículo para los microorganismos patógenos. Se deben emplear agujas nuevas (estériles) para inyectar a cada animal, y el material de uso colectivo, como instrumental quirúrgico, debe someterse a procedimientos estrictos de limpieza y desinfección.

Estas precauciones también son necesarias en equipos y utensilios como aretadoras, tatuadoras, tijeras, trasquiladoras, palas, cubetas, ropa de trabajo, etc.

Las hembras infectadas con brucelosis excretan gran cantidad de bacterias durante el parto o el aborto, las cuales contaminan el alimento, el suelo, las camas y el agua. Para evitar la contaminación del alimento y el agua con las secreciones o los tejidos de fetos abortados, en la explotación deben designarse áreas de parideros específicas para las Hembras infectadas con brucelosis.

Recordemos que las brucelas también son excretadas en la leche, por lo que el humano puede adquirir la enfermedad al consumir leche cruda y subproductos lácteos como queso fresco, helados, mantequilla, etc., elaborados con

Leche no pasteurizada. Esta enfermedad también se adquiere a través de abrasiones o cortaduras en la piel, por salpicaduras en la conjuntiva, por aerosoles formados en algún proceso, por transfusiones de sangre o por el trasplante de tejidos, y por auto-inoculación accidental durante la vacunación y toma de muestras. Debido al alto riesgo de contagio, la brucelosis es considerada como una enfermedad ocupacional entre vaqueros, veterinarios, ganaderos, matanceros y técnicos de laboratorio. Por ser la brucelosis una zoonosis, es aconsejable que las muestras sean tomadas por un médico veterinario, quien tiene amplios conocimientos sobre los procedimientos para la toma y el manejo de las muestras de animales enfermos. En los casos de aborto, al recolectarse muestras de fetos y placentas, obligatoriamente se deben utilizar prendas de protección como bata, guantes de látex, cubre bocas y anteojos.



*Ilustración 15 Personal de Campaña
tomando muestras sanguíneas*

7.- CONCLUSIONES

He descrito a la bacteria, su mecanismo de acción, su patogenia y las formas para combatirla y su prevalencia en México, nos es de suma importancia para la inocuidad alimentaria, economía y salud pública y animal.

Por conclusión, con los datos ya presentados y la práctica diaria, puedo decir que llevando a cabo las medidas de Bioseguridad antes descritas, debiéramos eliminar o lograr una gran disminución de la prevalencia de Brucella en un Hato, el punto clave es no dejar de persistir en las medidas, ya que en algún momento de descuido podemos derrumbar lo ya trabajado, lo cual redundaría en grandes pérdidas económicas, tanto para ganaderos como para la región e incluso el país, teniendo en cuenta que la salud pública y animal estaría en riesgo.



Ilustración 16 Trabajando

8.- BILIOGRAFIA

ⁱ Moreno, E. (2002): Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol*; 90: 31-38.

ⁱⁱ SAGARPA. (2003): Normas oficiales mexicanas, NOM-200. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. http://www.qro.sagarpa.gob.mx/Normas_oficiales/Catalogo_de_normas/NOM_ZOO/nom-zoo.htm.

-
- iii López-Merino A. Brucellosis in Latin American. En: Young EJ, Corbel MJ, ed. Brucellosis: clinical and laboratory aspects. Florida: CRC Press, 1989:151-162.
- iv R Rivers, E Andrews, A González-Smith , G Donoso, A Oñate *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids, Laboratorio de Inmunología Molecular, Departamento de Microbiología
- v Duran de Cottes A. Fiebre de Malta. Ed. Morata. Madrid, España. 1941. p. 11-28.
- vi Hernández R., Brucelosis. Rev Med UV. 2002 ; cap.2 pp.35-38
- vii CRAWFORD, R., HIDALGO, R., (1977).- Bovine Brucellosis.
- viii Wyatt HV, J R Soc Med. 2005 Oct; How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. 98(10): 451–454
- ix Sir,BT., M.A., D.M., B.CH., D.P.H. (Oxon.), F.R.C.P. (London)WeldonDalrymple-Champneys(Deputy Chief Medical Officer), 1948 A study of the epidemiological aspects of undulant fever in this country, pp. 239-243
- x Pedro-Pons A. Patología y Clínica Médicas. Tomo VI. Enfermedades Infecciosas. Salvat Ed. Barcelona, España. 1952. pp 367-409.
- xi C.A. Vega-López, R. Ariza-Adraca, F.L. Rodríguez-Weber. Brucelosis. Una infección vigente. Acta Med, 6 (2008), pp. 158-165
- xii David McFarlane, R. M. Salisbury, H. G. Osborne, J. L. Jebson, (2008) Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season
- xiii ALCAINO, H., (1962).- Brucelosis, consideraciones generales y análisis estadístico del desarrollo y resultado del programa de erradicación de la brucelosis caprina en el Cajón del Maipo. Tesis Med. Vet. U. de Chile.
- xiv ALCAINO, H., (1962).- Brucelosis, consideraciones generales y análisis estadístico del desarrollo y resultado del programa de erradicación de la brucelosis caprina en el Cajón del Maipo. Tesis Med. Vet. U. de Chile.
- xv Silva R. Contribución al estudio de la bibliografía mexicana sobre la brucelosis. Primera Reunión Interamericana de la Brucelosis. México, D.F.: Hospital General de México, 1948.

-
- ^{xvi} Ruiz Castañeda M. Brucelosis, un problema universal. México, D.F.: Prensa Médica Mexicana 1954.
- ^{xvii} Bustamante ME, Varela G. Investigación serológica de fiebre tifoidea, brucelosis y sífilis y del tipo sanguíneo en el Valle del Usumacinta. Rev Inst Salub Enf Trop 1943; 4(1): 1-8.
- ^{xviii} Tovar RM. Incidencia de brucelosis y tularemia en México. Determinación de reactores serológicos humanos. Rev Inst Salub Enf Trop 1947; 8(1): 39-48.
- ^{xix} León PA, León MR. The prevalence of human brucellosis in Mexico as shown by the skin test, complement fixation and agglutination reactions. Rev Inst Salub Enf Trop 1964; 24: 55-63.
- ^{xx} Muñoz O, Coll R, Cerda MS, Gutiérrez G Seroepidemiología de la brucelosis en la República Mexicana. Gac Med Mex 1976; 3: 103-108.
- ^{xxi} Herrera J, Santacruz VJ. Investigación seroepidemiológica de la brucelosis en algunas comunidades rurales de la región ixtlera. Bol Med IMSS 1979; 21:203-212.
- ^{xxii} SAGARPA. (2003): Normas oficiales mexicanas, NOM-200. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. http://www.qro.sagarpa.gob.mx/Normas_oficiales/Catalogo_de_normas/NOM_ZOO/nom-zoo.htm.
- ^{xxiii} UNAM, CANIFARMA, SARH. Brucelosis. II Foro Nacional. México, D.F.: CANIFARMA, SARH, 1988.
- ^{xxiv} Boletín de Leche Octubre-Diciembre 2018 - SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA, <http://www.siap.gob.mx>
- ^{xxv} Cloeckert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, GarinBastuji B, Foster G, et al. Classification of Brucella spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. Microbes Infect 2001; 3(9): 729-38
- ^{xxvi} Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, et al. Genome structure and phylogeny in the genus Brucella. J Bacteriol 1997; 179 (10): 3244-9.
- ^{xxvii} Wilfert CM. Brucella. En: Zinsser, Microbiología. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18 Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986, p. 764-71.
- ^{xxviii} Ariza Cardenal J. Brucelosis. En: Farreras-Rozman, Medicina Interna. 13ra Edición. Barcelona: MosbyDoyma libros S.A.; 1995, p. 2312-7

^{xxix} Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA. Observations of serological cross reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev Biol Stand* 1983; 56: 341-8

^{xxx} Corbeil LB, Blau K, Inzana TI, Neilsen KH, Jacobson RH, Corbeil RR et al. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 1988; 56: 3251-61.

^{xxxi} Hoffmann EM, Houle JJ. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21(3): 153-63

^{xxxii} Teixeira-Gomes A, Cloeckert A, Zygmunt MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2954-61.

^{xxxiii} NICOLETTI, P., (1980).- Epidemiology of Bovine Brucellosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Vol. 24, 69-98.

^{xxxiv} Corbeil LB, Blau K, Inzana TI, Neilsen KH, Jacobson RH, Corbeil RR et al. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 1988; 56: 3251-61.

^{xxxv} Margni RA, Hajos S. Biological and physicochemical properties of purified anti-DNP guinea-pig nonprecipitating antibodies. *Immunology* 1973; 24(3): 435-43

^{xxxvi} Ko J, Splitter G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccines development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 65-78.

^{xxxvii} R Rivers, E Andrews, A González-Smith , G Donoso, A Oñate *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids, Laboratorio de Inmunología Molecular, Departamento de Microbiología

^{xxxviii} S.J. Cluter, A.M. Whatmore, N.J. Commander. *Brucellosis*, *J Appl Microbiol*,: New aspects of an old disease. (2005), pp. 1270-1281

^{xxxix} Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998; 66(12): 5711-24.

^{xl}Pontow S, Kery V, Stahl D. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 1992; 137: 221-41.

^{xli} Aréstegui MB, Gualtieri CS, Domínguez J, Scharovsky G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet Mex* 2001; 32(2): 131-9.

^{xlii} Teixeira-Gomes A, Cloeckert A, Zygmunt MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2954-61.

^{xliii} Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'- guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* 1986; 154(3): 464-70

^{xliv} Ruiz de Castañeda M. Laboratory diagnosis of brucellosis in man. *Bull WHO* 1961; 24: 73.

^{xlv} EL MANUAL DE MERCK DE VETERINARIA, 2000, APARATO REPRODUCTOS, ABORTO EN ANIMALES, P. 1111

^{xlvi} MC. Carlos Ramírez Pfeiffer, 2011, Prueba de fluorescencia polarizada para el diagnóstico de brucelosis en bovinos (INIFAP/SAGARPA)

^{xlvii} <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/Brucellosis/>

^{xlviii} Manual de toma y envío de muestras para el diagnóstico de *Brucella* del InDRE, <http://www.salud.gob.mx/indre/>

^{xlix} DOF. “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales” Norma Oficial Mexicana NOM-041- ZOO-1995. *Diario Oficial de la Federación* 20 agosto 1996.

^l DOF. “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales” Norma Oficial Mexicana NOM-041- ZOO-1995. *Diario Oficial de la Federación* 20 agosto 1996.

^{li} ALTON GG, JONES LM, ANGUS RD. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: Institute National de la recherche e agronomique; 1988

^{lii} . GLOSARIO OIE - https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/glossaire.pdf

f

^{liii} Gestal G, Cortina P, Delgado M. Vacunas de aplicación no sistemática de uso poco frecuente. En: *Vacunaciones preventivas. Principio y aplicaciones*. Barcelona: Masson; 1998: 491-506.

^{liv} Roux J. Vaccination humaine contre les brucelloses. *Bull Acad Natl Med* 1986; 170 (2): 289-92

^{lv} López Merino A, Asselineau J, Serre A, Roux J, Basocul S, Lacave C. Immunization by an insoluble fraction extracted from *Brucella melitensis*: immunological and chemical characterization of the active substances. *Infection and Immunology* 1976; 13: 311-21

^{lvi} Garin-Bastuji B and Benkirane A (eds). FAO/WHO/OIE Round Table on the use of Rev 1 vaccine in small ruminants and cattle; 1995 sept 21-22. Centre National d'études vétérinaires et alimentaires (CNEVA), Maisons-Alfort. CNEVA, Maisons-Alfort, 1996: 61-107.

^{lvii} Elzer PH, Enright FM, Colby L, Hagins SD, Walker JV, Fatemi MB, et al. Protection against infection and abortion induced by virulent challenge exposure after oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Am J Vet Res* 1996; 59(12): 1575-8.

^{lviii} Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N, Bevins JS, Enright FM, et al. Protection of Balb/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am J Vet Res* 1996; 57: 677-83.

^{lix} Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden RA, et al. A DNA vaccine encoding the lumazine-synthase gene from *Brucella abortus* induces protective immunity in Balbc/mice. *Infect Immun* 2002; 70(5): 2507-11.

^{lx} Vacunas utilizadas en la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales <https://www.gob.mx/pronabive/articulos/vacunas-utilizadas-en-la-campana-nacional-contra-la-brucelosis-en-los-animales?idiom=es>