

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA**  
**UNAN – LEON**  
**MEDICINA VETERINARIA**



Tema: Seroprevalencia de brucelosis en caballos destinados a la tracción en la ciudad de León frente a *Brucella abortus* en el año 2006.

Presentado por: Br. Daniel Enrique García Reyes  
Br. Donald Alejandro Henríquez Aragón

Tutor: Dr. Migdonio Quintanilla Darce.

Asesor: Dr. Alan Peralta

León 14 de Agosto del 2007

## INDICE

	Páginas
I.- Introducción	1
II.- Planteamiento del problema	2
III.- Antecedentes	3
IV.- Justificación	4
V.- Objetivos	5
VI.- Marco teórico	6
1.- Concepto	6
2.- Etiología	6
3.- Epidemiología	12
4.- Patogenia	14
5.- Manifestaciones Clínicas	15
6.- Diagnóstico	17
7.- Tratamiento, Control y Prevención	18
8.- Salud Pública	19
VII.- Hipótesis	21
VIII.- Diseño metodológico	22
IX.- Resultados	26
X.- Discusión	27
XI.- Conclusiones	28
XII.- Recomendaciones	29
XIII.- Bibliografía	30
Anexos	

## RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la seroprevalencia de brucelosis equina en caballos usados en tracción animal en la ciudad de León que se encuentra a unos 20 Km. de la costa pacífica en una posición geográfica de 12° 26' al norte (latitud) y 86° 53' al oeste (longitud).

En Nicaragua no existe evidencia de estudio sobre prevalencia de brucelosis equina en caballos de tracción, pero si se conoce de la existencia de esta en otras especies, esto sirvió de sustento para la realización de la tesis. El presente trabajo se realizó en la ciudad de León durante el año 2006, se tomó como población objeto de estudio a los 300 caballos de tracción de la ciudad de León, se seleccionó una muestra de 95 individuos haciendo uso del programa Win episcopy, tipo de estudio es transversal. Se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención de suero y la realización de la prueba serológica Rosa de Bengala, se tomó como base de estudio la hipótesis siguiente: 10% de los caballos en estudios se encuentran infectados con brucelosis.

De la muestra obtenida, 95 especímenes, el 58.94 % de esta no reaccionó, mientras que el 41.05 si fue encontrado reactor, significando esto el equivalente a la prevalencia obtenida.

Se determinó que la seroprevalencia de Brucelosis en Equinos es del 13 %, utilizando la prueba Rosa de Bengala, el 12 % de los caballos destinados a la tracción se dedican al transporte de personas y materiales de uso diario en el hogar. Por zona de trabajo, los ubicados en el PALI, presentaron la más alta proporción de reactores con 9.

## I.- INTRODUCCIÓN

En nuestro país los caballos de trabajo son importantes económicamente para muchas familias puesto que sirven como única fuente de ingreso, la población de caballos carretoneros en León es aproximadamente de 300, los cuales no reciben adecuado manejo y atención veterinaria. Esta situación no permite a los propietarios conocer el estado sanitario y las correctas prácticas de manejo que deben ser aplicadas a estos especímenes.

A través de información obtenida de Proyecto de Vigilancia Epidemiológica de Salud Animal (PROVESA) el cual se conformó con el apoyo del Programa PL-480 (USDA).

En el año 1999, se crea e implementa el Sistema de Información de Vigilancia Epidemiológica (SIVE), Herramienta para la toma de decisiones y base de datos donde se lleva la incidencia de las enfermedades animales en el territorio nacional, lo que permite contar con información actualizada para aplicar oportunas medidas de control y erradicación de enfermedades en el cual no se contempla al ganado equino como objeto de estudio.

En el presente estudio analizamos una muestra representativa de suero equino, utilizando la prueba Rosa de Bengala para determinar la seroprevalencia de brucelosis en equinos frente a *Brucella abortus*.

## **II.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En Nicaragua no existe evidencia de estudio sobre prevalencia de brucelosis equina en caballos de tracción, pero si se conoce de la existencia de esta en otras especies.

### III.-ANTECEDENTES

En el año 2000-2001, a nivel nacional se realizó un muestreo serológico para Brucelosis, Tuberculosis, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y Leucosis Enzootica Bovina (LEB); se determinó el tamaño de la muestra en 12,447 bovinos.

Todo esto evidencia que los trabajos anteriormente citados enfocan su atención a la detección de la brucelosis en el ganado bovino, resultados que se expresan en la siguiente tabla.

#### PREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN NICARAGUA (2001)

	Censo	Total de muestras	Muestras Negativas	Prevalencia máxima posible
Total	2.394.637	2.528	2.527	0,12%

#### **IV.-JUSTIFICACIÓN**

En Nicaragua no existe un centro de referencia con datos estadístico donde indique la prevalencia de brucelosis equina para caballos de tracción. Al no tener datos locales se dificulta el trabajo del clínico para determinar el estado de salud del caballo.

Es importante mencionar que esta enfermedad no se puede diagnosticar por exploración clínica, ya que mucha de su sintomatología puede ser confundida con otras enfermedades, para establecer el diagnóstico serológico, es necesario usar la técnica ROSA DE BENGALA, aunque esta prueba no es definitiva proporciona conocimientos de la situación epidemiológica de esta enfermedad.

## V.- OBJETIVOS

### General:

Determinar seroprevalencia de brucelosis en caballos destinados a la tracción en la ciudad de León frente a *Brucella abortus* en el año 2006. Con Rosa de Bengala.

### Específicos:

1. Seleccionar la población objeto de estudio.
2. Determinar el tamaño de la muestra de la población objeto de estudio.
3. Realizar toma de muestras de sangre de equinos seleccionados.
4. Realizar diagnóstico con la técnica Rosa de Bengala.
5. Analizar los resultados.
6. Aportar información de la prevalencia de brucelosis en caballos destinado a la tracción en la ciudad de León.

## VI.-MARCO TEORICO.

### 1.-Concepto.

Enfermedad infecciosa, contagiosa que afecta a múltiples especies animales, caracterizada por la presentación de abortos y retención placentaria, alteraciones reproductivas secundarias, articulares y particularmente en el ganado equino a nivel de la cruz, producida por una bacteria, del género *Brucella*.

### 2.-Etiología

El género *Brucella* está constituido por bacilos gran negativos pequeños, inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento, no poseen cápsula ni forman esporas. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos <sup>(27)</sup>. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares. <sup>(39)</sup>

El género *Brucella* incluye seis especies diferentes: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris*. <sup>(10)</sup> De ellas, las cuatro primeras pueden infectar al hombre. En la Tabla I (anexo), se encuentran detalladas las especies de *Brucella*, sus hospedadores conocidos y las características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*.

El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS. <sup>(4)</sup>

Las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas y su ultraestructura es semejante a la de algunas enterobacterias (*Yersinia enterocolítica*, *Salmonella landau*, *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli*) <sup>(13)</sup>, aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa (ME).

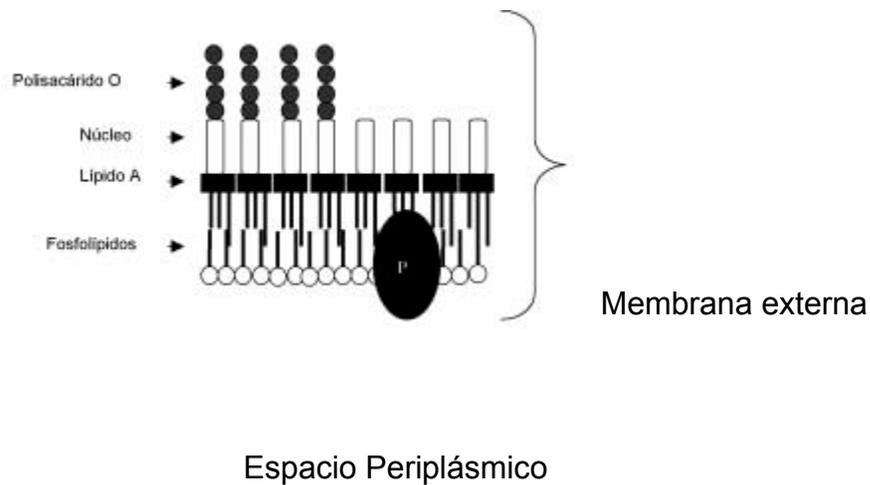
## Estructura y composición química

### Estructura Externa:

La ME de las Brucellas, es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina. Su componente más abundante y mejor estudiado es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R (Fig. 1).

Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena O, o está reducida a muy pocos residuos.

P: proteínas



El lípido A es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilos presenta sustituciones por ácidos grasos de variada longitud de cadena. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO) y no contiene ni heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS-S pero no en el del LPS-R. El PSO es la porción más distal del LPS. Es un homopolímero lineal compuesto por n-residuos de N-formil perosamina (4,6 dideoxi-4-formamido- $\alpha$ -Dmanopiranosilo). La unión entre estos residuos puede ser de dos tipos:  $\alpha$  1-2 o  $\alpha$  1-3, lo que permite diferenciar dos configuraciones alternativas, la A y la M, de mucha importancia en la determinación de las biovariedades, y que se establecen a partir de la alternancia de las uniones entre residuos en el PSO (Anexo, Tabla I).

Las *Brucellas* contienen otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O, pero no está unido al núcleo. <sup>(28)</sup> Se ha descrito un tercer polisacárido conocido como poli B, que se obtiene a partir de la cepa

mutante en fase rugosa *B. melitensis* 115, por tratamiento con ácido tricloroacético 0,2 M y que para algunos autores sería químicamente equivalente al HN.<sup>(2)</sup>

Las proteínas de membrana externa (PME u OMPs) se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36- 38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa)<sup>(11) (32)</sup> y se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del LPS de las primeras. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se han identificado otras proteínas de membrana menos abundantes que se denominan proteínas menores, siendo algunas de ellas lipoproteínas.<sup>(9)</sup>

### **Estructura Interna:**

Las proteínas citoplasmáticas de las bacterias del género *Brucella* son específicas de ese género y la mayoría son compartidas por todas las especies.<sup>(5)</sup> Algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico, como por ejemplo la glicoproteína A2 termorresistente<sup>(36)</sup>, una proteína de 17 kDa, involucrada en la síntesis de riboflavina, que aparece en la fase activa de la infección<sup>(16)</sup> y la proteína periplásmica BP26.<sup>(34)</sup> Todas estas proteínas forman parte de un antígeno denominado CP, empleado en pruebas de ELISA.

## Respuesta inmune

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos.

La activación del C por las vía clásica y alterna juega un rol muy importante en la resistencia contra bacterias gram negativas. Existen controversias en cuanto a la capacidad que posee el LPS de *Brucella* de activar la vía alterna del C, <sup>(18)</sup> <sup>(12)</sup> sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana <sup>(17)</sup>. Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella*.

La opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Como ya se ha mencionado, las Brucellas son capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la desgranulación de los gránulos de los neutrófilos, con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa. Se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evitan así su destrucción. <sup>(37)</sup> Los neutrófilos de las distintas especies animales reaccionan en forma diferente ante *Brucella*. Así, los neutrófilos de los cobayos no son capaces de destruir las cepas lisas, mientras que la actividad bactericida de los neutrófilos bovinos frente a estas cepas es mayor que la de los neutrófilos humanos, no registrándose diferencias entre los dos últimos frente a las cepas rugosas.

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos. El ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS. Esta interacción induce también la producción de IL-12 que estimula las células NK y los linfocitos T colaboradores o helper (LTH) CD4+, que secretan IFN- $\gamma$ , favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune predominantemente mediada por LTH1. <sup>(41)</sup> Este subgrupo de linfocitos T estimula fundamentalmente la respuesta de tipo celular y participa en forma directa en la protección contra microorganismos intracelulares, ya que su amplio patrón de citoquinas incluye IL 2, 3, 6, 12, TNF- $\alpha$  y sobre todo IFN- $\gamma$ , <sup>(1)</sup> esencial para la activación de macrófagos. Una vez fagocitada la bacteria, los macrófagos poseen la capacidad de destruirla inmediatamente, pero del mismo modo que ha sido descrito para los neutrófilos, *Brucella* es capaz de inhibir estos mecanismos de destrucción. El hierro presente en los macrófagos tiene un papel preponderante en la eliminación de los microorganismos ya que cataliza una reacción metabólica destinada a incrementar la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, fundamentales en la eliminación de patógenos intracelulares. <sup>(19)</sup>

Los linfocitos también son impactados por distintos antígenos de *Brucella*. Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro de la célula presentadora de antígenos y sus péptidos asociados a moléculas CMH clase I y II son presentados a los LTH CD4+ y LT citotóxicos (LTC) CD8+. Estos últimos son capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas con *Brucella*. El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar a los linfocitos B (LB) sin la participación de los LTH. Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos, <sup>(29) (23)</sup> en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados.

Estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos en ciertas propiedades tanto *in vitro* como *in vivo* como, entre otras, la incapacidad de activar complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación .<sup>(25)</sup> <sup>(24)</sup> Para clarificar el rol de los anticuerpos que se originan durante la infección se han realizado numerosos ensayos experimentales en ratones, demostrándose que anticuerpos anti LPS inyectados en forma pasiva han logrado protegerlos contra infecciones posteriores. <sup>(20)</sup> Por su parte, estudios efectuados en bovinos han demostrado que una elevada concentración de Ig G durante una infección activa resulta perjudicial ya que inhibe la lisis complemento dependiente, promueve la fagocitosis de los microorganismos e incrementa la localización intracelular y la diseminación hacia los distintos tejidos. <sup>(17)</sup> La participación de las citoquinas en el control de la brucelosis ha sido investigada mediante la inyección de citoquinas recombinantes o la inhibición de su actividad con anticuerpos monoclonales específicos. La IL-1, IL-12, y el TNF- $\alpha$  participan en las etapas tempranas de la infección. El IFN- $\gamma$  es una de las citoquinas más importantes en la resistencia contra la infección.

El TNF- $\alpha$  parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados. Se ha detectado tanto en brucelosis humana como en ratones infectados experimentalmente un incremento en la producción de IL-6, aunque su rol no está completamente definido. <sup>(33)</sup>

### 3.-Epidemiología

La especie equina puede jugar un papel importante en la transmisión de la brucelosis a otras especies animales, incluido el hombre. No es solo bajo esta forma clínica como se presenta la brucelosis equina, pues el microorganismo puede localizarse en otras articulaciones dando lugar a artritis y cojeras y se han descrito

casos de abortos <sup>(35)</sup> <sup>(26)</sup> pero no son infrecuentes las ocasiones en las que entre bacteria y hospedador se instaura una relación de equilibrio que da lugar a una infección larvada asintomática.

No existe un criterio unánimemente aceptado en cuanto al título aglutinante que marca la positividad de infección en esta especie, razón por la cual hay una amplia variación en los datos; reaccionantes positivos, diversidad a la que contribuyen también la falta de uniformidad en el antígeno empleado y la variación en el tipo de caballos examinados. <sup>(14)</sup>

Las vías de eliminación de las Brucelas en los individuos afectados son la leche, semen, heces, orina y las descargas uterinas. Las bacterias se encuentran en el útero durante la preñez, durante el periodo de involución uterina y, con poca frecuencia durante un tiempo prolongado en el útero no grávido. A partir de hembras infectadas se excretan Brucelas desde el útero en las pariciones normales que siguen a un aborto. La infección secundaria contribuye a la infertilidad y puede prolongar el periodo de involución y la presencia de *B. Abortus* en el útero y sus descargas.

La transmisión natural o directa de la enfermedad es por ingestión de los microorganismos, que pueden estar presentes en gran número en los fetos abortados, en las membranas fetales y en las descargas uterinas, se puede ingerir alimentos o agua contaminadas, o por lamer los genitales contaminados de otros animales o los fetos abortados recientemente. La transmisión venérea desde especímenes infectados a sensibles, en los servicios naturales puede ocurrir pero es rara. Las Brucelas pueden entrar en el cuerpo a través de las membranas mucosas, las conjuntivas, en laceraciones y hasta a través de la piel intacta. Los vectores mecánicos, incluso el hombre y otros animales, pueden proporcionar un medio de difundir la infección.

La *Brucella*, es capaz de sobrevivir en el medio ambiente, fuera del hospedador, por períodos relativamente largos (Anexo, Tabla II). La relación entre especies de *Brucella*, vías de transmisión y patogenia, tanto en el hombre como en los animales, se detalla en la (Anexo, Tabla III).<sup>(15)</sup>

#### 4.-Patogenia

Las especies de *Brucella* son patógenas intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos, y de los mecanismos efectoros dependientes de anticuerpos; esto justifica la naturaleza crónica de la infección ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas tanto fagocíticas como no fagocíticas. Cuando estas bacterias ingresan al organismo pueden ser fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata.

Si no son eliminadas llegan por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes pudiendo desde allí invadir el torrente sanguíneo, donde son fagocitadas por los PMN y macrófagos circulantes y transportadas, de esta manera, a los diversos órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares.<sup>(30)</sup> Los mecanismos de ingreso de la bacteria a estas células no están suficientemente aclarados aunque se presume que el LPS y las proteínas de la membrana externa podrían participar en los mismos, mediante receptores tipo manosa o integrinas, respectivamente.

Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa<sup>(31)</sup> y en un factor de crecimiento conocido como eritritol, presente en tejidos placentarios animales, lo que explica la afección de *Brucella* por los mismos.<sup>(3)</sup> La supervivencia de *Brucella*

dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes <sup>(37)</sup> y a la producción de GMP (Guanosina 5' monofosfato) y adenina, que inhiben la fusión fagosome lisosoma, la desgranulación, la activación del sistema mieloperoxidasa-haluro y la producción del TNF- $\alpha$ . <sup>(7)</sup>

El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. En los mamíferos rumiantes y en el ganado porcino la manifestación clínica es el aborto. En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio, sistema nervioso).

## 5.-Manifestaciones Clínicas

El comportamiento clínico de la brucelosis es bien conocido y ha sido objeto de múltiples descripciones. La infección puede afectar cualquier sistema o tejido del organismo. La infección en la especie equina se manifiesta clásicamente por el llamado mal de cruz o bursitis del dorso con posterior ulceración y salida de material purulento. Esta forma de presentación es propia de zonas rurales mas que de urbanas, <sup>(26)</sup> quizás por la persistencia del agente entre los efectivos bovinos, no descartándose la posibilidad de infección de estos últimos a partir de equinos con ulceraciones brucelares en la cruz y nuca. <sup>(35, 26)</sup>

La enfermedad debida a *B. melitensis* es la más agresiva y la ocasionada por *B. suis* la que tiene mayor capacidad para producir abscesificación. El uso de la antibioterapia y el mayor desarrollo sanitario pueden modificar la presentación clínica referida en las descripciones clásicas y la sintomatología puede diferir según el entorno social en el que se desarrolle. La afectación de los órganos del sistema mononuclear

fagocítico, hepatoesplenomegalia y linfadenopatías y del osteoarticular es especialmente característica. El desarrollo de focalidades de la enfermedad se produce en más del 30% de los casos, frecuencia que se relaciona fundamentalmente con el tiempo de evolución de la enfermedad antes de iniciar la terapéutica antibiótica. La observación de un paciente con espondilitis, sacroiliitis, poliartritis o tenosinovitis, orquiepididimitis y meningitis linfocitaria deben plantear el diagnóstico diferencial de la brucelosis en nuestro medio. La observación de formas focales abscesificadas, como reactivación de una brucelosis antigua, consideradas muy raras en nuestros días, podrían ser proporcionalmente más frecuentes en los próximos años si los casos de brucelosis de reciente adquisición siguen disminuyendo y pueden plantear problemas diagnósticos a los médicos poco familiarizados con la enfermedad. <sup>(8)</sup>

Los gérmenes se localizan en los ganglios linfáticos del tracto digestivo, allí permanecen hasta que los animales lleguen a la madurez sexual y es entonces cuando migran a los órganos genitales, donde esperan condiciones favorables para reproducirse en abundancia. Estas condiciones se presentan cuando ocurre la gestación, ya que durante este proceso se produce eritritol, sustancia apetecida por los gérmenes y abundante en la placenta. <sup>(15)</sup>

## **Lesiones**

Abortos, el producto de estos generalmente esta cubierto por fibrina y pus, metritis purulenta y catarral, alteración de riñones y bazo, orquitis, artritis, bursitis (mal de la cruz)

## 6.-Diagnostico

### Diagnostico Laboratorial:

**Directo:** Cultivo en agar chocolate y tinción de gram con las muestras enviadas al laboratorio. (Feto, liquido del estomago del feto, moco vaginal, hígado)

**Indirecto:** Pruebas serológicas.

Prueba en Placa (Prueba de Rosa de Bengala)

Fijación de Complemento.

Elisa captura de anticuerpos.

Prueba de Ribanol

El diagnostico debe basarse en el examen bacteriológico o selorológico. B. Abortus puede aislarse a partir de la placenta pero más fácilmente del estomago y pulmones en el feto abortado. La mayoría de las vacas cesa de excretar el microorganismo desde el tracto genital cuando la involución uterina se ha completado. Las pruebas de aglutinación también pueden usarse para producir anticuerpos en la leche, suero lácteo y plasma. Más recientemente se ha desarrollado una prueba ELISA para descubrir anticuerpos en la leche y en el suero. ELISA también se ha usado para descubrir antígenos de brucella en la descarga vaginal. Las pruebas de las mucosidades vaginales también pueden tener valor diagnóstico. <sup>(15)</sup>

La prueba Rosa de Bengala es una prueba de aglutinación rápida muy eficaz, que se utilizó inicialmente como prueba de cribado al permitir una aproximación diagnóstica en pocos minutos. No obstante, la experiencia práctica acumulada le ha concedido un protagonismo que va más allá del correspondiente a una simple prueba de cribado. El medio ácido en el que se efectúa la prueba favorece considerablemente la expresión del componente aglutinante de los anticuerpos. Su sensibilidad y especificidad para identificar anticuerpos aglutinantes anti-*Brucella* es muy elevada, de tal forma que solo

excepcionalmente resulta negativa en la fase aguda de la infección y con muy poca frecuencia en las fases evolucionadas o crónicas de la enfermedad.<sup>(8)</sup>

### **Medidas de prevención control profilaxis.**

#### **Profilaxis:**

1. Para declarar libre a un país de brucelosis realizar dos pruebas consecutivas con un intervalo de 6 meses y se declaran libres si las dos dan negativa.
2. Si en la primera prueba de Rosa de Bengala da Positiva se debe realizar otra prueba a la misma.
3. Si da positiva a Ribanol y Positiva a Rosa de Bengala el animal es positivo.
4. Se repite la prueba dentro de 6 meses; Si es negativo a Rosa de Bengala no se manda a realizar otra prueba y se declara negativo, pero si es positivo a Rosa de Bengala y negativo a Ribanol el animal es negativo.
5. En países libres de la enfermedad se procede al sacrificio de cualquier animal positivo, la carne no puede ser consumida, se deben utilizar correctas medidas en el matadero se puede consumir si se retira la cadena ganglionar.

### **Normas Nacionales**

Lo contenido en la LEY BÁSICA DE SALUD ANIMAL Y SANIDAD VEGETAL Ley No. 291, Aprobada el 16 Abril 1998. Publicado en la Gaceta No. 136, del 22 Julio 1998.  
(21)

## **La brucelosis como zoonosis.**

La presencia de esta enfermedad en el ser humano depende directamente de la existencia de la enfermedad en los animales, que son quienes las transmiten al hombre.

Es una enfermedad con manifestaciones muy variables; agudas en algunos casos y crónicas en otros; tan leves en algunas oportunidades que la enfermedad puede pasar inadvertida, mientras en otros puede adquirir características graves. Algunas de las manifestaciones de la Brucelosis humana son: fiebre, escalofríos, sudores, dolores generalizados, dolores localizados en las articulaciones, dolor de cabeza, inapetencia, debilidad y desgano.

El contagio en el Hombre puede presentarse por las siguientes razones:

Contacto directo con fetos o secreciones uterinas.

Heridas que se contaminan con sangre o secreciones uterinas de animales enfermos.

En el momento del parto, al ser ayudadas por el hombre para permitir el nacimiento.

La Brucelosis en el hombre es curable cuando se la trata precozmente. De no ser así, el tratamiento suele ser largo y costoso.

## **Formas de Prevención**

Dado que la Brucelosis no se transmite de un ser humano a otro, la prevención de la enfermedad en el hombre depende de medidas higiénicas con los productos y

subproductos del ganado, como así también de protección frente al ambiente en el trabajo rural.

**Algunas recomendaciones son las siguientes:**

- Tomar siempre leche pasteurizada o en su defecto hervida 10 minutos.
- Utilizar guantes y botas cuando se realicen tareas con animales.
- Lavarse bien las manos y cumplir con las reglas de higiene general.
- No beber agua de fuentes dudosas sin hervirla o clorarla previamente.
- Consultar siempre al médico ante cualquier problema de salud.
- 

Fundamentalmente, la prevención de la infección en el hombre depende de la profilaxis y la eliminación de esta enfermedad en los animales, mediante la vacunación del ganado. <sup>(42)</sup>

## **VII.- HIPOTESIS**

El 10% de los caballos en estudios se encuentran infectados con brucelosis.

## VIII.-DISEÑO METODOLOGICO

### Ubicación del estudio.

Se realizó un estudio para determinar la seroprevalencia de brucelosis equina en caballos usados en tracción animal en la ciudad de León que se encuentra a unos 20 Km. de la costa pacífica en una posición geográfica de 12° 26' al norte (latitud) y 86° 53' al oeste (longitud) <sup>(22)</sup> En el que se tuvo como objeto de estudio la variable de análisis: seroprevalencia de brucelosis equina.

Se trabajó con una población de 300 caballos (universo), todos machos. Se calculó una muestra significativa, se realizó un muestreo aleatorio simple esto por condiciones económicas y capacidad laboratorial.

### TIPO DE ESTUDIO.

Estudio transversal. <sup>(38)</sup>

### Tamaño de muestra.

Para la determinación del tamaño de muestra, se realizó cálculo utilizando el programa Win Episcopo 2.0, determinación de porcentajes. A partir de una población de 300 equinos, con una prevalencia esperada de 10 %, un error aceptado del 5 % y un nivel de confianza del 95 %.

Obteniéndose un tamaño de muestra de 95 individuos, los cuales fueron muestreados en los distintos lugares y de forma proporcional de tal forma que todos

tuvieran la misma probabilidad de ser parte de la muestra o ser excluidos de la misma.  
(40)

## **MÉTODO**

### **Prueba de Rosa de Bengala (Tarjeta o Card-test)**

La prueba se basa en la inhibición de algunas aglutinaciones inespecíficas a PH bajo. Se emplea un antígeno corpuscular, de 8% de concentración celular en una solución tope a PH 3.65

El método tuvo su origen en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. En la actualidad existen firmas norteamericanas y europeas que lo comercializan con algunas variantes de nombres y equipos algunos de ellos amparados por patentes internacionales.

### **Reactivo Necesario**

Antígeno Rosa de Bengala

### **Técnica**

- Colocar 0,03ml de plasma o suero problema sobre uno de los cuadrados de la lámina de vidrio (o tarjeta de cartón, lámina de plástico, etc.)
- Colocar una gota (0,03ml) de antígeno Rosa de Bengala (de card-test) cerca de la gota del suero.
- Mezclar bien el suero y el antígeno utilizando un agitador o mondadientes distinto para cada muestra. la superficie ocupada por la muestra debe tener un diámetro de 23 a 24 mm.

- Hacer girar la lámina o tarjeta durante 4 minutos a razón de 10-12 movimientos por minuto. Esto se puede hacer en forma manual o con rotadores diseñados especialmente.
- El resultado de la prueba se lee a los 4 minutos sobre un fondo blanco. Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinación, que puede ser grandes o pequeña.
- La prueba es cualitativa, por lo que el resultado se informa como positivo o negativo.

### **Interpretación**

En animales que nunca fueron vacunados, la reacción positiva es un indicador de infección muy probable (6-8).

Es aconsejable utilizar la prueba como tamiz y someter los sueros que presentan algún tipo de reacción a una prueba confirmatoria como, por ejemplo, la de aglutinación lenta o la de fijación de complemento.

### **Precauciones**

El antígeno debe mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4° a 8° C.se debe evitar su congelación, porque queda inutilizado para la prueba.

Tanto el antígeno como el suero debe deben mantenerse a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de realizar la prueba.

Los goteros deben lavarse con agua destilada al terminar la jornada de trabajo.

## **TOMA DE MUESTRA DE SANGRE**

La sangre se extrajo de la vena yugular tras provocar su ingurgitación por presión digital. El lugar de punción se sitúa a nivel del tercio medio del cuello, se desinfecta la zona y se realiza venopunción con aguja calibre 18 desechable, en dirección primero longitudinal y luego perpendicular al vaso. Una vez tomada la muestra, vertirla en tubos de ensayo de 5 ml sin anticoagulante. <sup>(6)</sup>

## **MATERIALES**

1. Jeringas desechables de 10 ml.
2. Agujas desechables calibre 18.
3. Tubos de ensayo de 5ml con EDTA una gota al 10%.
4. Alcohol al 70%
5. Algodón.
6. Gradillas.
7. Vitaminas (extracto de hígado)
8. Guantes de látex.
9. Fichas de registro.
10. Axial.
11. Termo contenedor de muestras.
12. Pipeta.
13. Puntas de Pipeta.
14. Microbiales.
15. Papel Toalla.
16. Porta Objeto.
17. Palillos desechables.

## **IX.- RESULTADOS:**

1. Se determinó que la seroprevalencia de Brucelosis en Equinos es del 13 %, utilizando la prueba Rosa de Bengala.
2. Se establece que el 87.17 % de los reactores, están ubicados en la zona de la Terminal de buses de León, el restante 12.83 % esta ubicado en otras zonas pero con un fuerte contacto con la zona mayormente afectada.
3. El 12 % de los caballos destinados a la tracción se dedican al transporte de personas y materiales de uso diario en el hogar.
4. El 86.3 % de los caballos presentan un estado corporal bueno, sin que esto tenga un significado directo sobre los resultados.
5. El 91.3 % de los caballos analizados equivalentes a 274, presentaron lesiones en diferentes partes del cuerpo.
6. El 8.7 % de los caballos analizados, equivalentes a 26, no presentaron lesiones.
7. Por zona de trabajo, los ubicados en el PALI, presentaron la más alta proporción de reactores con 9.
8. Por zona de trabajo, los ubicados en Zafiro, Tramesa, Sutiava y Malinche, presentaron la más baja proporción de reactores con 2 en cada ubicación.
9. De la muestra obtenida, 95 especímenes, el 58.94 % de esta no reaccionó, mientras que el 41.05 si fue encontrado reactor, significando esto el equivalente a la prevalencia obtenida.
10. Se rechaza la hipótesis nula y se admite la hipótesis alternativa por el grado de significancia de los datos.

## **X.- DISCUSIÓN**

1. La seroprevalencia del 13 % utilizando la prueba Rosa de Bengala es significativa ya que introduce datos no existentes en esta población.
2. De acuerdo a diversos actores las lesiones vivas pueden entorpecer los resultados obtenidos a través de Rosa de Bengala, por tanto, en nuestro trabajo el 91.3 % de los caballos analizados equivalentes a 274, presentaron lesiones en diferentes partes del cuerpo, lo que hace necesario confirmar este resultado con pruebas mas específicas y sensibles.
3. Según la encuesta aplicada, todos los machos utilizados para la tracción en la ciudad de León son castrados, excluyéndose de esta forma la vía de transmisión sexual de la enfermedad.
4. La posibilidad de contagio entre equidos y de estos a sus manejadores principalmente a través del mecanismo de transmisión indirecto es una constante debido al estrecho contacto con ellos.

## **XI.- CONCLUSIONES**

1. Se confirmó la presencia de brucelosis en los caballos de tracción en la ciudad de León.
2. Se establece la seroprevalencia de brucelosis en caballos de tracción de la ciudad de León en 13 %, utilizando de prueba Rosa de Bengala.
3. Por zona de trabajo los caballos ubicados en el sector de PALI, presentaron la más alta proporción de reactores con 9.
4. Se rechaza la hipótesis nula y se admite la hipótesis alternativa por el grado de significancia de los datos.

## **XII.- RECOMENDACIONES**

1. Elaborar y cumplir un programa zoonosario para evitar las enfermedades el los animales y aquellas que puedan ser transmitidas al hombre.
2. Continuar la investigación durante todo un año, con frecuencia mensual para conocer mejor el comportamiento de la enfermedad.
3. Tomar muestras de sangre a los propietarios y manejadores de los caballos destinados a la tracción animal con el fin de descartar la presencia de brucelosis en humanos.
4. Capacitar a los propietarios para aumentar el conocimiento sobre el manejo de los caballos.
5. Establecer leyes que protejan la salud y el bienestar de estos animales.
6. Mejorar los arneses y la condición de los carretones para obtener un mejor rendimiento de los caballos en el trabajo.

### XIII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed K, Al-Matrouk KA, Martínez G, Oishi K, Rotimi VO, Nagatake T. Increased serum levels of Interferon- $\gamma$  and Interleukin-12 during human brucellosis. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(3): 425-7.
2. Aragón V, Díaz R, Moreno E, Moriyó I. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. J Bacteriol 1996; 178 (4): 1070-9.
3. Aréstegui MB, Gualtieri CS, Domínguez J, Scharovsky G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. Vet Mex 2001; 32(2): 131-9.
4. Ariza Cardenal J. Brucelosis. En: Farreras-Rozman, Medicina Interna. 13ra Edición. Barcelona: Mosby-Doyma libros S.A.; 1995, p. 2312-7.
5. Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Fossati CA. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. Vet Microbiol 1994; 41(1-2): 127-34
6. Bouda, Jan y Cols. 2003. Manual de prácticas de patología clínica. Primera edición electrónica. División de educación continua. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. Pág. 26-39.

7. Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'- guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. J Infect Dis 1986; 154(3): 464-70.
8. Cardinal Javier Ariza. Brucelosis. Aspectos actuales de principal interés. Servicio Enfermedades Infecciosas, C. S. U. de Bellvitge. 2001
9. Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6 (4): 627-9.
10. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, *et al.* Classification of *Brucella spp.* isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. Microbes Infect 2001; 3(9): 729-38.
11. Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet J, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. Vet Microbiol 2002; 90(1-4): 229-47.
12. Corbeil LB, Blau K, Inzana TI, Neilsen KH, Jacobson RH, Corbeil RR *et al.* Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. Infect Immun 1988; 56: 3251-61.

13. Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA. Observations of serological cross reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. Dev Biol Stand 1983; 56: 341-8.
14. Denny, H.R. A review of brucellosis en the horse. Equinee Vet, J. 5, 1-5 (1973)
15. Dueñas Garzon Luis Fernando. Mi página agropecuaria.
16. Goldbaum FA, Velikosky CA, Baldi PC, Mörtl S, Bacher A, Fossati CA. The 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella spp.*, an antigen useful for diagnosis, is a lumazine synthase. J Med Microbiol 1999; 48: 833-9.
17. Hoffmann EM, Houle JJ. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. Crit Rev Microbiol 1995; 21(3): 153-63.
18. Hoffmann EM, Houle JJ. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. Vet Immunol Immunopathol 1983; 5: 65-76.
19. Jiang X, Baldwin C. Iron augments macrophagemediated killing of *Brucella abortus* alones and in conjunction with interferon. Cell Immunol 1993; 148: 397-407.

20. Ko J, Splitter G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccines development for mice and humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 65-78.
21. La Gaceta No. 136, del 22 Julio 1998, LEY BÁSICA DE SALUD ANIMAL Y SANIDAD VEGETAL Ley No. 291.
22. Mapas de la ciudad de León, Nicaragua (INMONICA) [http://inmonica/m\\_leon.htm](http://inmonica/m_leon.htm).
23. Margni RA, Binaghi RA. Nonprecipitating asymmetric antibodies. Annual Review of Immunology 1988; 6: 535-34.
24. Margni RA, Binaghi RA. Purification and properties of non-precipitating rabbit antibodies. Immunology 1972; 22(4): 557-63.
25. Margni RA, Hajos S. Biological and physicochemical properties of purified anti-DNP guinea-pig nonprecipitating antibodies. Immunology 1973; 24(3): 435-43.
26. McCaughes, W.J. y W.R. Kerr. Abortion due to Brucella in a throughbred mare. Vet. Re. 80, 186-189 (1967)
27. Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, *et al.* Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J Bacteriol 1997; 179 (10): 3244-9

28. Moreno E, Speth SL, Jones LM, Berman DT. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect Immun* 1981; 31(1): 214-22.
29. Parma EA, Santisteban G, Margni RA. Analysis and in vivo assay of cattle anti *B. abortus* agglutinating and non-agglutinating antibodies. *Veter Microbiol* 1984; 9: 391-8.
30. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, *et al.* *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998; 66(12): 5711-24.
31. Pontow S, Kery V, Stahl D. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 1992; 137: 221-41.
32. Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, Weise C, Cloeckert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella spp.* *Infect Immun* 2003; 71(8): 4326-32.
33. Saunders BM, Liu Z, Zhan Y, Cheers C. Interleukin-6 production during chronic experimental infection. *Immunol Cell Biol* 1993; 71: 275-80.
34. Seco-Mediavilla P, Verger JM, Grayon M, Cloeckert A, Marin CM, Zygmunt MS, *et al.* Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein:

usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10(4): 647-51.

35. Shotridge, E.H. 2 cases of suspected brucella abortus abortium in mares. N.Z. Vet. J. 15, 33-34 (1967)

36. Stemshorn B, Nielsen K. The bovine immune response to *Brucella abortus* IV. Studies with a double immunodiffusion test for antibody against A2. Can J Comp Med 1981; 45(2): 147-53.

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

38. Thrusfield, Michael, Epidemiologia veterinaria. Editorial Acribia, S.A. Pag. 207. 1995

39. Wilfert CM. *Brucella*. En: Zinsser, Microbiología. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18 Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986, p. 764-71.

40. W. Thrusfield., C. Ortega, Dr blas Ignacio, I. Frankena, K. Nordhuizen, J. Win Episcopo 2.0 Improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet. Rec. (en prensa)

41. Zhan Y, Cheers C. Endogenous Interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 1995; 63(4): 387-9.

42. Zoonosis, <http://www.sanluis.gov.ar/> 29/07/200

# Anexos

Seroprevalencia de brucelosis en caballos destinados a la tracción en la ciudad de León en el año 2006.

**Tabla I.**

Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.

Especie	Hospedador	Biovariedad	Producción de H <sub>2</sub> S	Necesidad de CO <sub>2</sub>	Sensibilidad a los colorantes Tionina Fucsina		Agglutinación con sueros monoespecíficos A M R		
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos,	1	-	-	+	+	-	+	-
	ovino, cánidos,	2	-	-	+	+	+	-	-
	hombre	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	Bovinos,	1	+	+	-	+	+	-	-
	cánidos, hombre	2	+	+	-	-	+	-	-
		3	+	+	+	+	+	-	-
		4	+	+	-	+	-	+	-
		5	-	-	+	+	-	+	-
		6	-	-	+	+	+	-	-
		7	+	-	+	+	+	+	-
		8	-	+	+	+	+	+	-
		9	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos,	1	-	-	+	-	+	-	-
	hombre	2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	-	+	+	-
		5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre		-	-	+	-	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	Roedores		+	-	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	Ovinos		-	+	+	-	-	-	+
<i>B. maris</i>	Focas, leones								
	marinos, delfines, ballenas.								

Tabla II.

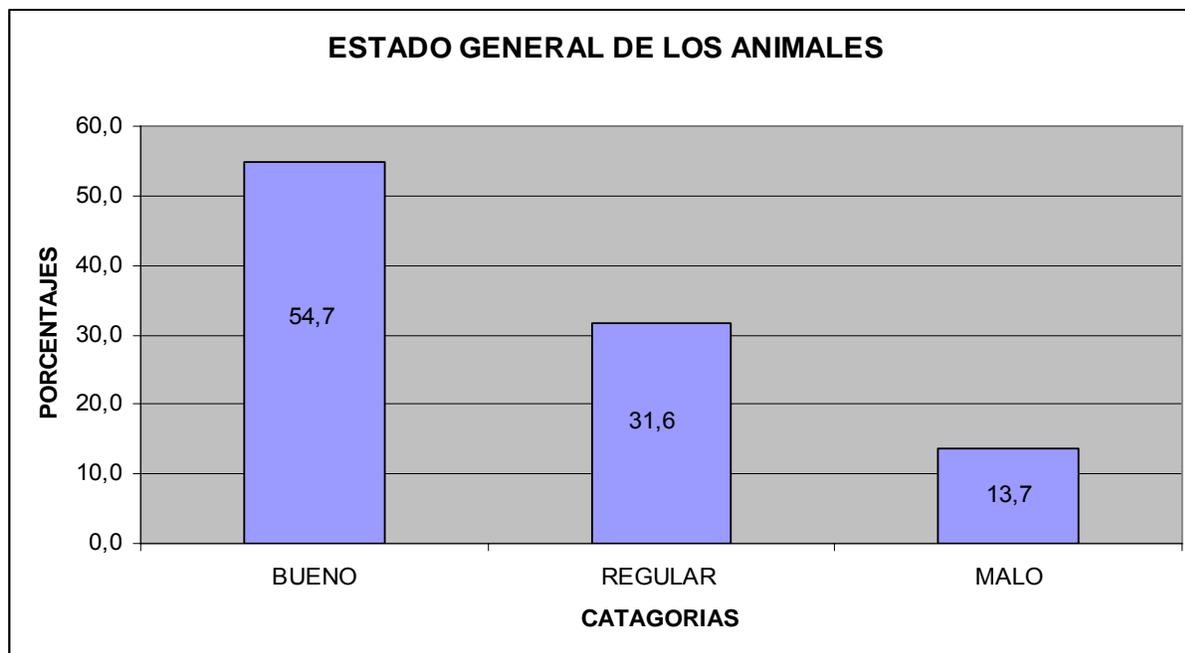
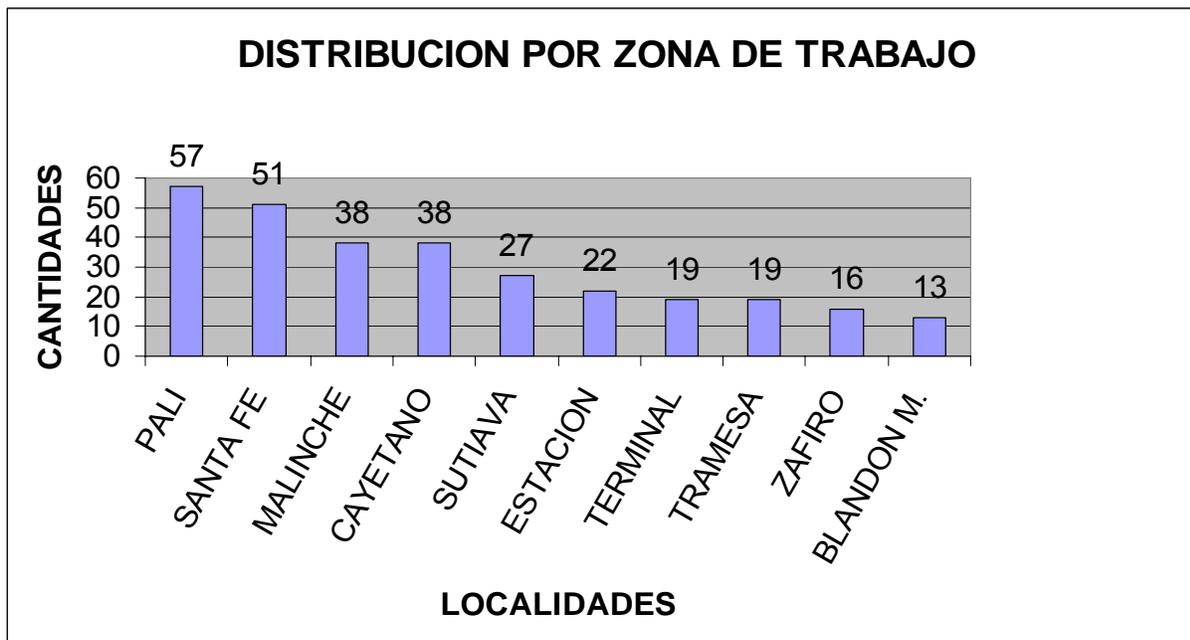
*Supervivencia de Brucela en el medio ambiente.*

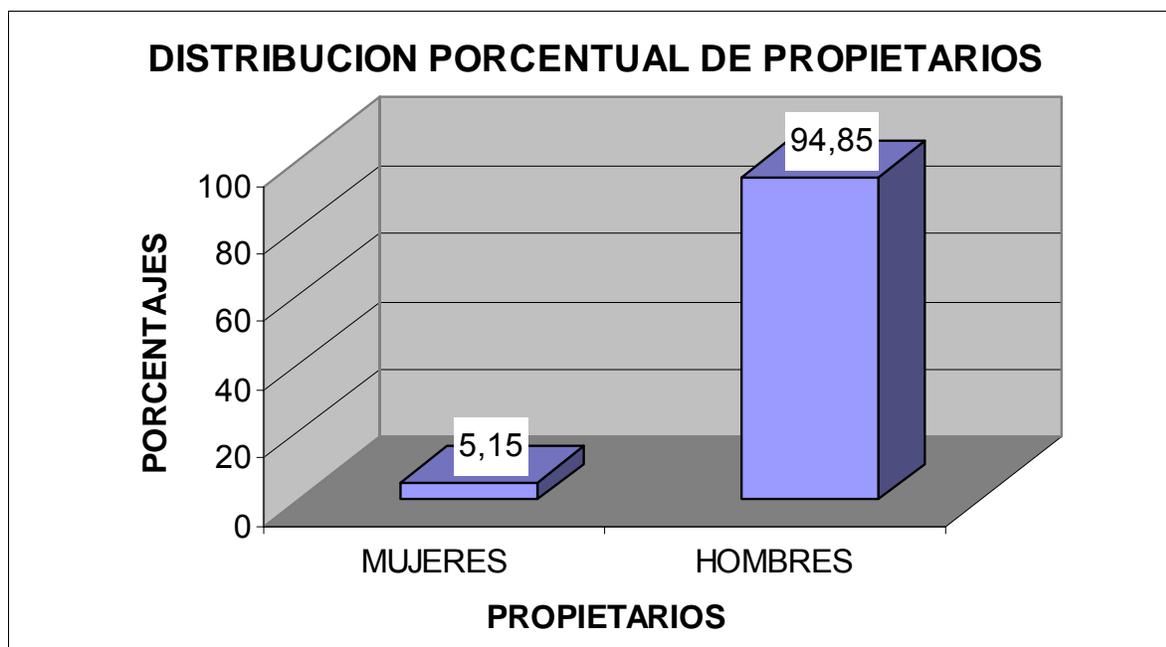
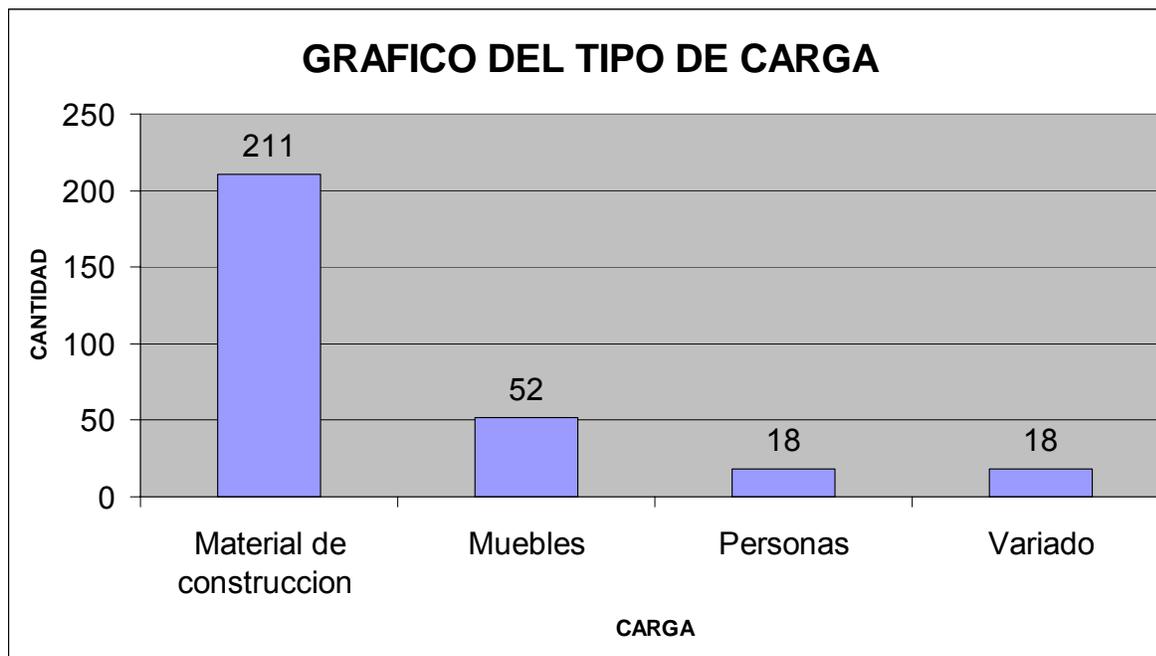
<b>Material</b>	<b>Tiempo de supervivencia</b>
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6,5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días.

Tabla III:

Huéspedes, especies de *Brucella*, vía de transmisión y patogenia.

<b>Huésped</b>	<b>Especie de <i>Brucella</i></b>	<b>Vías de transmisión</b>	<b>Patogenia</b>
Bovinos	<i>B. abortus</i>	Oral, nasal y conjuntival.	Abortos. Orquitis. Epididimitis. Ocasionalmente artritis.
Cerdos	<i>B. suis</i>	Oral y genital.	Aborto. Esterilidad. Orquitis.
Ovinos	<i>B. ovis</i>	Genital.	Abortos (poco frecuentes). Epididimitis.
Perros y otros cánidos	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. suis</i>	Oral y genital.	Abortos. Esterilidad. Epididimitis. Dermatitis escrotal
Hombre	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. suis</i>	Inoculación conjuntival. Inhalación. Cutánea. Digestiva.	Fiebre aguda e intermitente. Adenopatías. Hepatoesplenomegalia Complicaciones osteoarticulares,





**Distribución Porcentual de Lesiones en Caballos de Tracción de León.**

