

ESTUDIO SOBRE LA ERRADICACION DE LA  
BRUCELOSIS (*Brucella melioides*) CAPRINA POR  
METODOS NUTRICIONALES. I. TRABAJO  
PRELIMINAR

PATRICIO PONCE BARAJAS

T E S I S

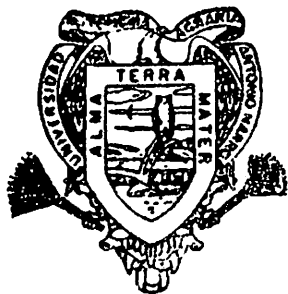
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EN NUTRICION ANIMAL.

Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"



DEPARTAMENTO DE  
NUTRICION Y ALIMENTOS



Universidad Autónoma Agraria  
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista. Saltillo. Coah.

NOVIEMBRE DE 1998

714942

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

**ESTUDIO SOBRE LA ERRADICACION DE LA  
BRUCELOSIS (*Brucella melitensis*) CAPRINA POR  
METODOS NUTRICIONALES. I. TRABAJO PRELIMINAR.**

TESIS

POR

PATRICIO PONCE BARAJAS

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de  
Asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado  
de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EN NUTRICION ANIMAL

Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"

COMITE PARTICULAR

Asesor Principal:

  
Dr. David Rodríguez Maltos

Asesor:

  
Dr. Javier García Cantú

Asesor:

  
M.C. Regino Morones Reza

  
Dr. Ramiro López Trujillo  
Subdirector de Postgrado



BIBLIOTECA

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Noviembre de 1998

## **DEDICATORIA**

A Dios, por todo lo que soy.

A Cecilia Hernández Martínez.

" Lo que me rodea es demasiado grande como para escribir una sola frase "

*Jaime Shapiro.*

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme la gracia de encontrarme en el tiempo y coincidir en el espacio con los seres vivos y las cosas para compartir mi vida y este trabajo.

A mis padres, Dr. José Luis Ponce Piña y Juanita Barajas Lozano, y a todos sus hijos, por que han hecho de cada esfuerzo una constante entrega, para conducir sus vidas y a sus descendientes por el camino de Dios.

A Cecilia de la Luz Hernández Martínez, que me comparte su tiempo y su vida, para lograr el fin último, estar vivos, felices y juntos.

A la familia Hernández Martínez, Don Francisco, María de la Luz, Susana, Angeles y Francisco, por permitirme participar de sus vidas y de sus cosas.

A cada uno de mis asesores, por su participación y contribución en mi preparación al desarrollo, por su confianza y amistad M.C. Regino Morones reza, Ph.D. Javier García Cantú y muy especialmente al Ph.D. David Rodríguez Maltos.

A todas y cada una de las personas que participaron en la realización de este trabajo, por toda su amistad y colaboración, una mención muy especial a: QFB. Julieta Pichardo, J. Antonio Martínez Pérez, María Cristina Sánchez Flores, María de Jesús Sánchez Velázquez, Juan Carlos Flores Hernández, Silvia Ovalle Nava, MC. Rosalinda Mendoza Villareal y Sra. Luz María Monreal Bazaldúa.

A cada uno de mis amigos, que con sus observaciones ayudan a mi perfeccionamiento.

A mi alma terra mater y a cada uno de los catedráticos que han puesto en este trabajo y en mi: tierra, semilla, agua, energía, elementos, etc. con los cuales logro participar en la vida de nuestro mundo.

## **COMPENDIO**

# **ESTUDIO SOBRE LA ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS (*Brucella melitensis*) CAPRINA POR METODOS NUTRICIONALES. I. TRABAJO PRELIMINAR.**

por

**Patricio Ponce Barajas**

**Maestría**

**Nutrición Animal**

**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila. Noviembre de 1998**

**Dr. David Rodríguez Maltos**

**- Asesor -**

**Palabras clave: Caprinos, Brucella, Brucelosis, Nutrición, Inmunología.**

Treinta y cinco cabras hembras, criollas, adultas, con diagnóstico positivo a *Brucella melitensis*, sorteadas al azar (siete animales por tratamiento), fueron utilizadas con el objeto de probar cinco tratamientos, con el fin de erradicar y/o controlar la brucelosis.

El presente estudio fue realizado en la unidad metabólica de la UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Una de las enfermedades de mayor importancia en la actualidad en caprinos es la Brucelosis. Durante muchos años, se ha tratado de controlar y en la actualidad se ha logrado, pero a un costo elevado y con poca funcionalidad en la industria pecuaria. En vista de la repercusión económica y social que ocasiona esta enfermedad, se presenta este trabajo; planteándose como una alternativa en la búsqueda de su erradicación y/o control, utilizando la manipulación del metabolismo animal y la nutrición para lograr el objetivo.

La aplicación de los tratamientos, modificaron el metabolismo y reforzaron el sistema inmunológico del animal. Con la utilización de pruebas de aglutinación de inmunoglobulinas séricas, técnicas de hemocultivo, estudio de inoculación de roedores, preñez de las cabras y análisis de placentas, se encontró un diagnóstico favorable. De los resultados encontrados en las pruebas inmunológicas, se observó que el único método definitivo de diagnóstico fue el aislamiento de la bacteria de los animales enfermos (FAO y OMS, 1986; SAGAR, 1995), siendo el resultado final negativo a brucella. Ninguno de los cultivos mostraron desarrollo de cepas de *Brucella melitensis* por lo que se puede concluir que los tratamientos fueron igualmente efectivos ( $p>0.05$ ) en el control o destrucción de la bacteria *Brucella melitensis* en los animales.

## **ABSTRACT**

### **STUDY OF THE GOAT BRUCELLOSIS ERADICATION (*Brucella melitensis*) BY NUTRITIONAL PROCEEDING. I. PRELIMINARY WORK.**

**By**

**Patricio Ponce Barajas.**

**Master of Science**

**Animal Nutrition**

**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila. November 1998**

**Ph.D. David Rodríguez Maltos                      - Adviser -**

**Key words: Goats, Brucella, Brucellosis, Nutrition, Immunology,**

Thirty five female goats, native, adult, with positive diagnosis to *Brucella melitensis*, drawn at random seven to each treatment, were used in order to prove five treatments, split into seven animal groups.

The present study was accomplished in the metabolic unit of the UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico. One of greater importance diseases at present in goats, it is the Brucellosis. During many years, it has been treated to controlling it and at present time it has been achieved, but to a high cost and with low functionality in the cattle industry. From the economic and social repercussion that this disease causes, this work is presented; being as an alternative to search of its eradication and/or control, using the manipulation of the animal metabolism and the nourishment to achieve the objective.

All the applied treatments, modified the metabolism and reinforced the animal immunologic system. Utilizing the seric's immunoglobulins agglutination test, blood culture technic, mice inoculation study, goats pregnancy and placental analysis, was found a favorable diagnosis. Considering the results of the immunologic tests, was observed that the only definitive diagnosis method for brucella was the bacteria isolation from the sick animals (FAO and OMS, 1986; SAGAR, 1995), founded negative to Brucella. None of the cultures showed development of *Brucella* therefore, it can be concluded that all the treatment were equally effective ( $p>0.05$ ) controlling the growth of *Brucella melitensis* in the animals.



## INDICE DE CONTENIDO

	Página
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
Hipótesis Científica.....	3
<b>REVISION DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
Características de la bacteria <i>Brucella melitensis</i> .....	4
Clasificación e identificación de la bacteria.....	4
Morfología y características del género <i>Brucella</i> ..	5
Clasificación taxonómica del género <i>Brucella</i> ...	6
Estructura antigénica de la bacteria.....	6
Inmunología en las cabras.....	7
Características morfológicas y bioquímicas del sistema inmune.....	7
Interacción de los nutrimentos en el sistema inmune.....	10
Interacción de las vitaminas .....	10
Interacción de los minerales .....	11
Respuesta inmune ante la presencia de <i>Brucella melitensis</i>	13
Tratamientos convencionales de la brucelosis.....	14
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>19</b>
Localización y descripción del área geográfica.....	19
Procedimiento realizado en el trabajo experimental.....	19
Manejo de los animales.....	20
Confirmación de la enfermedad en los animales recibidos.....	21
Características de los tratamientos aplicados.....	21
Aplicación de los tratamientos.....	23
Modo de aplicación de los tratamientos.....	24
Diagnóstico post - aplicación de los tratamientos.	25

Recolección, toma de muestras y traslado al laboratorio.....	30
Diseño estadístico experimental.....	31
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
Aplicación de los tratamientos .....	33
Diagnóstico post - aplicación de los tratamientos.....	40
Prueba de aglutinación .....	40
Prueba de aglutinación con el antígeno rosa de bengala o aglutinación en placa...	40
Prueba de aglutinación estándar en microplaca.....	41
Cultivo de bacterias.....	44
Método directo para el aislamiento primario en medio TSA sólido.....	45
Método directo selectivo en medio TSA sólido con antibióticos.....	46
Método de Castañeda en medio TSA bifásico enriquecido.....	47
Prueba biológica o inoculación de roedores de laboratorio.....	47
Preñez de los animales.....	49
Observación de los animales al parto.....	49
Observación de la condición general de los animales	50
Resultados del diseño estadístico experimental.....	52
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>53</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>57</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>59</b>
<b>APENDICE A.....</b>	<b>64</b>
<b>APENDICE B.....</b>	<b>67</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
3.1 .- Tratamientos, número de animales asignados a cada uno de ellos y costo.....	23
4.1 .- Concentración de datos y resultados.....	36

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>3.1</b> .- Protección utilizada para la manipulación de los animales y muestras.....	24
<b>3.2</b> .- Antisepsia antes de la aplicación de los tratamientos y la toma de muestras.....	25
<b>3.3</b> .- Inoculación de ratones de laboratorio.....	28
<b>3.4</b> .- Toma de muestra sanguínea de los ratones.....	28
<b>3.5</b> .- Realización del cultivo en medio de Castañeda.....	29
<b>3.6</b> .- Preparación y manipulación de los cultivos bacterianos.	29
<b>4.1</b> .- Irritación de la porción ventrolateral del cuello de las cabras.....	35
<b>4.2</b> .- Reacción inflamatoria después de aplicación de los tratamientos.....	35
<b>4.3</b> .- Ratones inoculados.....	48
<b>4.4</b> .- Sacrificio de los ratones.....	48
<b>4.5</b> .- Toma de muestra sanguínea de los ratones.....	48
<b>4.6</b> .- Desinfección del tapón de goma.....	48
<b>4.7</b> .- Realización del cultivo en medio de castañeda.....	48

## INTRODUCCION

Una de las enfermedades zoonóticas de mayor importancia en los caprinos y otros animales es la Brucelosis. Esta enfermedad es ocasionada por bacterias del género *Brucella*, que son diseminadas entre los animales rápidamente. La brucelosis es una enfermedad que está distribuida en todo el mundo. En 1983 Estados Unidos consideró una pérdida de 32 millones de dólares por esta enfermedad y en México, al igual que en otros países, produce mermas en la producción de leche y carne, bajando los índices reproductivos, ocasionando una disminución gradual de la población caprina y atropozoonosis. En México está ampliamente diseminada en ganado bovino con una prevalencia superior al 5 por ciento (Flores, 1988). Durante 1992 y 1993 se confirmaron un total de 5 251 casos en bovinos; subestimándose este número en un 30 por ciento; según la Secretaría de Salud en nuestro país se registra un promedio de 6 500 casos en humanos por año. En caprinos el porcentaje de abortos es de 13.1 por ciento, causando pérdidas de hasta \$ 5 967 351 (SAGAR, 1995).

*B. melitensis*, se encuentra más frecuente en cabras; son denominadas bacterias intracelulares facultativas o parásitos intracelulares obligados, tiene la habilidad de reproducirse dentro de las células. Por otro lado, metabólicamente se sabe que los diferentes nutrimentos, las vitaminas y los minerales, tienen una actividad fundamental en el metabolismo celular, que involucran directamente al sistema inmunológico, por lo que pudiera tener grandes efectos sobre la respuesta inmune. Por lo anterior se infiere, que las bacterias (*Brucella spp.*) encuentran o crean un medio adecuado para desarrollarse, sobrevivir y reproducirse dentro de las células inmunitarias debilitadas y sin la capacidad de destruirlas, modifican su metabolismo bioquímico.

La brucelosis en la actualidad tan solo es controlada con tratamientos utilizando antibióticos en humanos infectados, con animales se siguen realizando estudios para lograr la erradicación de la enfermedad. Dada la persistencia de la bacteria en el organismo infectado y su resistencia a los tratamientos, se origina un alto costo de mantenimiento. La eliminación de la brucelosis en los hatos, actualmente solo se puede realizar, mediante un sistema de control, que consta de vacunación, exámenes de diagnóstico y sacrificio de los animales positivos a la infección. Hasta ahora sólo se ha logrado la erradicación a nivel internacional mediante este método, que provoca poco a poco la disminución de la población caprina (FAO y OMS, 1986; SAGAR, 1995).

El presente trabajo se planteó, como una alternativa en la búsqueda del control y/o erradicación de la brucelosis, en la pesquisa de una solución, más efectiva y económica, mediante el uso de complementos nutricionales aplicados en forma endovenosa para fortalecer rápidamente el sistema inmunológico del animal para que extrínsecamente evitar la multiplicación de la bacteria controlándola o eliminándola.

### **Hipótesis Científica**

La aplicación intravenosa de compuestos que tienen la capacidad de modificar el metabolismo celular y después proporcionar al medio los nutrientes, reforzarán el sistema inmunológico celular del animal, fortaleciendo y activando a los linfocitos T, seguido de una movilización y activación de los macrófagos, que en un medio dependiente del oxígeno, aceleran la producción de compuestos bioquímicos los cuales inhiben o destruyen la bacteria. Por esto, la aplicación de los tratamientos intravenosos (Daroma y Promomvit I y II) que modifican el medio celular, proporcionan al animal, la capacidad de destruir la bacteria o neutralizar su acción patógena, regulando el metabolismo del neutrófilo y del macrófago, proporcionando así los elementos necesarios para lograr el fortalecimiento del sistema inmune.

# REVISION DE LITERATURA

## Características de la Bacteria *Brucella melitensis*

### Clasificación e Identificación de la Bacteria

El género *Brucella* está constituido por seis especies, cuatro de ellas se aislan en forma lisa o S (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, y *B. neotomae*) y dos en forma rugosa o R y mucoides o M (*B. ovis* y *B. canis*). Esta clasificación se les da, por las características de las colonias al realizar su aislamiento. Sin embargo, existen controversias con respecto a la taxonomía del género *Brucella*. También se encuentran formas intermedias entre S y R (formas SI e I), llamándole a este fenómeno, estado de disociación o variación de un cultivo, el cual es de gran importancia definir, pues por lo general las características serológicas, la sensibilidad a los fagos y la virulencia, se alteran drásticamente en las fases M y R (FAO y OMS, 1986; Freeman, 1985).



La identificación de las bacterias se efectúa mediante exámenes de características morfológicas del cultivo y de la bacteria, lisis por fagos, reacciones metabólicas de la célula y la respuesta serológica a anticuerpos monoespecíficos; se utiliza el examen de la composición básica y secuencia del DNA, los patrones de separación electroforética producidos por proteínas solubles en agua y ácido fenolacético, el espectro de absorción de las bandas de citocromo a y c y la comprobación de la presencia de antígenos intracelulares similares a los de las cepas de *Brucella* de referencia, que son patrones establecidos internacionalmente según el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en brucelosis (1986). Entre estas y muchas técnicas de identificación genética, en México, se utiliza la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) como método diagnóstico (Corbel, 1997). Otras pruebas clásicas con valor complementario para la identificación son la determinación de la necesidad de CO<sub>2</sub>, la sensibilidad a colorantes, la producción de H<sub>2</sub>S y la actividad de la ureasa. Con estas pruebas bioquímicas, también se pueden diferenciar los biotipos brucelares. El perfil de oxidación metabólica es otro apoyo para la identificación (FAO y OMS, 1986).

### **Morfología y Características del Género *Brucella***

La *Brucella*, es una bacteria con forma de pequeños cocobacilos, que miden 0.5 a 0.7 micras. Son inmóviles y no esporulan. Son gram negativos,

negativos a la catalasa y positivos a la oxidasa en pruebas bioquímicas de su metabolismo. Su temperatura óptima de crecimiento es a 37 ° C y en pH de 6.8; son aerobios estrictos, aunque algunas especies y/o biotipos necesitan una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> (5 a 10 por ciento) y suero en el medio de cultivo (Carter y Chengappa, 1994; Freeman, 1985; Galliespie y Timoney, 1983 y Suárez , 1995).

### **Clasificación Taxonómica del Género *Brucella***

En la actualidad, el sistema taxonómico para el género *Brucella*, se basa en las recomendaciones efectuadas en 1973, por el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* de la Comisión Internacional de Nomenclatura Bacteriológica. Se estableció ese sistema, para eliminar problemas en la identificación de algunas especies originales (*B. melitensis*, *B. abortus*, y *B. suis*); por lo cual, se emplean las pruebas de lisis por fagos y la oxidación metabólica para diferenciar dichas especies (Carter y Chengappa, 1994; Freeman, 1985; Galliespie y Timoney, 1983 y Suárez , 1995).

### **Estructura Antigénica de la Bacteria**

La estructura antigénica de la *Brucella*, se sabe que está constituida por dos antígenos principales en las cepas lisas (antígenos A y M); siendo residuos formados de poli-hidroxi-amino, presente en el LPS de *B. abortus* y *B. melitensis*

con proporciones de 20:1 y 1:20 respectivamente. Las cepas rugosas de *Brucella* (*B. canis* y *B. ovis*), tienen características antigénicas similares entre si, pero diferentes a las lisas (Suárez , 1995). Como la bacteria es un cocobacilo gram negativo, se caracteriza por tener una corteza periplásmica interna, un espacio periplásmico, una capa de péptidoglicano y una membrana externa, de la cual se prolonga hacia el exterior las moléculas de LPS, compuesto de una cadena de polisacáridos denominada antígeno "O", un oligosacárido central y un lípido denominado "A". Este LPS es el componente primordial antigénico de la bacteria (antígeno inmunodominante de superficie). Sin embargo, a las proteínas de la membrana externa (purinas, proteínas del grupo tres y lipoproteínas ligadas a un péptidoglicano) se les ha denominado polisacárido "B" (poli B) (SAGAR, 1995).

## **Inmunología en las Cabras**

### **Características Morfológicas y Bioquímicas del Sistema Inmune**

Todo organismo vivo ha desarrollado estrategias y estructuras para defenderse en el medio que le rodea, denominadas "sistema inmune". Según Alberts *et al.* (1989) los organismos más complejos, como los vertebrados, tienen un sistema inmune más desarrollado. Para Tizard (1989) el sistema inmune es un grupo de estructuras y reacciones que tiene como finalidad proporcionar al organismo animal, la capacidad de defenderse de sustancias extrañas o de

microorganismos potencialmente patógenos que producen estas sustancias. Es tan sensible, que es capaz de distinguir entre dos proteínas que difieren en un simple aminoácido o entre dos isómeros ópticos de alguna molécula (Alberts *et al.*, 1989).

Este sistema de defensa se encuentra relacionado a todas las estructuras del cuerpo animal, pero para su organización se involucran ciertos órganos especializados como son el sistema linfático compuesto de ganglios linfáticos, vasos linfáticos, linfa, linfocitos B (exclusivamente formadores de anticuerpos) y linfocitos T (intervienen en la respuesta inmune mediada por células); bazo, timo, bolsa de Fabricio (en aves), placas de Peyer (en intestino delgado), eosinófilos, basófilos, macrófagos, células dendríticas o de Langerhans (en la piel) y otras estructuras más (Alberts *et al.*, 1989; Frandson, 1986; Tizard, 1989).

Alberts *et al.* (1989) y Tizard (1989) clasifican dos tipos de sistemas inmunitarios, uno es el sistema mieloide, formado por neutrófilos, eosinófilos y basófilos, encargados de la respuesta primaria, su actividad no es sostenida y actúan rápidamente. El segundo sistema es el de los macrófagos o también denominado de fagocitos mononucleares, con la posterior activación de la formación de anticuerpos, proteínas llamadas inmunoglobulinas, encargadas de atrapar e inactivar las toxinas de bacterias o virus u proteínas extrañas al organismo, que con ayuda de un sistema enzimático denominado sistema de complemento, facilitan su fagocitosis o los destruyen.

Desde hace mucho tiempo, se ha reconocido que los mamíferos producen glicoproteínas específicas o globulinas, denominadas anticuerpos contra sustancias extrañas, producidas por los linfocitos B. La respuesta inmune total consiste en tres fases: La primera denominada aferente, la célula inmunocompetente encadena al antígeno. La segunda fase o central, en donde la célula estimulada es diferenciada y proliferada. Y la tercera fase o eferente o fase efector, la célula T inmune y los anticuerpos generados por las células B, reaccionan con el residuo del antígeno o con el antígeno reintroducido, para la destrucción del antígeno identificado y con el, en este caso, la bacteria que lo forma. Los macrófagos tienen un papel central en la inmunidad mediada por células inducida por bacterias (Shils *et al.*, 1994; Tizard, 1989).

La molécula de un anticuerpo consiste de cuatro cadenas de polipéptidos, dos idénticas ligeras (L) que contienen 220 aminoácidos y dos idénticas pesadas (H) con 440 aminoácidos. Están unidas entre si por dos enlaces bisulfito. Cada cadena H contiene una o más cadenas de oligosacáridos con función desconocida (Alberts *et al.*, 1989).

Las bacterias intracelulares facultativas, como la *Brucella spp.*, característicamente tienen resistencia a la destrucción dentro de la célula por los macrófagos y por los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), por esta razón, el sistema de inmunidad mediado por células (CMI), desarrolla fagocitos

especiales con poder destructor superior, involucrando células T de ayuda, que sintetizan linfocinas que atraen y activan a los macrófagos con mayor actividad de la normal (Shils *et al.*, 1994).

### **Interacción de los Nutrimientos en el Sistema Inmune**

Todos los sistemas de un organismo tienen necesidades de nutrientes específicos para su funcionamiento, mantenimiento y activación. Si proporcionamos menor o mayor cantidad de estos elementos ocasionamos un desbalance y por consecuencia un disturbio en su metabolismo. Como en los demás sistemas, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos tienen gran participación en el mantenimiento y producción de los sistemas inmunitarios, pero los principales problemas son ocasionados por los nutrientes que intervienen en menores cantidades como son las vitaminas y los minerales.

### **Interacción de las Vitaminas**

Las vitaminas del complejo B tienen fundamental importancia en el metabolismo celular, afectan directamente al sistema inmune. Se ha observado linfopenia y atrofia del tejido linfoide periférico en deficiencias de estas vitaminas. La deficiencia de piridoxina, ácido pantoténico, riboflavina, ácido fólico y cobalamina tiene grandes efectos sobre el sistema inmunitario. La deficiencia de

piridoxina (Vitamina B<sub>6</sub>) interrumpe la transformación de aminoácidos como la de metionina a cisteína, así como deaminación y descarboxilación, procesos fundamentales en la formación de proteínas para la respuesta inmunitaria por atrofia del tejido linfoide y por lo tanto, depresión de la respuesta inmune, reducción de la actividad de los linfocitos y otras funciones. La deficiencia de ácido pantoténico, afecta la respuesta primaria de anticuerpos. Una deficiencia de riboflavina provoca una disminución de linfocitos periféricos, disminución de la aglutininas y decremento del timo. Una deficiencia de ácido fólico inhibe la síntesis de timidilato, lo que ocasiona cambios megaloblásticos de la replicación celular, disminuyendo la respuesta de las células T con disminución de la fagocitosis por los neutrófilos. La cobalamina es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos. También la deficiencia de las vitaminas C, A y E, ha mostrado afección y disminución del sistema inmunológico (Shils *et al.*, 1994).

### **Interacción de los Minerales**

Las deficiencia de metales como el zinc, hierro, manganeso, cobre, magnesio, selenio han mostrado deterioro en la eficacia del sistema inmune en diferentes especies animales. Igualmente se ha observado deterioro con la intoxicación por minerales no necesarios.

Una deficiencia de zinc tiene efectos en el tejido linfoide y en la inmunidad tanto humoral como celular, pues el zinc participa activamente como cofactor en

enzimas relacionadas con el sistema inmune (Shils *et al.*, 1994). El zinc está contenido en un octapéptido denominado timulina, una hormona secretada por las células epiteliales del timo, siendo este mineral, esencial para el desarrollo del timo y por lo tanto de los linfocitos T, esenciales contra las bacterias intracelulares (Tizard, 1989).

La deficiencia de hierro ocasiona defectos en la actividad destructora de las células macrófagas y neutrófilas. Los linfocitos requieren de hierro para una función normal del citocromo y la enzima ribonucleósido reductasa para la formación de ADN, su deficiencia causa depresión en la función de las células B y T. El manganeso estimula al macrófago y la reacción antígeno anticuerpo, su deficiencia acarrea decremento de aglutininas IgG y de la fracción 19 S de las inmunoglobulinas. Una deficiencia de cobre disminuye la respuestas de las células T de soporte y acarrea una malformación e inmadurez de los eritrocitos y neutrófilos y mal desarrollo de linfocitos. Una deficiencia de magnesio se ve reflejada en disminución de hemaglutininas y hemolisinas en el suero sanguíneo en un 45 por ciento. El selenio actúa por su actividad en la metaloenzima glutatión peroxidasa, junto con la vitamina E, en los macrófagos y neutrófilos, esta enzima catalisa la reducción de hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos con el glutatión (Shils *et al.*, 1994).

De cualquier forma una infección siempre tiene efectos sobre la condición corporal de los animales, pues tomando en cuenta que el primer síntoma de ésta,



es la anorexia, la fiebre provoca que el animal deje de comer y probablemente puede ocurrir la diarrea, presentándose la desnutrición o desbalance nutricional ante la presencia de microorganismos patógenos.

### **Respuesta Inmune Ante la Presencia de *Brucella melitensis***

La presencia de la *Brucella* induce a una respuesta inmune caracterizada por la respuesta mediada por células, provocando la producción variada y abundante de anticuerpos. Se ha otorgado importancia relevante a esta respuesta mediada por células especializadas inmunocompetentes. La bacteria es atacada por los linfocitos polimorfonucleares (PMN) y por los fagocitos mononucleares (FMN), ésta es fagocitada, pero por sus características no es destruida, al contrario, ésta logra reproducirse y con esto destruir la célula, si es que no existen anticuerpos específicos. Durante la fase extracelular de la bacteria, los anticuerpos actúan contra los antígenos de superficie Brucelares, siendo eficaces logrando estimular a los linfocitos para producir mediadores que fortalecen a los macrófagos (sistema del complemento). Después del primer contacto con la bacteria, se comienza a producir la IgM, IgG y IgA (respuesta humoral), siendo poco eficaces (SAGAR, 1995).

## Tratamientos Convencionales de la Brucelosis

La *brucelosis* en la actualidad, solo es controlada con tratamientos de quimioterapia en humanos infectados. Pero se siguen realizando estudios con el fin de encontrar la terapéutica más adecuada de la enfermedad en el animal. Galliespie y Timoney (1983), recomiendan el uso de estreptomicina combinada con aureomicina, terramicina o sulfadiacina con una respuesta positiva observada en el 99 por ciento de animales de laboratorio tratados. Freeman (1985), comenta que las tetraciclinas pueden ser recomendadas, con una duración mínima de 21 días, pudiéndose repetir y combinarse con estreptomicina, con el problema, de que los tratamientos prolongados con antibióticos pueden producir shock endotóxico.

Nicoletti *et al.* (1985) encontraron que la aplicación intramuscular (IM) a vacas de oxitetraciclina de actividad larga (20 mg/kg de peso corporal) y únicamente el 21 por ciento (tres de 14 animales) fue exitoso. En este mismo trabajo, al aplicarse combinada con estreptomicina (25 mg/kg PC IM o intravenosa (IV)) el 67 por ciento de los casos fueron considerados exitosos; concluyendo, que estas drogas aparentemente tienen sinergia entre sí; Marin *et al.* (1989) al probar como tratamiento contra *Brucella ovis* en carneros, oxitetraciclina de actividad larga sola, encontraron que en solo el 33.3 por ciento (cuatro de 12 carneros) fue eliminada la bacteria; y al combinarse con sulfato de

dihidrostreptomina, el tratamiento fue exitoso en 91.6 por ciento (11 de 12 carneros tratados).

Nicoletti *et al.* (1989) al utilizar en vacas infectadas naturalmente con *B. abortus*, estreptomina liposomal sola, encontraron que 1.4 por ciento tuvieron cultivo negativo; el mismo porcentaje tuvo 10 o más colonias de bacterias aisladas de la necropsia y 62 por ciento, continuaron eliminando bacterias en la secreción láctea, considerándose fallido el tratamiento. Estos mismos al usar la combinación de estreptomina liposomal con oxitetraciclina de prolongada actividad, encontraron que el 56 por ciento de los animales fueron curados; el 33.3 por ciento, tuvieron 10 o más colonias en placas cultivadas de tejido después de la necropsia y solo el 11.1 por ciento presentó *B. abortus* en secreciones de la ubre después del tratamiento. En el mismo trabajo, al aplicar estreptomina liposomal por infusión intramamaria con o sin administración IM de oxitetraciclina de duración prolongada, observaron, que el tratamiento más efectivo, fueron dos infusiones intramamarias de estreptomina liposomal más dos dosis IM de oxitetraciclina.

Radwan *et al.* (1993) en vacas infectadas con *B. melitensis* y con *B. abortus* de manera natural, al probar oxitetraciclina de acción prolongada (25 mg /kg IM) cada tres días por 42 días con estreptomina (25 mg/kg MI) diariamente por ocho días y oxitetraciclina intramamaria (20 ml por pezón diario) por cuatro días, obtuvieron buenos resultados en la eliminación de la enfermedad.

En humanos, la quimioterapia más efectiva y menos tóxica para controlar la Brucelosis, aun no está bien establecida, pues los químicos *in vivo* no funcionan igual que *in vitro*, por la característica intracelular de la bacteria. La terapia estándar universal es la combinación de tetraciclinas con estreptomicina, con fallas mínimas y recaídas de un 10 por ciento de los tratamientos (Hall, 1990). Una combinación oral de doxiciclina y rifampicina es altamente efectiva con una tasa de recaída del 8.4 por ciento. El tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la Brucellosis aguda en los adultos, es de 600 a 900 mg de rifampisina y 200 mg de doxiciclina diariamente por un mínimo de seis semanas. La utilización de estreptomicina intramuscular combinada con tetraciclina oral, presentan pocas recaídas y las quinolonas con rifampicina tienen resultados similares a los antibióticos anteriormente mencionados (Corbel, 1997).

La literatura, muestra que las terapéuticas con químicos aislados presentan generalmente resultados poco satisfactorios, lo cual es apoyado por Galliespie y Timoney (1983). Esto pudiera ser, debido a la naturaleza intracelular de la bacteria, pues en esta condición, generalmente las bacterias no se destruyen con facilidad a base de antibióticos aislados o que no penetren la pared celular (Freeman, 1985). Se ha observado que las cepas de *Brucella spp.* quimioresistentes, son raramente causadas por fallas en la quimioterapia (Hall, 1990).

Con el fin de observar el comportamiento de la bacteria (*Brucella spp.*) Boura *et al.* (1984) aplicaron levamisol como coadyuvante del tratamiento de la enfermedad, elevando la función de las células T y de la fagocitosis monocítica estimulando la inmunidad celular.

En las explotaciones pecuarias, este tipo de tratamientos, es imposible utilizarlos, por su costo tan elevado. La única forma de reducir la tasa de infección Brucélica, en las zonas de prevalencia elevada, es la inmunización en masa, con vacunas atenuadas, que deben conservarse en una estricta condición frigorífica (SAGAR, 1995). Las vacunas inactivadas o con bacterias muertas son más estables, siendo su potencia menor y requieren de inoculaciones más frecuentes (por lo menos cada año) (Tizard, 1989).

La vacuna de *B. abortus* cepa 19, ha sido una herramienta muy valiosa contra esta enfermedad en los animales desde 1941 con su introducción al campo, teniendo esta vacuna el inconveniente de contener bacterias vivas atenuadas, causando ocasionalmente artritis, abortos, infecciones latentes en los animales y los humanos; así como la respuesta inmune provoca falsos positivos que pueden confundirse con los animales enfermos positivos. Estas características también se observan en la aplicación de dosis reducidas de esta vacuna. Hay que considerar también que el uso de dosis ultra reducidas, generalmente no proporcionan respuesta satisfactoria. En los Estados Unidos de

Norteamérica (marzo de 1996) se aprobó el uso de una vacuna que protege a los animales sin provocar reacciones falsas positivas, no transfiere la enfermedad y tiene otras características positivas (cepa vacunal RB51) (Corbel, 1997; Hoard's, 1997 y Olsen *et al.*, 1997), existiendo también mutantes *rfb*, similares a la cepa RB51 que ayudan en la prevención de brucelosis caprina, ovina y porcina (Corbel, 1997).

Hasta ahora sólo se ha logrado la erradicación de la brucelosis a nivel nacional, mediante la identificación de rebaños infectados y el sacrificio de todos los animales positivos que los integran, y en algunos Estados de la República, la decisión es más drástica, pues la ley indica el sacrificio de todo el rebaño (FAO y OMS, 1986; SAGAR, 1995).

De lo anterior se deduce, que este procedimiento, sólo es factible cuando la infección es de introducción reciente en una región antes exenta de la enfermedad o cuando la prevalencia es baja. Sin embargo, en zonas donde la incidencia es grande, la eliminación de los animales reactantes es costosa, no solo para el productor, sino también para la región y el país, ocasionándose un problema socioeconómico nacional.

# **MATERIALES Y METODOS**

## **Localización y Descripción del Area Geográfica**

El trabajo fue planteado y realizado en el Laboratorio y Unidad Metabólica del Departamento de Nutrición y Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México (CNEMSG, 1988a y Valdés, 1985).

## **Procedimiento Realizado en el Trabajo Experimental**

El trabajo se realizó utilizando 35 caprinos hembras, criollos, adultos, en estado de producción láctea media; con diagnóstico positivo a *Brucella spp.*, confirmado con la prueba de aglutinación en placa, realizada previamente al traslado según lo estipula SAGAR (1995). Los animales fueron trasladados del municipio de Cerralvo, en el estado de Nuevo León (CNEMSG, 1988b), los que eran alimentados en apacentamiento, encontrándose en condición corporal regular.

## Manejo de los Animales

La primera etapa del trabajo se realizó en la Unida Metabólica. Los animales se colocaron en corrales limpios y secos de 2 x 4 m, con sombra, malla ciclónica de 1.30 m de altura, piso mitad tierra y mitad concreto; comedero y bebedero limpios. Su comportamiento fue observado aproximadamente por 16 h continuas, siendo asignadas por pareja de acuerdo al comportamiento dominante. Se les proporcionó agua potable a libre acceso y heno de alfalfa en cantidad restringida durante los primeros seis días, como etapa de adaptación. Después se aumentó la cantidad de heno de alfalfa hasta llegar aproximadamente de 2 a 2.5 kg/d por animal (5 por ciento de su peso vivo) hasta llegar a 40 kg de peso vivo en promedio. Los animales fueron identificados con collar y repartidos al azar en cinco lotes de siete animales por tratamiento.

Como los animales se encontraban en lactancia, se les aplicó una solución de Iodopavidona 8 g vía tópica, directamente en la ubre, por 10 días consecutivos después de la ordeña, con el objeto de prevenir cualquier proceso infeccioso. Igualmente, se les aplicó 2 ml de solución de L-levamisol vitaminado IM<sup>1</sup> y un baño por aspersion con solución de Coumafos<sup>2</sup> con el propósito de desparasitarlos.

---

<sup>1</sup> Clorhidrato de L-levamisol, 240 mg; vitamina A, 200, 000 UI; vitamina D, 30, 000 UI y vitamina E, 20 UI

<sup>2</sup> 200 g / lt, a razón de 10 ml por cada 10 litros de agua



## **Confirmación de la Enfermedad en los Animales Recibidos**

Los animales fueron sometidos al diagnóstico con el antígeno brucelar como lo dictamina la campaña contra la brucelosis en México (FAO y OMS, 1986; Hernández, 1996; Mancera, 1995; SAGAR, 1995), también se realizó la prueba de aglutinación estándar en microplaca según la técnica de Hernández (1996), para comprobar la infección con *Brucella spp*, aun cuando los animales se consideraron positivos con anterioridad.

## **Características de los Tratamientos Aplicados**

Los tratamientos se diseñaron utilizando minerales y vitaminas con el propósito de cumplir con las necesidades metabólicas para rehabilitar y reactivar el sistema inmunológico celular tomando en cuenta su estado metabólico celular modificado, además incluyendo elementos que ayudan a regular la síntesis de enzimas y las condiciones metabólicas del sistema inmunológico del animal enfermo (Haenlein, 1991; Rodríguez *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 1991 y Vargas y Huerta, 1996).

Según Fix (1998) el género *Brucellae*, tiene un estilo de vida intracelular muy particular, de lo que se deduce que la defensa humoral tiene una actividad de menor importancia que la celular, por esto, el enfoque de los tratamientos es modificar la defensa mediada por células, tal como los linfocitos tipo T y la actividad de los macrófagos. Aunque parezca que la defensa contra las *Brucellas* es igualmente de las dos formas, y la respuesta mediada por anticuerpos es efectiva, de cualquier forma el principal sistema de defensa natural contra las *Brucellas* es la defensa mediada por células (Alton y Forsyth, 1998).

Por convencionalismo los tratamientos fueron denominados Daroma, Promomvit I y Promomvit II; como los productos se encuentran en proceso de investigación inicial, las fórmulas de los tratamientos no es posible presentarlas, tan solo contemplaremos su característica funcional y las cantidades de inclusión, así como su costo.

Daroma tiene un costo de \$ 0.40 el cc; Promomvit I y Promomvit II de \$40 por cc, el valor total por tratamiento se muestra en el cuadro 3.1.

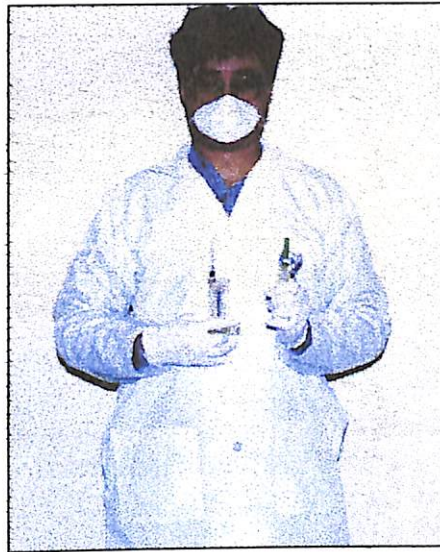
Los tratamientos formulados se resumen en el cuadro 3.1. Cada tratamiento se aplicó por vía intravenosa (IV) cada 12 horas por seis días.

Cuadro 3.1 .- Tratamientos, número de animales asignados a cada uno de ellos y costo.

Tratamientos	Número de animales (Unidades experimentales) por tratamientos.	Costo en pesos de tratamiento completo (por 5 dosis)
T <sub>1</sub> : 21 cc de Daroma	7	100.80
T <sub>2</sub> : 26 cc de Daroma	7	124.80
T <sub>3</sub> : 32 cc de Daroma	7	153.60
T <sub>4</sub> : 2 cc de Promomvit I	7	960.00
T <sub>5</sub> : 2 cc de Promomvit II	7	960.00

### Aplicación de los Tratamientos

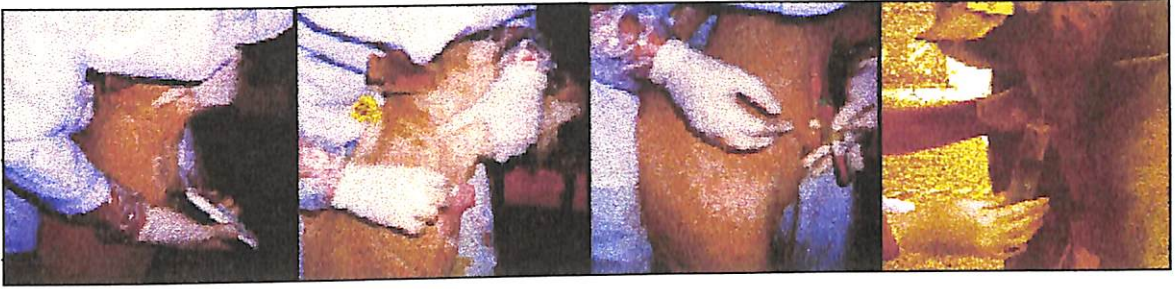
Toda manipulación efectuada en los animales, tanto la toma de muestras, como la aplicación de los tratamientos y otros movimientos, se realizaron con estricto cuidado, usando guantes largos de poliuretano y de látex, cubreboca, ropa de trabajo (cubre todo), zapatos de trabajo, bata y lentes como se observa en la figura 3.1.



**Figura 3.1** .- Protección utilizada para la manipulación de los animales y muestras.

### Modo de Aplicación de los Tratamientos

Se preparó a los animales, rasurando el área de la canaladura yugular (porción ventrolaterocervical) y lavando enérgicamente toda el área con jabón blanco de barra, se practicó la antisepsia con torundas de algodón bañadas en Cloruro de Benzalconio con Nitrito de Sodio concentrado (Figura 3.2). Procedimiento realizado antes de cada muestreo para diagnóstico y cada aplicación de tratamientos.



**Figura 3.2** .- Antisepsia antes de la aplicación de los tratamientos, toma de muestras y aplicación de los tratamientos.

Los productos se aplicaron con jeringas estériles desechables de plástico de 50 cc en el caso de Daroma y en el caso de Promovit I y II de 3 cc, utilizando agujas estériles de 20 x 25 mm. Sustituyéndolas para cada tratamiento y para cada animal inyectado.

### Diagnóstico Post-Aplicación de los Tratamientos

Al final del período de aplicación de los tratamientos, las cabras se transportaron al Cañón de San Lorenzo, a 4 km de la UAAAN lugar destinado para la observación y diagnóstico. En este lugar las cabras se alimentaron en un sistema de pastoreo con suplementación mineral a libre acceso y permanecieron en este lugar durante cinco meses. Para reforzar el diagnóstico, se sincronizaron estralmente a los 30 días del tratamiento y se preñaron con un semental con diagnóstico negativo a la enfermedad. El

semental, al final del trabajo, se sometió a las pruebas correspondientes de diagnóstico. Las hembras se observaron durante el período de gestación y al momento del parto. En esta etapa, se analizaron las crías y se tomaron muestras de placentas con el fin de realizar el cultivo para determinar la existencia de la bacteria.

Como el único método de diagnóstico definitivo es el aislamiento de la bacteria de un animal enfermo, el diagnóstico fue dividido en tres diferentes etapas según lo analizado por FAO y OMS (1986), Hernández (1996) y SAGAR (1995).

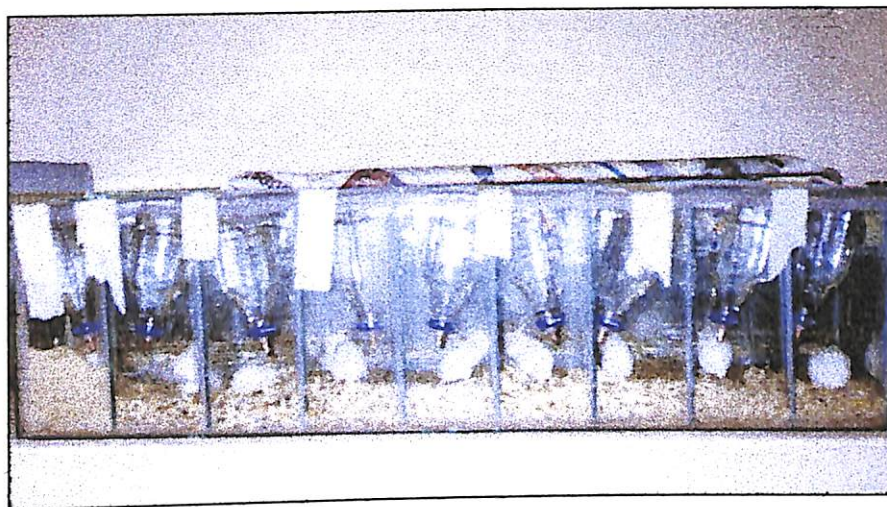
Durante la estancia de los animales en el Cañón de San Lorenzo, se tomaron cuatro muestreos de sangre de los animales en lapsos de 15 días entre cada uno, para someterlos a la prueba de tarjeta y la prueba de aglutinación estándar en microplaca, como auxiliar (Hernández, 1996 y SAGAR, 1995).

Con el fin de complementar el diagnóstico, se realizaron dos cultivos bacteriológicos en agar TSA directamente de dos muestras diferentes tomadas de cada animal; uno de los cuales fue enriquecido con antibióticos según la técnica mostrada por el comité de Expertos en brucelosis FAO y OMS (1986), procediéndose a la identificación de las colonias obtenidas por los métodos de

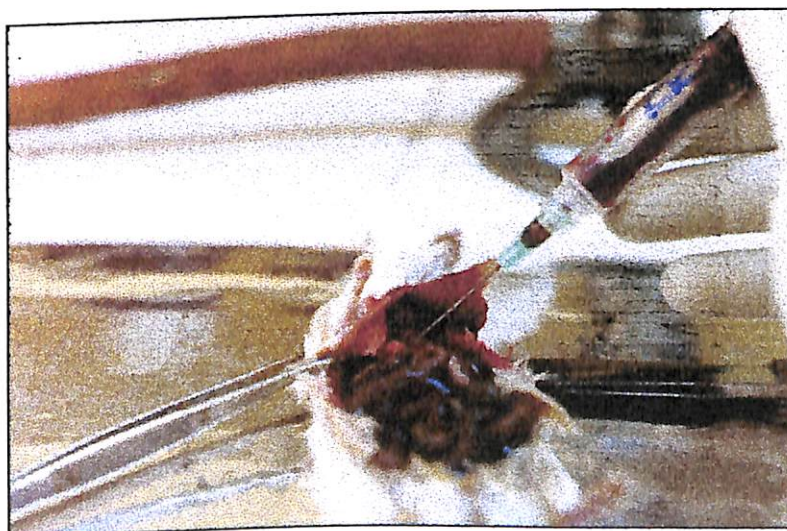
prueba bioquímica y el método BIOLOG en el Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Departamento de Parasitología de la misma Universidad.

Posteriormente, se tomó una tercera muestra para realizar un hemocultivo basado en la técnica de Castañeda según Hernández (1996).

Una cuarta muestra sanguínea fue tomada, con el fin de realizar una prueba biológica, inoculando roedores de laboratorio, a los cuales se les practicó la prueba de aglutinación en placa y un hemocultivo en medio de Castañeda modificado (FAO y OMS, 1986; Hernández, 1996; SAGAR, 1995 y Suárez, 1995). Para esto, se preparó un grupo de ratones albinos, libres de Brucella y otras enfermedades, se inocularon aplicando 1 ml de sangre de cabra por vía subcutánea (SC) en la parte abdominal; se observaron por 50 días y se sacrificaron (Kolmer *et al.*, 1955; Suárez, 1995) (Figuras 3.3 y 3.4) y modificando las técnicas mencionadas por estos autores, a los 50 días, frente al mechero, se adormeció cada roedor con una torunda bañada en cloroformo, desinfectándolo se diseccionó y se tomó una muestra de aproximadamente 2 cc de sangre del corazón con una jeringa estéril, inmediatamente se inoculó el medio bifásico de Castañeda (con la técnica anteriormente mencionada) introduciendo 1 cc y el resto de muestra se dejó coagular para realizar la prueba de aglutinación en placa antes mencionada (Figura 3.5).

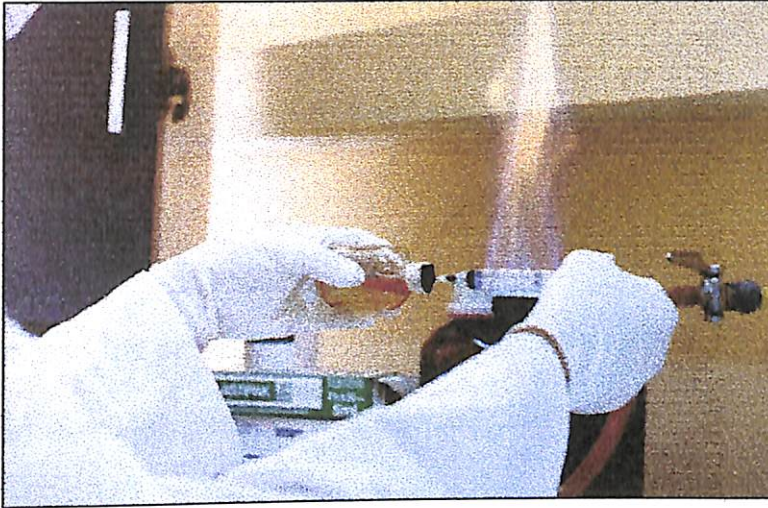


**Figura 3.3** .- Ratones de laboratorio Inoculados con sangre de las cabras tratadas



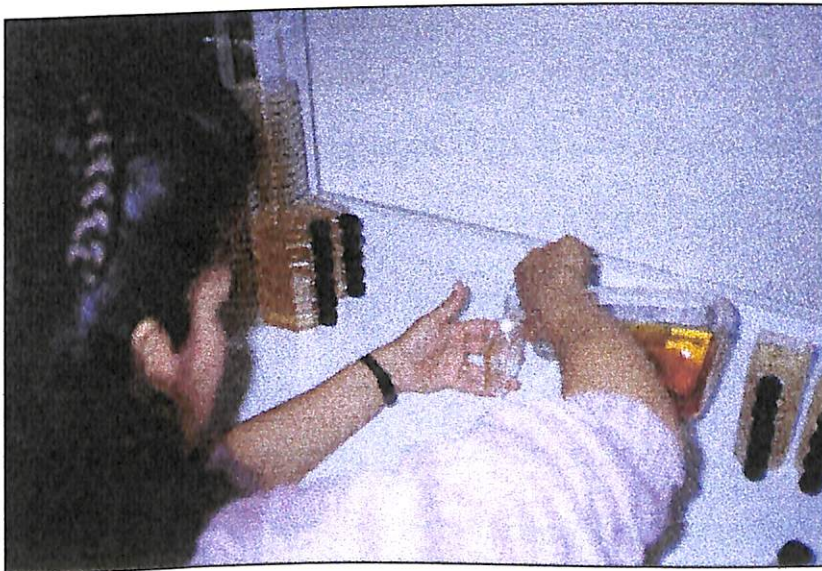
**Figura 3.4** .- Toma de muestra sanguínea de los ratones inoculados.



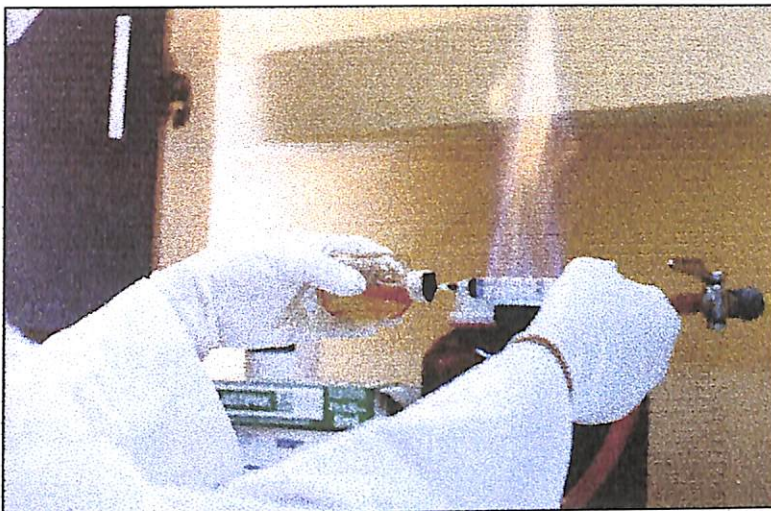


**Figura 3.5** .- Realización del cultivo en medio de Castañeda.

Toda labor que involucró manipulación del material que podría contener microorganismos patógenos, se efectuó dentro de una cámara de seguridad, hecha y adaptada de acuerdo a las indicaciones de los expertos en brucelosis de la FAO y OMS (1986) que garantiza aislamiento físico (Figura 3.6).

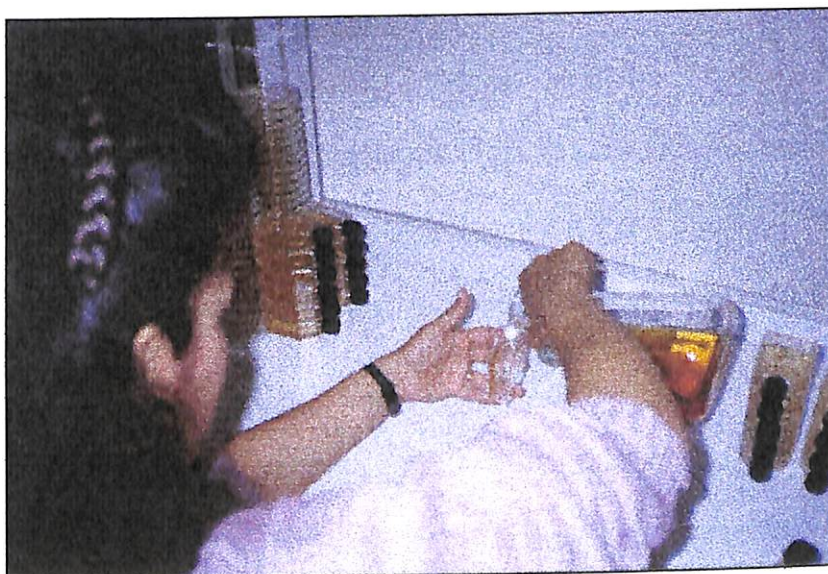


**Figura 3.6** .- Preparación y manipulación de los cultivos bacteriológicos.



**Figura 3.5** .- Realización del cultivo en medio de Castañeda.

Toda labor que involucró manipulación del material que podría contener microorganismos patógenos, se efectuó dentro de una cámara de seguridad, hecha y adaptada de acuerdo a las indicaciones de los expertos en brucelosis de la FAO y OMS (1986) que garantiza aislamiento físico (Figura 3.6).



**Figura 3.6** .- Preparación y manipulación de los cultivos bacteriológicos.

## **Recolección, Toma de Muestras y Traslado al Laboratorio**

Se realizaron los procedimientos recomendados por FAO y OMS (1986), Mancera (1995), SAGAR (1995) y Hernández (1996):

Previamente a la punción venosa y a la toma de cada una de las muestras en las cabras, se practicó la técnica de antisepsia anteriormente mencionada (SAGAR, 1995). Se extrajeron aproximadamente 3 cc de sangre por animal de la vena yugular externa con tubos al vacío. Empleándose material estéril, se manejó la muestra asépticamente a fin de no contaminar el producto durante su recolección. Se evitó la deshidratación de la muestra, haciendo uso de medios de transporte frío hasta su traslado al laboratorio. La toma de muestra con tubos sin anticoagulante se utilizó en la prueba antígeno-anticuerpo. Previamente, asegurándose que las muestras hallan soltado el suero adecuadamente (Hernández, 1996), las muestras fueron utilizadas para realizarles el diagnóstico a la mayor brevedad posible (no más de una hora). Para las muestras destinadas al cultivo, se utilizaron tubos estériles de vacío con heparina como anticoagulante, éstos se colocaron en paquetes de hielo a 4° C, con el fin de evitar al máximo la hemólisis y/o la descomposición de la muestra.

Ya en el laboratorio, cada uno de los tubos fue desinfectado para el subsecuente procedimiento. Cada una de las muestras fue debidamente identificada con el propósito de evitar errores en el análisis y en la interpretación de los datos (SAGAR, 1995).

### **Diseño Estadístico Experimental**

Por las características del trabajo realizado, en el cual los bloques tienen distribución normal, para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizó un modelo no paramétrico denominado prueba Q de Cochran, la cual analiza el experimento en bloques completos al azar según Infante (1980).

Para la prueba se aplican los tratamientos (k) a los individuos de un bloque (r) y así para cada uno de los bloques. En este caso cada individuo al que se le aplica un tratamiento representa un bloque, por lo cual cada tratamiento es aplicado a los siete que le corresponden. Los resultados de las técnicas de diagnóstico, son dicotomizados, por lo cual se clasifican como fracaso o cero, si no funcionó el tratamiento; y éxito o uno si el tratamiento fue funcional; de otro modo, si con el diagnóstico se demuestra la presencia de la enfermedad, el resultado reportado es cero y si se demuestra que la enfermedad no está presente en el animal, el resultado reportado es uno.

Para tal prueba, la hipótesis propuesta es:

Ho: Los tratamientos son igualmente efectivos

Ha: Hay diferencia entre los tratamientos

El estadístico de prueba es el siguiente:

$$T = k(K-1) \frac{\sum_{j=1}^k \left( T_j - \frac{G.T.}{k} \right)^2}{\sum_{i=1}^r B_i (k - B_i^2)}$$

Una forma más sencilla, se obtiene de la siguiente manera:

$$T = \frac{k(k-1) \sum_{j=1}^k \left( T_j^2 - 2T_j \frac{G.T.}{k} + \frac{G.T.^2}{k^2} \right)}{\sum_{i=1}^r (k B_i - B_i^2)}$$

Lográndose la ecuación simplificada:

$$T = \frac{k(k-1) \sum_{j=1}^k T_j^2 - (k-1)(G.T.)^2}{k(G.T.) - \sum_{i=1}^r B_i^2}$$

Para la regla de decisión a seguir, se usa una aproximación de la  $\chi^2$ , por lo cual la regla es la siguiente:

Se rechaza Ho si  $T > \chi^2_{\alpha} (k - 1)$

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Aplicación de los Tratamientos**

Es importante explicar que los animales tienen respuesta diferente a los tratamientos por varias razones, que a continuación son analizadas.

Con la aplicación de los productos por vía endovenosa con jeringas y agujas hipodérmicas percutáneas, a pesar de la asepsia realizada en el lugar y el esfuerzo por realizarse lo mejor posible, el traumatismo no se puede evitar, la mayoría de los animales presentaron inflamación del cuello y posteriormente en algunos se observó la presencia de abscesos; obviamente presentándose mayor reacción en los grupos a los cuales se les aplicó mayor cantidad de producto, observando claramente que esta respuesta es debida fundamentalmente a la manipulación física y a las características de cada producto en particular.

Daroma por sus características particulares, fue calificado como un producto de intensidad irritable moderada (Runnells *et al.*, 1987), ocasionando diferentes reacciones, comenzando por lesiones físicas. Como podemos apreciar en los cuadros 3.1 y 4.1, este producto fue aplicado en un volumen mayor a los otros. En este caso, no sólo se observó el proceso inflamatorio normal, puesto que éste fue muy agresivo, por lo cual, para el segundo día de aplicación, se presentó la inflamación demasiado acelerada, observándose en casi todos los animales de estos tres grupos. Claramente se identificó menor reacción conforme disminuyó el volumen del producto, tal vez por que a mayor volumen, se incrementa el tiempo de manipulación, la dificultad del trabajo y por lo tanto un manejo excesivo ocasiona traumatismo significativo.

Aunque en aplicaciones con agua estéril a animales testigo, en las mismas cantidades volumétricas la respuesta fue menor, lo que hace suponer que el producto en particular ocasiona una reacción inflamatoria mucho mayor, por lo tanto la irritabilidad del producto es moderadamente severa (Runnells *et al.*, 1987), provocando endurecimiento, dolor y rubor de la zona; no causa salida de exudado, tan solo en algunos animales, no causa necrosis, el tejido se ve irritado, por lo tanto la recuperación es satisfactoria en poco tiempo. Esta irritación provoca una reacción de hipersensibilidad tardía o de tipo IV en la zona de aplicación de los productos (figuras 4.1 y 4.2).



**Figura 4.1** .- Irritación de la porción ventrolateral del cuello de las cabras.



**Figura 4.2** .- Reacción inflamatoria después de aplicación de los productos.



Tabla N° 4.1.- Concentración de Datos y Resultados.

N°	Diagnóstico pre-tratamiento	Tratamiento	1er Diagnóstico por aglutinación	2º Diagnóstico por aglutinación*	3er Diagnóstico por aglutinación*	1er Cultivo	2º Cultivo con Antibióticos	3er Cultivo Método de Ruiz Castañeda	Aglutinación de Prueba Biológica (Inoculación)	Cultivo de Prueba Biológica (Inoculación)	Observación al parto
1	positivo		positivo +	positivo + + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	Ratón muerto	Ratón muerto	normal
2	positivo		positivo + + +	positivo + + +	positivo + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
3	positivo		positivo +	positivo + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
4	positivo	T <sub>1</sub>	negativo -	negativo -	negativo -	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
5	positivo		positivo +	positivo + + +	positivo + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
6	positivo		positivo +	positivo + +	positivo + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
7	positivo		negativo -	negativo -	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
8	positivo		positivo +	positivo + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
9	positivo		positivo +	positivo + + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
10	positivo		positivo +	positivo + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
11	positivo	T <sub>2</sub>	positivo +	positivo + + +	positivo + +	negativo	muerta	negativo	negativo	negativo	normal
12	positivo		positivo +	positivo + + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
13	positivo		negativo -	negativo -	negativo -	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
14	positivo		positivo +	positivo + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
15	positivo		positivo +	positivo + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
16	positivo		positivo +	positivo + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal <sup>+</sup>
17	positivo		negativo -	positivo + +	positivo + + +	negativo	negativo	muerta	negativo	negativo	normal
18	positivo	T <sub>3</sub>	positivo + + +	positivo + + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
19	positivo		positivo +	positivo + + + +	positivo + + + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
20	negativo		negativo -	negativo -	negativo -	negativo	negativo	muerta	negativo	negativo	normal
21	positivo		positivo +	positivo + + +	positivo + +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal

\* Las cruces indican el resultado de la técnica de aglutinación estándar en microplaca (Hernández, 1996).

+ Nacieron bien 2 cabritos, murieron antes de 12 horas.

Tabla N° 4.1 ..... Continuación.- Concentración de Datos y Resultados.

N°	Diagnóstico pre-tratamiento	Tratamiento	1er Diagnóstico por aglutinación	2° Diagnóstico por aglutinación *	3er Diagnóstico por aglutinación *	1er Cultivo	2° Cultivo con Antibióticos	3er Cultivo Método de Ruiz Castañeda	Agglutination de Prueba Biológica (Inoculación)	Cultivo de Prueba Biológica (Inoculación)	Observación al parto
22	positivo		positivo +	positivo +++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
23	positivo		positivo +	positivo +++++	positivo +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
24	positivo		positivo +	positivo +++	positivo +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	No se preño
25	positivo	T <sub>4</sub>	positivo +	positivo +++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
26	positivo		positivo +	positivo +++++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal <sup>+</sup>
27	positivo		positivo +	positivo +++++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
28	positivo		positivo +	positivo +++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	Ratón muerto	Ratón muerto	normal
29	positivo		positivo +	positivo ++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
30	positivo		positivo +	positivo +++	positivo +	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
31	positivo		positivo +	positivo +++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
32	positivo	T <sub>5</sub>	positivo +	positivo +++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
33	positivo		positivo +	positivo +++	positivo +++++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
34	positivo		negativo -	positivo +++	positivo ++	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	normal
35	positivo		negativo -	positivo ++	positivo ++	negativo	negativo	negativo	Ratón muerto	Ratón muerto	normal

\*Las cruces indican el resultado de la técnica de aglutinación estándar en microplaca (Hernández, 1996).

+ Nacieron bien 2 cabritos, murieron antes de 12 horas.

En los últimos días, en algunos animales la aplicación de los productos fue muy difícil por esta causa. En dos cabras del grupo 3, después de tiempo, ya en la restauración de las lesiones, se observó la formación de vías de irrigación alternas a la vena yugular. Tal vez esta respuesta se deba a que el producto tiene un pH elevado ocasionando la irritación en la zona, sobre todo si éste llega al espacio intersticial o fuera del sistema circulatorio, ya que en el sistema circulatorio es tamponado por los sistemas de amortiguadores químicos; principalmente por el bicarbonato de sodio, formando una sal neutra y un ácido débil cuando un ácido enérgico o fuerte entra en el sistema. Cuando el ácido fuerte entra, la base débil presente reacciona, aunque el producto no es un ácido fuerte, sufre este tipo de reacción. Por esto al tomar el pH sanguíneo, éste se encuentra neutro o ligeramente ácido (Frandsen, 1986; Runnells *et al.*, 1987 y Tortora y Anagnostakos, 1984).

Inmediatamente después de la aplicación de Daroma, los animales tienen un comportamiento muy especial, primero toman una conducta agresiva, comienzan a caminar un poco vacilantes, en general defecan y orinan, esta actitud generalmente se presenta en animales asustados, en este caso, el comportamiento no dura más de 5 minutos por animal. Las heces fueron de consistencia normales, la orina tenía un pH neutro, color normal, la leche se observaba en perfectas condiciones, no se observaron trastornos visuales

aparentes y todo su comportamiento se regularizaba en aproximadamente 15 minutos después de la aplicación en los primeros días. Con el paso de los días fue disminuyendo el tiempo de relajación después del manejo de los animales, lo cual se podría considerar dentro de lo normal en animales estresados. En si, los efectos de la excitación de los animales con una manipulación desconocida, hace que se estimule el sistema nerviosos autónomo, activándose el sistema simpático y después el de relajación o estimulación parasimpática, ocasionando este comportamiento (Frandsen, 1986).

En el caso de los productos Promomvit I y II (tratamientos 4 y 5), la aplicación fue exitosa, los animales claramente no mostraron reacción inflamatoria severa o hipersensibilidad tipo IV, también es necesario mencionar que en estos casos la manipulación fue mucho menor, por lo tanto el estímulo local y nervioso fue mínimo. El producto en los dos casos no es muy agresivo con la sangre, no se observan cambios en vías sanguíneas, el pH sanguíneo no varía y los demás fluidos corporales fueron observados de la forma anteriormente mencionada y se encontraron en estado normal.

## **Diagnóstico Post-Aplicación de los Tratamientos**

Los datos concentrados de resultados de las técnicas de laboratorio realizadas se pueden observar en la tabla 4.1. Todas las técnicas fueron realizadas satisfactoriamente, en los casos en que se presentó alguna dificultad, se repitió la técnica pertinentemente. Se trató de observar y obtener los resultados lo más detallado posible.

### **Prueba de Aglutinación**

#### **Prueba de Aglutinación con Antígeno Rosa de Bengala o Aglutinación en Placa**

Esta prueba fue realizada inmediatamente después de la obtención de cada una de las muestras, no se presentó ningún problema al correr los resultados, pues es una prueba sencilla. Se realizó en tres diferentes muestreos tomados con 15 días de intervalo, en este caso la respuesta que se observa es que los animales son altamente positivos para los tres muestreos, se puede ver en el cuadro 4.1. Este resultado se presenta así entre los cinco diferentes grupos como en los diferentes tratamientos. Solo en los grupos a los que se les aplicó Daroma, se presentan animales negativos, pero no es significativa la respuesta, pues es uno por grupo o máximo dos en uno de los grupos (Mancera, 1995).

## **Prueba de Aglutinación Estándar en Microplaca**

Esta prueba es un poco más complicada que la anterior, sobretodo por la cantidad de muestras a trabajar, el tiempo para la observación y lo más complicado es la interpretación de los datos, la minuciosidad en que se trabaja debe ser muy grande, para lograr un buen resultado.

Para esta prueba, los animales salen positivos al igual que la anterior, como se observa en el cuadro 4.1. Podemos explicar que las dos técnicas escogidas para realizar el trabajo, no son del todo específicas para lograr un diagnóstico completo, éstas están enfocadas en detectar inmunoglobulinas totales o sea detecta igualmente IgG, IgM, IgA del suero sanguíneo, pues IgA e IgM principalmente se encuentran presentes en la actividad humoral residual y las IgG's se encuentran principalmente en la infección activa (Hernández, 1996). También es importante tomar en cuenta que en los casos de brucelosis crónica el diagnóstico es mucho más complicado que en los casos agudos y cuando en las cabras no sabemos la etapa de la enfermedad (Kolmer *et al.*, 1955).

Es importante mencionar que el antihelmíntico L-levamisol, tiene la característica de funcionar parecido a la hormona timopoyetina, estimulando la diferenciación de los linfocitos T y la respuesta a los antígenos, aumenta la

**BANCO DE TESIS**

T 14942

blastogénesis de linfocitos, la producción de interferones y la actividad de los receptores Fc en los macrófagos, probablemente también la citotoxicidad, la producción de linfocinas y la función de células supresoras, con todo esto estimulan la actividad fagocitaria de los linfocito y los macrófagos; ésto en los animales inmunosuprimidos (Tizard, 1989).

Con los resultados observados en el cuadro 4.1, reiteramos que el único método definitivo de diagnóstico es el aislamiento de la bacteria en los animales enfermos (FAO y OMS, 1986; SAGAR, 1995), pues los diagnósticos realizados por medio del antígeno brucelar, no muestran una diferencia antes o después de los tratamientos, en cuanto a si son positivos o negativos y este diagnóstico no presenta resultados consistentes para aseverar si existen o no bacterias en el organismo, pues una vez que a un animal se enfrenta a un antígeno, muestra su respuesta con anticuerpos y esta respuesta tiene una duración por tiempo indefinido, independientemente de la presencia de bacterias en el organismo (Tizard, 1989); podríamos decir que este efecto puede estar dado por la manipulación nutricional del sistema de producción de anticuerpos, pues como transcurre el tiempo, se observa ligeramente mayor la reactividad al antígeno brucelar, lo cual se podría adjudicar a la reactivación del sistema inmune, actividad positiva en la producción de anticuerpos. También la producción de inmunoglobulinas específicas y del tipo, ya sean IgM, IgA o IgG, dependen del estado o tiempo de infección, que en ocasiones cambia por diferentes circunstancias.

Como se mencionó anteriormente, el producto se enfoca a la reactivación del sistema inmune celular, tratando de eliminar ciertos factores químicos creados por las bacterias que interfieren con la actividad macrófaga, con esta acción es probable que también se estén modificando o removiendo elementos necesarios para la formación de respuesta humoral en el metabolismo (DePasqualle-Jardieu y Fraker, 1984; Spears, 1997).

En un principio se planeó realizar pruebas como la de fijación del complemento (Velázquez y Ontiveros, 1995) u otras para corroborar la actividad de la respuesta inmune humoral y los tipos de inmunoglobulinas presentes en las diferentes etapas postratamiento, pues la protección contra bacterias invasoras sistémicas se realiza con anticuerpos que se dirigen contra los antígenos de superficie y también en los microorganismos no encapsulados, los anticuerpos que atacan a los antígenos O funcionan como opsoninas para ayudar a su destrucción.

En los animales sensibilizados, las bacterias se destruyen por acción de los anticuerpos específicos y del complemento, activado por la vía clásica, y en los no sensibilizados, las bacterias son destruidas por la acción del complemento a través de la vía alterna. La activación de la vía terminal del complemento produce un complejo que ataca las membranas, consistente en C9 polimerizado. Este complejo es insuficiente, por sí solo, para matar a muchas



bacterias gram negativas. Comparadas sobre bases de concentración molar, la IgM es entre 500 a 1 000 veces más eficiente que IgG en opsonización, y cerca de 100 veces más potente que IgG en sensibilizar las bacterias para la lisis mediada por el complemento. Por ello, durante una respuesta inmunitaria primaria, la deficiencia cuantitativa de la respuesta de IgM se compensa por su calidad de respuesta, que asegura una protección precoz y eficiente.

### **Cultivo de Bacterias**

Después de realizar las pruebas anteriores, se realizaron los cultivos hemáticos tomando las recomendaciones de la FAO y OMS (1986), de Hernández (1996), de SAGAR (1995) y de Suárez (1995).

El cultivo de bacterias da la idea real de la actividad de los tratamientos en el animal, ya que dictamina la presencia de bacterias en el organismo. Con la no presencia de bacterias en el cultivo, se puede asumir que el producto es efectivo y que presentó una buena actividad en la destrucción de la bacteria en el animal. Dichos cultivos se realizaron con el mayor cuidado para evitar errores y obtener el mejor resultado posible (Hernández, 1996; SAGAR, 1995 y Suárez, 1995).

Los cultivos se realizaron dos meses después de la aplicación de los productos, esto fue con el propósito de esperar un desarrollo de la bacteria en

caso de que los tratamientos solamente ocasionaran una disminución en la población bacteriana en el animal.

Es conveniente comentar, que después de la aplicación de los tratamientos, los animales no presentaron cambios de temperatura corporal o fiebre, la cual permanece constante, a diferencia de cuando una infección se hace presente (Frandsen, 1986; Tizard, 1989).

Como se puede observar en el cuadro 4.1, los resultados en los cultivos fueron satisfactorios.

### **Método Directo para el Aislamiento Primario en Medio TSA Sólido**

Al realizar el análisis por este método, la técnica fue modificada, para facilitar el manejo de las muestras y sus cultivos. Los resultados fueron satisfactorios, aunque aproximadamente en 19 cultivos se observó desarrollo de colonias, las cuales fueron sembradas y desarrolladas, obteniendo de éstas, solo tres colonias gram negativas, al verse al microscopio las características no coincidieron con las de brucella, tampoco se identificaron

como tal en el análisis del BIOLOG; además las pruebas bioquímicas realizadas resultaron negativas a brucella, al igual que el desarrollo en micro atmósfera también fue negativo.

Este desarrollo de colonias se pudo deber a que falló algún procedimiento en la cadena antiséptica del manejo de los cultivos, presentándose las colonias dentro de las primeras 24 horas.

### **Método Directo Selectivo en Medio TSA Sólido con Antibióticos**

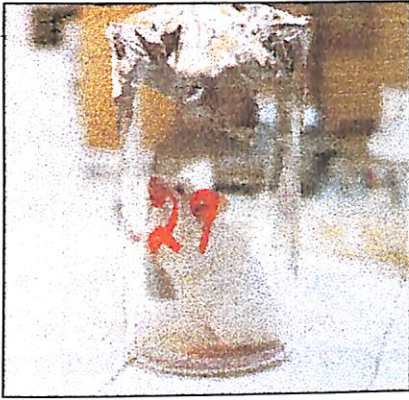
En este cultivo, no se observó desarrollo alguno ni en los que contenían atmósfera reducida, ni en los normales. El resultado de los cultivos fue muy satisfactorio, e incluso estos cultivos se dejaron hasta por 60 días y aún así no se observó desarrollo de la bacteria. Lo que se observó, fue la deshidratación de los medios de cultivo, efecto normal en el tiempo transcurrido. Tomando en cuenta lo anteriormente sucedido, se procedió a realizar un hemocultivo utilizando el método de Castañeda en medio TSA bifásico enriquecido.

## **Método de Castañeda en Medio TSA Bifásico Enriquecido**

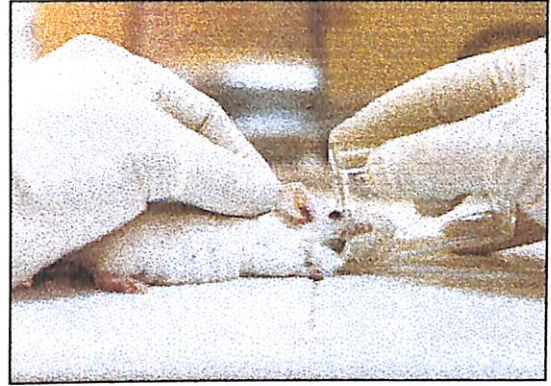
Este método es el mostrado por Hernández (1996), recomendado para el hemocultivo y mielocultivo en humanos, y que recomienda la Secretaría de Salud y Asistencia en México. Es muy simple y efectivo. El resultado fue muy satisfactorio, pues no se observó desarrollo de patógenos en los cultivos.

## **Prueba Biológica o Inoculación de Roedores de Laboratorio**

Con el propósito de tener mayor seguridad con las respuestas de los datos obtenidos en los análisis anteriores, se realizó una prueba en ratones albinos de laboratorio. La cual también produjo resultados satisfactorios, pues la prueba de tarjeta o aglutinación estándar, salió negativa; así como también los cultivos realizados para los ratones al sacrificio. La técnica de Castañeda fue la desarrollada, después de la toma de la muestra directa del corazón, la cual se introduce al medio de cultivo por punción del tapón de goma del frasco, previamente desinfectados. Estos cultivos se dejaron en observación hasta por 150 días y no mostraron desarrollo de *Brucella spp.*, se presentaron tres contaminados, pero al realizar las resiembras e identificación de las colonias, resultaron no ser *Brucella spp.* (Figuras 4.3 - 4.8).



**Figura 4.3.-** Ratón inoculado, después de los 50 días de observación.



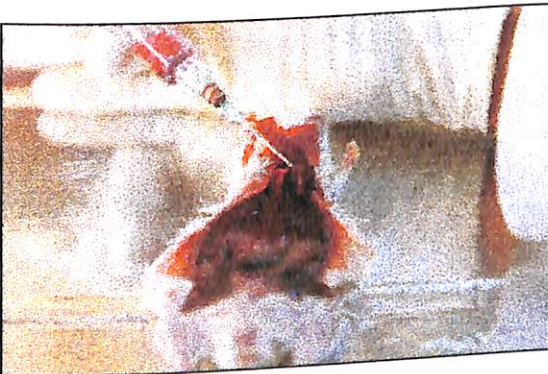
**Figura 4.4.-** Anestesia de los ratones con cloroformo.



**Figura 4.5.-** Disección de los ratones inoculados y la toma de muestra para el cultivo en medio bifásico de Castañeda.



**Figura 4.6.-** Disección del ratón anestesiado con cloroformo (aproximación).



**Figura 4.7.-** Toma de muestra sanguínea directa del corazón en los ratones diseccionados.



**Figura 4.8.-** Desinfección del tapón de goma del frasco, para la inoculación del medio bifásico.

Los ratones correspondientes a las cabras 1, 28 y 35, murieron en la primera semana, por lo cual se consideran negativos, se les realizó las pruebas correspondientes, pero en esta etapa las bacterias todavía no hubieran desarrollado. Estos murieron tal vez por reacción anafiláctica a la sangre de cabra o por alguna infección ocasionada en la inoculación, reacción tipo uno (Tizard, 1989).

### **Preñez de los Animales**

Las cabras se sincronizaron a las siete semanas post-tratamiento, y se preñaron satisfactoriamente con monta directa, utilizando un semental (sano) negativo a *Brucella spp.*. Esta fue la prueba más contundente de la curación de los animales. 40 días después del cruzamiento se comenzó a sondear a estos animales realizando el diagnóstico de la enfermedad. Después de seis meses los animales siguieron resultando negativos. El semental después del cruzamiento, fue sondeado, muestreándose cada 30 días y realizando la prueba de tarjeta. Después de ocho meses siguió resultando negativo.

### **Observaciones de los Animales al Parto**

Los animales que llegaron al término de la preñez fueron el 88.57 por ciento; los restantes, una cabra no se expuso al semental por que era muy vieja, las otras tres cabras murieron por causas ajenas a los tratamientos y la

enfermedad. Los partos fueron satisfactorios, solo en dos casos se presentó la muerte de los neonatos, nacieron vivos, pero éstos murieron dentro de las primeras 48 horas, si no fuera por los diagnósticos anteriores, se podría haber sospechado de lesiones por *Brucella spp.* (Runnells *et al.*, 1987), aunque en estos casos se realizó el cultivo del meconio y del líquido reticular de los animales el cual salió negativo, a *Brucella spp.*

Dentro del estudio, se consideró realizar cultivos de la placenta; sin embargo se presentaron problemas para su recolección debido a la hora del parto. En algunos casos se pudieron obtener muestras, sin embargo estas se contaminaron por su contacto con el ambiente y la manipulación. En su cultivo no se observaron crecimiento de colonias de la brucella.

### **Observaciones de la Condición General de los Animales**

Definitivamente los animales tuvieron una mejoría en la condición corporal después de la aplicación de los tratamientos, esto fue debido a la acción de los nutrientes en el metabolismo animal, aunado al sistema de alimentación en el cual se establecieron después de la aplicación de los tratamientos, pues la zona donde se realizó el apacentamiento de los animales, contenía una biodiversidad vegetal muy rica y en buen estado verde durante el periodo de estudio. Dicha caracterización florística de la dieta o presente en el agostadero, corresponde en su mayoría a gramíneas y herbáceas

dicotiledoneas y menormente arbustivas, esto es asumido con la época de año en que realizó el trabajo, época de aguas (primavera - verano - otoño) (López, 1991).

Como lo menciona Shils *et al.* (1994) la vitaminas sobre todo las del complejo B, tienen grandes efectos sobre el sistema inmunitario; también las vitaminas C, A y E, han mostrado acción dentro de metabolismo del sistema inmunológico y la respuesta a los tratamientos es realmente aceptable, pues los animales realmente se encuentran en buen estado nutricional. Los cultivos no mostraron presencia de bacterias *Brucella spp.* y los animales se encuentran sanos y sin problemas. Como explican Tizard, (1989) y Shils *et al.*, (1994), que algunos minerales tienen una actividad directa con el sistema inmune y que la deficiencia de algún mineral ha mostrado deterioro de este sistema, hace suponer que con la reactivación del metabolismo con los tratamientos utilizados y la buena nutrición, los animales puede destruir las bacterias de sus sistemas celulares.

La mejoría en la condición corporal de los animales después de la aplicación de los tratamientos y la buena alimentación, nos hace reconocer que tal vez los minerales y las vitaminas hacen su función como activadores inmunológicos o podría decirse que esta función es la que realmente



buscamos, pues el metabolismo inmunológico parte de los mismos principios del metabolismo celular general (Shils *et al.*, 1994). La utilización de buenas fuentes de minerales y vitaminas en el organismo por medio de la ingesta, no siempre acarrea buenos resultados por lo cual es importante analizar su buena disponibilidad y utilización por el animal.

### **Resultados del Diseño Estadístico Experimental**

Se realizaron los análisis correspondientes encontrándose T para cada uno de los diferentes tipos de diagnóstico ejecutado y se observa que el valor de T siempre es menor a  $\chi^2_{\alpha} (k - 1)$ , y partiendo de la regla de decisión, donde se rechaza  $H_0$  si  $T > \chi^2_{\alpha} (k - 1)$ , por lo tanto como  $T < 9.48773$  ( $p > 0.05$ ) y  $T < 13.2767$  ( $p > 0.01$ ) se rechaza  $H_a$ , por lo cual encontramos que los tratamientos son igualmente eficaces.

## **CONCLUSION**

**De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que:**

**Los tratamientos Daroma, Promomvit I y Promomvit II fueron igualmente efectivos ( $p > 0.05$ ) en la estimulación del sistema inmunológico y la posterior destrucción de la *Brucella melitensis* en cabras con diagnóstico positivo a la enfermedad, logrando estos resultados a un bajo costo; aunque Promomvit I y Promomvit II igualmente efectivos, resultaron más costosos, siendo su aplicación muy sencilla.**

## RECOMENDACIONES

Es necesario hacer en la universidad algunas recomendaciones ya que este trabajo es el primero de este tipo que se realiza con este prototipo de productos siendo necesario probarlos varias veces, e inclusive mejorarlos en su contenido y efectos. Y correr diferentes procedimientos que muestran la actividad de los tratamientos, toxicología, etc.

De lo anterior se puede derivar que la estimulación del sistema inmunológico se puede lograr manipulando las condiciones bioquímicas celulares y extracelulares, dándole al organismo la oportunidad de re-acomodar sus elementos necesarios para esta actividad. En el caso de la brucelosis se demuestra que es necesario ayudar al sistema inmunológico para que éste se recupere. Por lo tanto, los tratamiento logran nutrir al sistema interior de las células inmunológicas dándoles a éstas la capacidad de destruir la bacteria que se protege debido a su desequilibrio metabólico.

Es necesario destacar que la aplicación de los productos por vía endovenosa o percutánea es difícil manejar, pues es necesario hacer fácil este paso, la inflamación del cuello y abscesos nos ayuda a establecer las condiciones del tratamiento y se debe tomar en cuenta este efecto para mejorar los resultados. Tal vez sería mejor utilizar venoclisis y catéter con tres vías, fijos en el cuello, para la aplicación de los tratamientos diariamente sin tener que puncionar cada vez que se desea introducir el tratamiento (Olivar *et al.*, 1997 y Sansivero, 1996).

Para el diagnóstico definitivo de la enfermedad el aislamiento de la bacteria es el método más contundente (FAO y OMS, 1986 y SAGAR, 1995). Aunque es recomendable correr a la par de este diagnóstico uno que muestre el comportamiento inmunológico del animal, como en el caso de la prueba de dos mercaptoetanol, que analiza las IgM, junto con la de aglutinación, ya sea en placa o en tubo. Existen muchas pruebas nuevas como ELISA, PCR, inmuno ensayos que también son pruebas auxiliares buenas.

Como parte del estudio es recomendable realizar pruebas de diagnóstico patológico en las lesiones ocasionadas por el efecto físico ya sea por aplicación o por el tratamiento. Es necesario realizar exámenes de fluidos corporales, tales como orina, saliva, sudor; morfología celular, química sanguínea y otras complementarias.

Una forma de organizar el estudio sería trabajar con menor número de animales a la vez, cuatro o cinco por prueba, realizarlo con menos repeticiones. Utilizando animales sanos e inoculándolos con una cepa muestra identificada, recuperar la bacteria de los animales, previamente a la aplicación de los tratamientos adecuados y de una forma menos traumática utilizando los Cateter percutáneos centrales. Realizar los diagnósticos de enfermedad con las pruebas adecuadas como aglutinación estándar en tubo, dos mercaptoetanol, para lograr la identificación y diferenciación de IgM, IgA, e IgG (Hernández, 1996) y la utilización PCR para detectar la presencia de la bacteria por genética como diagnóstico. A la vez, se recomienda realizar los hemo y mielocultivos, ya sea en los medios recomendados o en los comerciales (sistema BANTEC).

Es recomendable realizar química sanguínea, biometría hemática, morfología celular, perfil renal y hepático, examen general de orina, coprológicos completos, además de una revisión clínica completa. Todo esto, en intervalos de tiempo regular, para poder dictaminar la eficacia del tratamiento y evaluar si éste no es tóxico o nocivo para el animal.

También es recomendable el uso de necropsias y realización de estudios micropatológicos y microhistológicos, así como, tomas de biopsias in vivo de médula ósea, hepáticas, ganglios linfáticos, líquido amniótico, etc.

Una forma de organizar el estudio sería trabajar con menor número de animales a la vez, cuatro o cinco por prueba, realizarlo con menos repeticiones. Utilizando animales sanos e inoculándolos con una cepa muestra identificada, recuperar la bacteria de los animales, previamente a la aplicación de los tratamientos adecuados y de una forma menos traumática utilizando los Cateter percutáneos centrales. Realizar los diagnósticos de enfermedad con las pruebas adecuadas como aglutinación estándar en tubo, dos mercaptoetanol, para lograr la identificación y diferenciación de IgM, IgA, e IgG (Hernández, 1996) y la utilización PCR para detectar la presencia de la bacteria por genética como diagnóstico. A la vez, se recomienda realizar los hemo y mielocultivos, ya sea en los medios recomendados o en los comerciales (sistema BANTEC).

Es recomendable realizar química sanguínea, biometría hemática, morfología celular, perfil renal y hepático, examen general de orina, coprológicos completos, además de una revisión clínica completa. Todo esto, en intervalos de tiempo regular, para poder dictaminar la eficacia del tratamiento y evaluar si éste no es tóxico o nocivo para el animal.

También es recomendable el uso de necropsias y realización de estudios micropatológicos y microhistológicos, así como, tomas de biopsias in vivo de médula ósea, hepáticas, ganglios linfáticos, líquido amniótico, etc.

## RESUMEN

En el presente estudio realizado en la unidad metabólica del Departamento de Nutrición y Alimentos de la UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, se utilizaron 35 cabras hembras, criollas, adultas, con diagnóstico positivo a *Brucella melitensis* las que fueron sorteadas al azar formando cinco lotes de siete animales por tratamiento, con el objetivo de probar tres complejos nutricionales, uno de ellos, Daroma en tres dosis de 21, 26 y 32 ml I.V. y los otros dos, Promomvit I y Promomvit II en dosis de 2 ml I.V.; con el fin de controlar o erradicar la Brucelosis.

Esta enfermedad se considera endémica y zoonótica de importancia en la actualidad, la cual es ocasionada por bacterias del género *Brucella melitensis*. Durante muchos años, se ha tratado de controlar y en la actualidad se ha logrado, pero su costo es elevado y con poca funcionalidad en la industria pecuaria.

Debido a la repercusión económica y social que presenta la brucelosis, es que se llevó a cabo este trabajo. El cual se plantea como una alternativa en la búsqueda del control y/o la erradicación de la enfermedad utilizando la nutrición.

La aplicación intravenosa (vena yugular externa) de soluciones nutricionales compuestas con minerales y vitaminas (Daroma, Promomvit I y Promomvit II), refuerzan el sistema inmunológico del animal, evitando que la bacteria se reproduzca o sobreviva.

De los resultados observados de las pruebas inmunológicas, se llegó a la conclusión de que el único método definitivo de diagnóstico es el aislamiento de la bacteria de los animales enfermos (FAO y OMS. 1986; SAGAR, 1995); efecto dado por la producción de anticuerpos, observando la reactividad al antígeno brucelar. En el presente estudio se realizaron tres técnicas de hemocultivo, igualmente se inocularon ratones de laboratorio con sangre de las cabras, para obtener el diagnóstico de la enfermedad. Los cultivos realizados no mostraron desarrollo de sepas de *Brucella spp.* Los ratones tampoco se infectaron de la bacteria, por lo que se puede concluir que los tratamientos son igualmente efectivos en el tratamiento de la Brucelosis en cabras ( $p > 0.05$ ).



## LITERATURA CITADA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1989. *Molecular Biology of THE CELL*. 2<sup>d</sup> ed. Garland Publishing. New York, NY. United States of America. p. 1001 - 1057.
- Alton, G. G. y J. R. L. Forsyth. 1998. *Brucella*. [www. ag-link. com](http://www.ag-link.com).
- Boura, P., M. Raptopoulou-Gigi, E. Acriviadis and G. Goulis 1984. Reevaluation of the Effect of Levamisole in Chronic Brucellosis: in vitro and in vivo effect on monocyte phagocytosis. *J. Immunopharmacol*; 6(3):135 - 146. United States of America
- Carter, G.R. y M.M. Chengappa. 1994. *Bacteriología y micología veterinaria*. 2<sup>a</sup> ed. Manual Moderno. México. p. 27 - 64, 111 - 119, 351 - 359.
- CNEMSG, 1988a. Los Municipios de Coahuila. *Enciclopedia de los Municipios de México*. Centros Estatales de Estudios Municipales. Centro Nacional de Estudios Municipales de la Secretaría de Gobernación (CNEMSG). México, D. F. p. 155.
- CNEMSG. 1988b. Los Municipios de Nuevo León. *Enciclopedia de los Municipios de México*. Centros Estatales de Estudios Municipales. Centro Nacional de Estudios Municipales de la Secretaría de Gobernación (CNEMSG). Monterrey, Nuevo León, México. p. 160 - 165.
- Corbel, M.J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* Apr;(2):213-221. United States of America.
- DePasqualle-Jardieu, P. and P.J. Fraker. 1984. Interference in the Development of a Secondary Immune Response in Mice by Zinc Deprivation: Persistence of Effects. *J. Nutr.* 114: 1762 - 1769. United States of America
- Fix, Douglas F. 1998. *Brucella*. [www. accelgen.com](http://www.accelgen.com).

La aplicación intravenosa (vena yugular externa) de soluciones nutricionales compuestas con minerales y vitaminas (Daroma, Promomvit I y Promomvit II), refuerzan el sistema inmunológico del animal, evitando que la bacteria se reproduzca o sobreviva.

De los resultados observados de las pruebas inmunológicas, se llegó a la conclusión de que el único método definitivo de diagnóstico es el aislamiento de la bacteria de los animales enfermos (FAO y OMS. 1986; SAGAR, 1995); efecto dado por la producción de anticuerpos, observando la reactividad al antígeno brucelar. En el presente estudio se realizaron tres técnicas de hemocultivo, igualmente se inocularon ratones de laboratorio con sangre de las cabras, para obtener el diagnóstico de la enfermedad. Los cultivos realizados no mostraron desarrollo de sepas de *Brucella spp.* Los ratones tampoco se infectaron de la bacteria, por lo que se puede concluir que los tratamientos son igualmente efectivos en el tratamiento de la Brucelosis en cabras ( $p > 0.05$ ).

## LITERATURA CITADA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1989. Molecular Biology of THE CELL. 2<sup>d</sup> ed. Garland Publishing. New York, NY. United States of America. p. 1001 - 1057.
- Alton, G. G. y J. R. L. Forsyth. 1998. Brucella. [www. ag-link. com](http://www.ag-link.com).
- Boura, P., M. Raptopoulou-Gigi, E. Acriviadis and G. Goulis 1984. Reevaluation of the Effect of Levamisole in Chronic Brucellosis: in vitro and in vivo effect on monocyte phagocytosis. J. Immunopharmacol; 6(3):135 - 146. United States of America
- Carter, G.R. y M.M. Chengappa. 1994. Bacteriología y micología veterinaria. 2<sup>a</sup> ed. Manual Moderno. México. p. 27 - 64, 111 - 119, 351 - 359.
- CNEMSG, 1988a. Los Municipios de Coahuila. Enciclopedia de los Municipios de México. Centros Estatales de Estudios Municipales. Centro Nacional de Estudios Municipales de la Secretaría de Gobernación (CNEMSG). México, D. F. p. 155.
- CNEMSG. 1988b. Los Municipios de Nuevo León. Enciclopedia de los Municipios de México. Centros Estatales de Estudios Municipales. Centro Nacional de Estudios Municipales de la Secretaría de Gobernación (CNEMSG). Monterrey, Nuevo León, México. p. 160 - 165.
- Corbel, M.J. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. Apr;(2):213-221. United States of America.
- DePasqualle-Jardieu, P. and P.J. Fraker. 1984. Interference in the Development of a Secondary Immune Response in Mice by Zinc Deprivation: Persistence of Effects. J. Nutr. 114: 1762 - 1769. United States of America
- Fix, Douglas F. 1998. Brucella. [www. accelgen.com](http://www.accelgen.com).

- Flores C., R. 1988. Leptospirosis, Tuberculosis y Brucelosis. En: 4ª Conferencia Internacional sobre ganado lechero. Memorias CIGAL. México.
- Frandsen, R.D. 1986. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. 4ª ed. Interamericana - Mc Wraw - Hill. México. p. 236, 253 - 256.
- Freeman, B. A. 1985. Microbiología de Burrows. Interamericana. 22ª ed. México. p. 573 - 581.
- Galliespie, J.G. y J.F. Timoney. 1983. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4ª ed. Ediciones Científicas. México. p. 106 - 129.
- Haenlein, G.F.W. 1991. Advances in the Nutrition of Macro and Microelements in Goats. En: VII Reunión Nacional Sobre Caprinocultura. Monterrey Nuevo León. México. p. 290 - 320.
- Hall, W.H. 1990. Modern Chemotherapy for Brucellosis in Humans. Rev. Infect. Diseases. 12(6):1060-1099. Chicago, ill. United States of America.
- Hernández M., I. 1996. Técnicas de laboratorio para el estudio de brucelosis. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). Secretaría de Salud. Subsecretaría de Servicios de Salud. México. 19 p.
- Hoard's Dairyman. 1997. Editorial: ¿Es la nueva vacuna contra la brucelosis el inicio de una nueva era?. Hoard's Dairyman en español. Ed. Agropecuarios. febrero. p. 65. México.
- Infante G., S. 1980. Métodos estadísticos no paramétricos. Colegio de postgraduados. Centro de Estadística y Cálculo Chapingo, México. p. 134 - 137.
- Kolmer, T.A., E.H. Spaulding y H.W. Robinson. 1955. Métodos de Laboratorio. Ed. Interamericana. México D.F. p. 500 - 580.
- López T., R. 1991. Caprinos: Composición Florística y Calidad Nutritiva de la Dieta de Caprinos en un Matorral Macrófilo Con y Sin Resiembra de Gramíneas. Folleto de Divulgación Vol. II, N° 12. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah. México. p. 1 - 29.
- Nicoletti, P., F.W. Milward, E. Hoffmann and L. Altvater. 1985. Efficacy of long acting oxitetracycline alone or combined with streptomycin in the treatment of bovine brucellosis. J. Amer. Vet. Med. Association 187 (5): 493 . United States of America.

- Nicoletti, P., R.P. Lenk, M.C. Popescu and C.E. Swenson. 1989. Efficacy of various treatment regimens, using liposomal streptomycin in cows with brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 50 (7): 1040 . United States of America.
- Mancera, A.M. 1995. Prueba del antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta. En: Congreso Internacional en Producción Caprina, curso pre-congreso: Brucelosis en los animales. Memorias. INIFAP, FMVZ - UAZ y FMVZ - UNAM. México.
- Marín C., M., M.P. Jiménez de Baques, M. Barberán and J.M. Blasco. 1989. Efficacy of long acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of *Brucella ovis* infection of rams. *Am. J. Vet. Res.* 50 (4): 566 United States of America.
- Olivar L., V., H. Carrillo L., L. Marroquín Y., A. Chávez L., S. Rivas E. y F. Ocaña G. 1997. Inserción de Catéteres Percutáneos en Vena Subclavia por Abordaje Supraclavicular en Pacientes Pediátricos Gravemente Enfermos. *Bol. Med. Infant. Mex.* Marzo. Vol. 54; N° 3: 132 - 140. México.
- Olsen, S., M. Palmer y M. Stevens. 1997. La nueva vacuna contra la brucelosis no causa falsos positivos. *Hoard's Dairyman* en español. Ed. Agropecuarios. febrero. p. 90 - 91. México.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud (FAO y OMS). 1986. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. 6° informe. Ginebra, Suiza. 149 p.
- Radwan A., I., S.I. Bekari, A.M. al-Bokmy, P.V. Prasad, O.M. Mohamed and S.T. Hussain. 1993. Successful Therapeutic Regimens for Treating *Brucella mellitensis* and *Brucella abortus* Infections in Cows. *Rev. Sci. Tech.* Sep; 12(3): 909 - 922. United States of America.
- Rodríguez M., D., F. Carrete C., R. García C. y A.R. Vázquez. 1991. Diagnóstico Mineral en 23 Localidades Caprinas del Sur del Estado de Coahuila. En: VII Reunión Nacional Sobre Caprinocultura. Monterrey Nuevo León. México. p. 43 - 46.
- Rodríguez M., D., A. Mejía H. e I. Mejía H. 1988. Determinación de Minerales en el Suelo, Forraje y Suero Sanguíneo de Bovinos y Caprinos en la Región Ganadera del Norte del Estado de Coahuila. En: Seminario: Logros de la Investigación de la UAAAN Durante los Últimos Cinco Años. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 161 - 173.

- Runnells, R.A., W.S. Monlux y A.W. Monlux. 1987. Principios de Patología Veterinaria, Anatomía patológica. 7ª ed. Compañía editorial continental. México. D. F. p. 229 - 267.
- Sansivero, G. E. 1996. ¿Porqué Escoger un Catéter Central Periférico? Lo que se necesita saber. Nursing 96. Febrero, 17 - 23. España.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). 1995. Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario en Tuberculosis bovina y Brucelosis. Programa de Aprobación de Médicos Veterinarios. CONETEB. Sria. Agric. Gan. y Des. Rural. México.
- Shils, M.E., J.A. Olson and M. Shike. 1994. Modern Nutrition in Health and Disease. Volume 1. 8th ed. Lea & Febiger. United States of America. p. 645 - 653.
- Spears, J.W. 1997. Relationship Between Nutrition and Response Immune. Tri-State Dairy Nutrition Conference. Mayo. p. 1 - 7. United States of America.
- Suárez G., F. 1995, Perspectivas en el Diagnóstico y Control de Brucelosis. En: Congreso Internacional en Producción Caprina, curso pre-congreso: Brucelosis en los animales. Memorias. INIFAP, FMVZ - UAZ y FMVZ - UNAM. México.
- Tizard, I. 1989. Inmunología Veterinaria. 3ª ed. Ed. Interamericana - McWraw - Hill. México, D.F. p. 1 - 61.
- Tortora, G.J. y N.P. Anagnostakos. 1984. Principios de Anatomía y Fisiología. 3ª ed. Ed. Harla. México, D.F. p. 42 - 43.
- Valdés R., J.U. 1985. Estudio Edafológico de la UAAAN en el Area Correspondiente a Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Tesis: Licenciatura. p. 6 -20. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Vargas G., J.M. y B. Huerta M. 1996. Evaluación del Estado Mineral en Suero Sanguíneo de Cabras Pastoreando Vegetación Natural en Colón, Gro.. En: XI Reunión Sobre Caprinocultura. Memorias. Chapingo, México. p. 134 - 139.

Velázquez, F.Q. y C.M.L. Ontiveros. 1995. Práctica para la estandarización de la prueba de fijación del complemento para el diagnóstico de Brucelosis. En: Congreso Internacional en Producción Caprina, curso pre-congreso: Brucelosis en los animales. Memorias. INIFAP, FMVZ - UAZ y FMVZ - UNAM. México.

## **APENDICE A**



**Cuadro A.1** .- Composición Nutricional de la Alfalfa Ofrecida a los Animales.

<b>Nutriente</b>	<b>Cantidad*</b>
Extracto Libre de Nitrógeno	32.795 %
EM	2.56 Mcal/kg
Materia Seca	91 %
Proteína Cruda	17.80 %
Extracto Etéreo	1.535 %
Fibra Cruda	30.37 %
NDF	47.1 %
ADF	36.7 %
Cenizas	8.5 %
	Minerales**
Se	10.5 ppm
Cu	17.5 ppm
Pb	40 ppm
Zn	103 ppm.
Ca	240 ppm
Na	1250 ppm
Mg	2000 ppm
P	3100 ppm
K	21200 ppm

\* Fracciones determinadas por Análisis Próximo de Wende, UAAAN

\*\* Fracciones determinadas por Absorción atómica, UAAAN

**Cuadro A.2.-** Composición de la premezcla mineral ofrecida a las cabras durante el apacentamiento.

<b>Elementos o nutrientes</b>	<b>Cantidad diaria(g)</b>
Calcio	12.5
Fosforo	7.80
Sodio	2.3
Potasio	4.1
Magnesio	0.44
Azufre	0.08
Cobre	0.02
Cobalto	0.0003
Iodo	0.0016
Manganeso	1.6
Zinc	2.0
Selenio	0.008
Molibdeno	0.0040
Niquel	3000 mcg
Vitamina A	25,000 IU
Vitamina D	7,000 IU
Vitamina E	500 IU
B6 (piridoxina)	2.6 mg
Riboflavina	26 mg
B12(Cianocobalamina)	27.2 mg
Acido fólico	300 mg

Mezcla comercial, Adaptado de Haenlein (1991)

## **APENDICE B**

**Cuadro B.1.- Resultados de la prueba de Q de Cochran para el 1º Diagnóstico por aglutinación**

Bloque	Tratamientos					$B_i$	$B_i^2$
	T1	T2	T3	T4	T5		
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	1	1
4	1	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	1	0	1	3	9
7	1	0	0	0	1	2	4
$T_j$	2	1	2	0	2	7	15
$T_j^2$	4	1	4	0	4	13	

$$ST_j^2 = 13$$

$$k = 5$$

$$r = 7$$

$$GT = 7$$

$$SB_i^2 = 15$$

$$T = 3.2$$

**Cuadro B.2.- Resultados de la prueba de Q de Cochran para el 2º Diagnóstico por Aglutinación**

Bloque	Tratamientos					$B_i$	$B_i^2$
	T1	T2	T3	T4	T5		
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	1	0	0	2	4
7	1	0	0	0	0	1	1
$T_j$	2	1	1	0	0	4	6
$T_j^2$	4	1	1	0	0	6	

$$ST_j^2 = 6$$

$$k = 5$$

$$r = 7$$

$$GT = 4$$

$$SB_i^2 = 6$$

$$T = 4$$

**Cuadro B.3.- Resultados de la prueba de Q de Cochran para el 3º Diagnóstico por Aglutinación**

Bloque	Tratamientos					$B_i$	$B_i^2$
	T1	T2	T3	T4	T5		
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	1	0	0	2	4
7	0	0	0	0	0	0	0
$T_j$	1	1	1	0	0	3	5
$T_j^2$	1	1	1	0	0	3	

$$ST_j^2 = 3$$

$$k = 5$$

$$r = 7$$

$$GT = 3$$

$$SB_i^2 = 5$$

$$T = 2.4$$

**Cuadro B.4.-** Resultados de la prueba de Q de Cochran para el 1º Diagnóstico por Cultivo

Bloque	Tratamientos					$B_i$	$B_i^2$
	T1	T2	T3	T4	T5		
1	1	1	1	1	1	5	25
2	1	1	1	1	1	5	25
3	1	1	1	1	1	5	25
4	1	1	1	1	1	5	25
5	1	1	1	1	1	5	25
6	1	1	1	1	1	5	25
7	1	1	1	1	1	5	25
$T_j$	7	7	7	7	7	35	175
$T_j^2$	49	49	49	49	49	245	

$$ST_j^2 = 245$$

$$k = 5$$

$$r = 7$$

$$GT = 35$$

$$SB_i^2 = 175$$

$$T = 0/0$$

$$\text{Numerador de } T = 0$$

$$\text{Denominador de } T = 0$$

**Cuadro B.5.- Resultados de la prueba de Q de Cochran para el 2º Diagnóstico por Cultivo**

Bloque	Tratamientos					$B_i$	$B_i^2$
	T1	T2	T3	T4	T5		
1	1	1	1	1	1	5	25
2	1	1	1	1	1	5	25
3	1	1	1	1	1	5	25
4	1	muerta	1	1	1	4	16
5	1	1	1	1	1	5	25
6	1	1	1	1	1	5	25
7	1	1	1	1	1	5	25
$T_j$	7	6	7	7	7	34	166
$T_j^2$	49	36	49	49	49	232	

$$ST_j^2 = 232$$

$$k = 5$$

$$r = 7$$

$$GT = 34$$

$$SB_i^2 = 166$$

$$T = 4$$

$$\text{Numerador de } T = 16$$

$$\text{Denominador de } T = 4$$



**Cuadro B.6.- Resultados de la prueba de Q de Cochran para el 3° Diagnóstico por Cultivo**

Bloque	Tratamientos					B <sub>i</sub>	B <sup>2</sup> <sub>i</sub>
	T1	T2	T3	T4	T5		
1	1	1	1	1	1	5	25
2	1	1	1	1	1	5	25
3	1	1	muerta	1	1	4	16
4	1	muerta	1	1	1	4	16
5	1	1	1	1	1	5	25
6	1	1	muerta	1	1	4	16
7	1	1	1	1	1	5	25
T <sub>j</sub>	7	6	5	7	7	32	148
T <sup>2</sup> <sub>j</sub>	49	36	25	49	49	208	

$$ST_j^2 = 208$$

$$k = 5$$

$$r = 7$$

$$GT = 32$$

$$SB_i^2 = 148$$

$$T = 5.3333333$$

$$\text{Numerador de } T = 64$$

$$\text{Denominador de } T = 12$$

T-14942