

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



Trabajo de tesis para optar al título de Licenciado en Medicina Veterinaria

TEMA:

SEROPREVALENCIA ANTI-BRUCELLA ABORTUS TIPO IgM e IgG EN BOVINOS DE FINCAS LECHERAS DE TRES MUNICIPIOS DEL DEPARTAMENTO DE LEON

AUTORES

Br. Pablo Emilio Blanco Rivera

Br. Julio Vicente Pichardo Hernández

TUTOR

MSc. Christiane Duttmann

COLABORADOR:

MSc. José Luis Bonilla

LEÓN, SEPTIEMBRE DEL 2009.

RESUMEN

La presente investigación se realizó en 3 municipios (Achuapa, El Sauce y Malpaisillo) del departamento de León en el periodo comprendido 2008-2009, con el objetivo de determinar la seroprevalencia *anti-brucella abortus* tipo IgM e IgG en bovinos de fincas lecheras. En este periodo se tomaron muestras de sangre en 292 animales entre ellos machos y hembras mayores de 24 meses de edad, las que fueron procesadas y analizadas en el Centro Veterinario de Investigación (CEVEDI) de la UNAN-León para identificar animales reactivos a la prueba de Rosa del Bengala. Obteniéndose como resultado del estudio ningún reactor a la prueba.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de manera muy especial:

Al señor Jesucristo por ser el pilar fundamental en mi vida.

A mi madre

(Mercedez del Rosario Pichardo Hernández.)

A mi padre (Daniel Pichardo)

Y a mis hermanos (Claudio, Rosa y Danelia)

AGRADECIMIENTOS

En estas cortas líneas y de manera muy especial agradezco a Dios y a todos aquellos que ayudaron de alguna manera en la realización de este trabajo, y de los cuales su ayuda fue de gran importancia para poder finalizarlo.

A mis padres por ayudarme incondicionalmente, por quererme y por compartir en todo momento conmigo.

Mis más sinceros agradecimientos a mis maestros, Dra. Christiane Duttmann por haber sido mi tutora, al Dr, José Luis Bonilla por estar disponible las veces que le consulte y me brindo su valioso tiempo y conocimientos.

A Gladys y Brenda por tener la amabilidad de ayudarme durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

Al Dr. Daniel Morales por haberme permitido, trabajar con él por más de 2 años en los cuales me brindo su experiencia y en los cuales sus enseñanzas me ayudaran mucho en mi vida profesional.

A todos los compañeros que me ayudaron en la recolección de las muestras en particular a Alex Saldaña.

Finalmente a mis amigos con los cuales compartí buenos y malos momentos a todos gracias.

Julio Vicente Picardo Hernández

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, por su ejemplo de superación y valioso apoyo en todo momento desde el inicio de mis estudios en esta carrera.

A mis familiares y amigos que tuvieron una palabra de apoyo para mí durante mis estudios.

Pablo Emilio Blanco Rivera

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios maravilloso por guiarme y iluminarme el camino a seguir y por estar junto a mí en los buenos momentos y sobre todo en los malos momentos.

Quiero agradecer sinceramente a aquellas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para hacer posible la conclusión de esta tesis. Especialmente agradezco a mi tutora Dra, Christiane Duttmann por su asesoría y tiempo, gracias al Dr. José Luis Bonilla por sus ideas y recomendaciones respecto a esta investigación. Agradezco al personal del laboratorio a Gladys y a Brenda por colaborar en el procesamiento de las muestras a las dos gracias.

Gracias a mis compañeros espacialmente a mis amigos y colega Alex Saldaña por su gran ayuda y colaboración en la recolección de muestras.

Pablo Emilio Blanco Rivera

INDICE

Contenido	Paginas
I- Introducción	1
I.1- Antecedentes	3
I.2- Justificación	5
I.3- Hipótesis	6
II- Objetivos	7
III- Marco Teórico	8
III.1-Definición de Brucelosis	8
III.2- Definición del Género <i>Brucella</i>	8
III.3-Clasificación	8
III.4- Genética de <i>Brucella</i>	10
III.5- Antígenos de <i>Brucella</i>	10
III.6- Etiología	13
III.7- Epidemiología	14
III.8- Vías de contagio	15
III.9- Patogenia	17
III.9.1- Manifestaciones clínicas	19
III.10- Cuadro clínico en diferentes especies	19
III.10.1- Presentación de la enfermedad	20
III.10.2- Complicaciones	21
III.10.3- Inmunidad	22
III.10.4- Resistencia al medio ambiente	23
III.10.5- Vacunación de terneros con cepa S-19.	24
III.11- Diagnostico	25
III.12-Tratamiento	29
III.13- Control y profilaxis	30
IV- Material y Método	31
IV.1- Metodología de la técnica diagnostica	33
V- Resultados	36
VI- Discusión	39
VII- Conclusiones	40
VIII- Recomendaciones	41
IX- Bibliografía	42
X- Anexos	49

I- INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de los animales domésticos y silvestres que afecta ocasionalmente al humano constituyendo una zoonosis. La misma es producida por bacterias del género *Brucella*. Ocho especies han sido reconocidas: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotome* y *Brucellas que afectan a los mamíferos marinos entre estas se encuentran B. Pennipedialis y B.Ceti*. Pueden ser diferenciadas por los requerimientos de CO₂, producción de H₂S, susceptibilidad a fagos, antígenos de superficie y sensibilidad a colorantes. Afecta enormemente la economía pecuaria, constituyendo una seria perturbación en la marcha de las explotaciones ganaderas, por las pérdidas que ocasiona y las implicaciones en la salud pública (Kubuafor y col., 2000).

La enfermedad se caracteriza por tener una marcada tendencia a la cronicidad, curso lento y con cuadros clínicos que abarcan desde abortos, retención placentaria, artritis, esterilidad en machos e inflamación de órganos y tejidos. A menudo la infección persiste en la ubre y en ganglios (linfáticos regionales, supramamarios, etc.) desde donde vuelve a invadir el útero preñado. La ausencia de síntomas clínicos en una vaca después del primer aborto y la persistencia de la infección, permite que las vacas sirvan de reservorio y fuente de infección por mucho tiempo. La principal fuente de infección la constituyen los animales infectados que excretan gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de abortos, en la leche, y en menor cantidad en las secreciones genitales, por lo cual es de vital importancia el riesgo que corren las personas que trabajan en mataderos, veterinarios, ganaderos, y otras personas que de una u otra manera tienen contacto con animales enfermos. (Kubuafor y col, 2000).

El diagnóstico más efectivo es el directo y el molecular, el cual se basa en el aislamiento e identificación del microorganismo a partir de la leche, tomando muestras de la vagina con escobillones o bien tejidos del animal. Pero como no siempre se logra realizar el aislamiento y el método es complicado, el riesgo para el laboratorista es alto

y caro para aplicarlo en grandes campañas de diagnóstico, en la práctica se usa el método indirecto, el cual origina una reacción inmune serológica frente a antígenos específicos de *Brucella* spp. (Kubuafor y col, 2000).

Para poder interpretar adecuadamente un diagnóstico positivo se emplea más de una prueba serológica como: ELISA indirecto, TEST DE COOMBS indirecto, RIVANOL entre otras y además es necesario conocer la situación epidemiológica de la zona. Para obtener dichos resultados sería adecuado usar una prueba altamente sensible (Rosa de Bengala) y otra específica (ELISA), diagnóstico realizado de forma indirecto (Kubuafor y col, 2000).

En Nicaragua existe una red de vigilancia epidemiológica la cual dirige el Ministerio Agropecuario y Forestal (MAG-FOR) como entidad legal.

Aplicando las técnicas diagnósticas de ROSA DE BENGALA y ELISA indirecto) nos proponemos a través de este estudio observar la seroprevalencia de brucelosis bovina en fincas lecheras del departamento de León.

I.1- ANTECEDENTES

La prevalencia de brucelosis en Nicaragua es baja en comparación con los vecinos países de Centroamérica. En el 2004, el MAG-FOR realizó un estudio epidemiológico con resultados del 0.12% para brucelosis bovina (Boletín Epidemiológico MAG-FOR).

El MAG-FOR al ser el ente legal en el país este se encarga de certificar fincas libres o no de brucelosis bovina permitiendo de esta manera la comercialización de ganado en el territorio nacional. En el año 2005 se realizó un trabajo en la isla de Ometepe logrando certificar a Moyogalpa y Altagracia libres de brucelosis en bovina. Este programa de certificación se inició en el año de 1997 estructurándose un poco más en el 2004 lográndose certificar más de 750 fincas con un promedio de cincuenta vacas por finca (Contreras, 2000). Según datos del MAG-FOR se han certificado fincas libres de brucelosis bovina en los municipios de Rio Blanco, Paiwas y San Pedro de Lovago (Boletín Epidemiológico MAG-FOR-). En Nueva Guinea, el Almendro y el Coral se han trabajado 80 comarcas, de las cuales se han estudiado cerca de 520 fincas procesándose unas 71,121 muestras para *Brucella* (Boletín Epidemiológico MAG-FOR, 2005). En Nueva Guinea se trabaja con un laboratorio que dirige el INTA certificado por el MAG-FOR.

Se reportan datos de prevalencia en Costa Rica del 9.5%, El Salvador 1% en Guatemala 1% y Panamá con 0.50%. (Contreras, 2000). En América del Sur se han señalado las siguientes cifras de prevalencia: Bolivia, un 8,57%; Argentina entre 10 y 14%; Brasil 4,7% para algunas regiones; Colombia un 4,7%; Chile 7%; Paraguay con 7,5%; Ecuador 6%; Uruguay 0,5% (Bae J. 1999).

En Venezuela para el año 2002 se estimó una prevalencia de 10.5% y las regiones con el mayor porcentaje de animales reaccionantes fueron: Delta Amacuro (11%), Zulia (10%) Monagas (3,34%), Apure (2,76%), Táchira (2,65%), Mérida (1,33%), Trujillo (1,25%) (Bae y col, 2002).

En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) inició el control de la brucelosis bovina en 1975, como parte del Programa decenal de salud animal, y en 1982 inició el Sistema de Certificación de Predios Libres de brucelosis en las regiones ganaderas IV a X. El impacto del programa se evidencia, con la disminución de la prevalencia de la brucelosis bovina de 7% (1975) a 2.9%(1982). No obstante, la estabilización de la prevalencia (2.4% en 1991), preocupó a las autoridades del SAG razón por la cual en 1991 se inició un Programa de Erradicación de la brucelosis bovina en el país.

Para el año del 2006 se realizó un estudio en el matadero municipal de la ciudad de León, en el cual se examinaron 151 muestras de las cuales 5 resultaron positivas a brucelosis mediante las técnicas de Rosa de Bengala y Elisa obteniéndose una seroprevalencia del 3.3% (Lisette Campos y Berner Sánchez).

I.3- JUSTIFICACION

Según MAGFOR la prevalencia de brucelosis en el 2004 a nivel nacional era de 0.12% en el ganado bovino. Estos datos han sido obtenidos a través de pruebas como Rosa de Bengala y Rivanol. Es necesario señalar que en países vecinos reportan datos de prevalencia como Costa Rica 9.5%, Salvador 1%, Guatemala 1%, Panamá 0.50% (Contreras, 2000) mientras que en Nicaragua las autoridades del MAG-FOR arrojan datos de una prevalencia menor del 1%.

La política de comercio de la ganadería en el país ha permitido la importación de ganado de Panamá y otros países de la región con prevalencias de la enfermedad mayor que la de Nicaragua. Si la prevalencia obtenida es mayor a la reportada daría una pauta para que el programa de vigilancia epidemiológica mejorara para evitar un aumento de la prevalencia.

Por lo antes mencionado nos hemos propuesto realizar el presente estudio con el objetivo de conocer la seroprevalencia de brucelosis en bovinos adultos en 3 municipios del departamento de León de diferentes fincas lecheras, porque la hembra en fase reproductiva es la figura central de la diseminación de la enfermedad igual al semental del hato.

I.4- HIPOTESIS

HO: Probabilidad de que la prevalencia observada sea igual a la prevalencia esperada.

HA: Probabilidad de que la prevalencia observada sea diferente que la prevalencia esperada.

II- OBJETIVOS

II.1-General

Determinar la seroprevalencia de *Brucella abortus* en bovinos de fincas lecheras de tres municipios del departamento de León, 2008 – 2009.

II.2-Específicos

Detectar la presencia de anticuerpos *anti-Brucella abortus*, de tipo IgM e IgG en los bovinos seleccionados mediante la técnica de Rosa de Bengala.

Detectar la presencia de anticuerpos *anti-Brucella abortus*, de tipo IgG en los bovinos positivos a la técnica de Rosa de Bengala mediante la técnica de ELISA.

III- MARCO TEÓRICO

III.1- DEFINICIÓN DE BRUCELOSIS.

La brucelosis, también conocida como fiebre de Malta, es una enfermedad infecciosa que se presenta con episodios recurrentes de fiebre, debilidad, sudoración y dolores vagos. Es provocada por una bacteria llamada *Brucella*, que está en la sangre, las secreciones y la leche de vacas, cerdos, ovejas y cabras (Basner-Tschakarjan 2004).

En 1887 David Bruce aísla formas de micrococos en tejidos de bazo de soldados muertos en la Isla de Malta, y al cual se le llamó Enfermedad de Malta. De acuerdo con Hughes, en 1897, esta enfermedad había sido descrita por Hipócrates (AC 460). En 1897, el veterinario Bernard Laurits Fredrik Bang (Dinamarca) identifica un bacilo intracelular que causa aborto en bovinos y que denominó *Bacillus abortus*, la infección fue llamada Enfermedad de Bang (Basner-Tschakarjan 2004).

III.2- DEFINICIÓN DEL GÉNERO *BRUCELLA*.

El género *Brucella* es definido en relación con su composición del ácido desoxirribonucleico (ADN) y sus propiedades morfológicas, culturales y bioquímicas. El agente causal de la brucelosis es la bacteria *Brucella* spp. Se trata de un cocobacilo, aeróbico, Gram negativo. Infecta en forma primaria a los animales (Basner-Tschakarjan 2004).

III.3- CLASIFICACIÓN:

Se conocen 8 especies: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* y actualmente se han encontrado *Brucella Pennipedialis* y *B.ceti* que afecta a mamíferos marinos (Basner-Tschakarjan 2004).

III.3.1. *Brucella melitensis* biovar abortus 1:

Está distribuida mundialmente, tiene como hospedador definitivo el bovino al que le produce abortos, el hospedador secundario es el ovino, caprino, cerdo, caballo, humanos. Provoca abortos, orquitis, bursitis, fiebre de malta. Es el microorganismo implicado con mayor frecuencia en la brucelosis bovina, en España es poco frecuente, en humanos provoca granulomas no caseosos del sistema nervioso central (Basner-Tschakarjan 2004).

III.3.2. *Brucella melitensis* biovar suis1:

Con 4 biotipos afecta primariamente al ganado porcino, liebres, caribú, roedores, humanos (fiebre de malta). Produce abortos, orquitis, artritis, espondilitis e infertilidad. El biotipo 2 está difundido en Europa Central y Occidental. En el hombre se manifiesta con debilidad, con mayor duración y con un curso más grave (Basner-Tschakarjan 2004).

III.3.3. *Brucella melitensis* biovar malitensis1:

Con 3 biotipos, está distribuido en el mediterráneo, América, Oriente y Medio. Afecta al caprino y ovino (produce abortos), vacuno (abortos esporádicos) y otros como perros o roedores (excreción por la leche) y humanos (fiebre de malta) es la más invasiva y patógena (Basner-Tschakarjan 2004)

III.3.4. *Brucella melitensis* biovar canis:

Afecta a perros y humanos y posee distribución mundial (Fernández D, C Baldwin. 1995).

III.3.5. *Brucella melitensis* biovar ovis:

En América y Asia es estable, en el ovino produce una epididimitis, mortalidad perinatal y abortos esporádicos (Fernández D, C Baldwin. 1995).

III.4- GENÉTICA DE BRUCELLA.

El ADN de *Brucella* contiene un 58-59% de G + C (guanina y citosina) y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente $2,5 \times 10^6$ pares de bases (Allardent-Servent y col 1988); este tamaño es menor al de *Escherichia coli* ($4,7 \times 10^6$ pares de bases). Dos características genéticas de *Brucella* llaman especialmente la atención, en primer lugar, la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos, y en segundo lugar, la ausencia de plásmidos. Esta última característica refleja probablemente la adaptación a un nicho ecológico (el ambiente intracelular) estable y sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que se deriva de los plásmidos y que es propia de ambientes con gran cantidad de microbios (intestino, tierra, etc.). El género *Brucella* tiene ocho especies reconocidas, las que exhiben distintas preferencias por su huésped (Halling y col 2005) y muestran más de 94% de homología en su genoma (Halling y col 2005), lo que apoya la proposición de que las especies clásicas de *Brucella* son cepas de *Brucella melitensis* (Vergier y col 1995). Sin embargo, se ha encontrado polimorfismo en determinadas secuencias genómicas que coinciden con las especies clásicas e incluso con las biovariedades. Se estima, además, que el 8% del genoma de *Brucella* se destina a funciones necesarias para la sobrevivencia y la virulencia.

III.5- ANTÍGENOS DE BRUCELLA.

Desde un punto de vista antigénico en *Brucella* existen dos componentes fundamentales: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas (Hinsdill y Berman 1967).

III.5.1-Lipopolisacárido: El LPS es diferente entre cepas rugosas o lisas de *Brucella* (Mandell 1995). Se ha descrito que el LPS de cepa lisa, que contiene polisacárido O, probablemente juega un rol importante en la sobrevivencia intracelular, en comparación con una cepa rugosa que no tiene o tiene muy poca cadena O (Corbell 1997). La falta de una definición genética sobre cepas rugosas naturales, que son patogénicas para sus hospedadores, como *Brucella ovis* y *Brucella canis*, confunde tal interpretación. Sin embargo, se ha descrito en *B.ovis* y *B.canis* la presencia de LPS que es idéntico al encontrado en cepas mutantes LPS de *B. abortus*, mutantes que no tienen cadena O, pero tienen diferente capacidad de sobrevivencia dentro de los macrófagos (Allen y col 1998).

La cadena O del LPS es la estructura antigénica más expuesta de esta bacteria un homopolímero de aproximadamente 100 residuos de 4-formamido-4,6-didesoximano (Caroff y col 1984, Corbel 1997, Cloeckert y col 2002), componente inmunodominante en cepas lisas de *B.abortus*, provocando que animales infectados produzcan anticuerpos específicos contra este antígeno. Los anticuerpos producidos en ratones son principalmente de isotipos IgG2a e IgG₃, con baja producción de IgM (Aréstegui y col 2001). Estos anticuerpos representan un componente importante dentro de la inmunidad protectora contra *Brucella*, complementando la respuesta inmune mediada por células (Folch y Oñate 1995). La avidéz del LPS para unirse al receptor CD14 de los fagocitos mononucleares se debe al lípido A; esta interacción estimula en estas células la producción del TNF- α , interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8), los cuales son mediadores de la mayoría de los síntomas de choque séptico (Aréstegui y col 2001).

El LPS de *Brucella* se diferencia en estructura química y actividad biológica al LPS de bacterias enteropatógenas comunes, ya que no está estabilizado por cationes

divalentes; contiene una menor carga negativa y menor cantidad de ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico que el LPS de otras bacterias, disminuyendo así su susceptibilidad a la acción de péptidos catiónicos bactericidas (Folch y Oñate 1995). Las moléculas de manosa que presenta el extremo terminal del LPS de *Brucella* (cepa lisa) favorecen la adherencia a los fagocitos mononucleares del huésped, ya que éstos tienen los receptores de manosa (Aréstegui y col 2001) Además de los fagocitos mononucleares, las células de la placenta contienen gran cantidad de receptores de manosa, lo que sumado al tropismo de estas bacterias por un factor de crecimiento conocido como eritritol placentario bovino, aumenta las probabilidades de abortos en estos animales, debido a la presencia de la bacteria en ese tejido (Aréstegui y col 2001).

III.5.2-Proteínas: En estudios sobre componentes estructurales proteicos de relevancia en *Brucella* se han descrito proteínas de membrana externa, proteínas de ubicación citoplasmática y proteínas de choque térmico (Moreno and Moriyon 2001). Las proteínas de membrana externa han sido clasificadas en tres grupos : el **Grupo I** se relaciona con la biosíntesis de la propia envoltura celular y tienen un peso molecular entre 88 a 94 kDa; el **Grupo II** es equivalente a las porinas de otras bacterias Gram negativas, como Omp 2, OmpC y OmpF y tienen un peso molecular entre 35 a 40 kDa, finalmente, el **Grupo III** con peso molecular entre 25 a 30 kDa que interacciona fuertemente con el LPS (Moreno and Moriyon 2001). Estos tres grupos de proteínas de membrana externa son reconocidos por el sistema inmune durante el curso de la infección (Bae 1999).

Entre las proteínas citoplasmáticas de importancia destacan la proteína superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa. La SOD Cu/Zn forma parte del sistema de defensa antioxidante oxígeno gaseoso (O₂), contribuyendo a la sobrevivencia intracelular de *Brucella* (Aréstegui y col 2001). La proteína SOD Cu/Zn pertenece a la familia de metaloproteínas, clasificada en tres tipos (SOD Cu/Zn, SOD Mn y SOD Fe) dependiendo del metal que se encuentre en el sitio activo. La enzima catalasa ayuda a

la proteína SOD Cu/Zn a detoxificar el ambiente bacteriano, actuando sobre el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado al interior del macrófago después de la fagocitosis de la bacteria, transformándolo en agua y oxígeno (Aréstegui y col 2001). La expresión de estas enzimas favorecería la permanencia de *Brucella* en el interior del fagocito.

El rol de las proteínas de choque térmico en la patogénesis de *Brucella* es incierto. Se ha observado que en bacterias intracelulares se expresan niveles elevados de proteínas de choque térmico en el ambiente intracelular (Bae y col, 2002) estas se encuentran GroEL (60 kDa), GroES (10 kDa) y HtrA (60 kDa). Las proteínas GroEL y GroES son chaperonas relacionadas con el plegamiento correcto de proteínas, mientras que HtrA (High temperature requirement A stress response proteína) es una proteasa que degrada proteínas dañadas oxidativamente (Bae y col, 2002). HtrA protege a la bacteria intracelular del daño oxidativo y contribuye a la resistencia de *Brucella* a la destrucción por los fagocitos (Elzer y col 1996). La enzima UvrA repara las lesiones del ADN después del daño oxidativo, como mecanismo de protección bacteriano (Oliveira y col 1996).

III.6- ETIOLOGÍA

El género *Brucella* está formado por bacilos gramnegativos pequeños, inmóviles y aerobios, de crecimiento lento. Genéticamente, el género *Brucella* parece monoespecífico. La expresión "brucelosis humana", es más correcta que las denominaciones "fiebre ondulante" o "fiebre de Malta", que hacen referencia a una de sus características clínicas o a una localización geográfica, respectivamente. Desde el punto de vista médico, sanitario y económico, la brucelosis representa un problema de primer orden, fundamentalmente en España, donde es todavía endémica, suponiendo costes económicos muy elevados (Folch H, A Oñate. 1995).

Fue en el año 1861 en la mediterránea isla de Malta que se describe la enfermedad por primera vez, por Marston, veintiséis años después lejos estaba de imaginar Bruce que su nombre se inmortalizaría ante la historia tras obtener por primera vez del bazo de cuatro pacientes una cepa de *Brucella mellitensis* (Folch H, A Oñate. 1995).

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

Se conocen 8 especies: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* y actualmente se han encontrado *Brucella Pennipedialis* y *B.ceti* que afecta a mamíferos marinos. Los reservorios naturales principales para las distintas especies son: vacunos (*B. abortus*), caprinos (*B. melitensis*), porcinos (*B. suis*), ovinos (*B. ovis*), caninos (*B. canis*), roedores (*B. neotome*) y, además, la recientemente hallada en mamíferos marinos (*Brucella Pennipedialis* y *B.ceti*) (Basner-Tschakarjan 2004).

III.7- EPIDEMIOLOGÍA

Una hembra infectada es el medio más importante para la diseminación de la enfermedad, tanto para el rebaño al que pertenece como para otros rebaños donde se a movilizad el animal (Allardent-Servent 1998). La reacción serológica positiva en la brucelosis es tardía, puede aparecer hasta algunas semanas después de la infección, por lo que es probable que animales recientemente infectados puedan estar en periodo de incubación de la enfermedad en el momento de la compra, sin dar reacción en ese momento, aunque luego resulta reaccionante después de su introducción en la finca (Allardent-Servent 1998). Por lo tanto es importante realizar por lo menos dos pruebas consecutivas cada 30 días para animales sanos que van a ingresar al rebaño (Allardent-Servent 1998).

La enfermedad puede entrar al hato a través de terneras alimentadas con leche descremadas de fuentes contaminadas fetos abortados y envolturas fetales pueden ser movilizad de una explotación a otra por medio de perros, zorros, coyotes, como

también roedores y pájaros, según algunos autores (Allardent-Servent 1998). Los camiones que no han sido bien lavados y desinfectados son importantes para la diseminación de la enfermedad, de una finca a otra (Allardent-Servent 1998). El mercado y ferias de exposición son otros medios de importancia para el contagio de la infección (Allardent-Servent 1998).

La transmisión es a través de secreciones vaginales que contaminan ambientalmente, semen de machos (Allardent-Servent 1998). El paso a humano también es a través de la ingestión de leche cruda y quesos frescos y contacto con fetos, secreciones vaginales (Allardent-Servent 1998). Por eso se obliga a la pasteurización de leche en quesos frescos. La entrada principal en vaca es por la ingestión o vía genital. También es posible la entrada a través de mucosas oral, nasal u ocular. La eliminación fundamental es a través de órganos genitales a través de semen de macho o secreciones vaginales de hembras afectadas o abortos (Allardent-Servent 1998). También intermitentemente se elimina en leche, orina, heces y en secreción nasal esta última en menor cantidad. (Allardent-Servent 1998). La transmisión al hombre sobrevendría vía cutánea, ingestión respiratoria (sobretudo en cargas altas de *Brucella* en mataderos o laboratorios) o conjuntival (Allardent-Servent 1998). Por eso se hace protección de mascarilla, flujo laminar, gafas (Allardent-Servent 1998).

Vía alimentaria puede llegar a la población general, granjeros, veterinarios, personal de matadero y laboratorios. Los granjeros por manejo y manipulación de fetos, aerosoles, muñida y esquilado, los veterinarios por la manipulación de fetos, examen de animales, vacunación (viva atenuada) y sangrado, necropsias, en los mataderos por la matanza o por canales, en los laboratorios, por hacer la necropsia o por cultivos (Bae J. 1999.). La morbilidad puede dispararse hasta el 90% si no se interviniera. La letalidad, por sí misma no es letal la muerte llega por infección uterina y septicemia (Bae J. 1999.).

III.8- VIAS DE CONTAGIO

La vaca preñada, que se infecta y aborta es la que se encarga de diseminar al agente ya que en el momento del aborto o parto, la hembra libera al medio ambiente millones de bacterias a través del feto, envolturas fetales y flujo vaginal (Guzmán- Verri et, al. 2001). De esta manera se contaminan los pastos y aguas con *Brucellas*, posibilitando así que animales sanos se infecten:

- Al comer esos pastos o ingerir el agua contaminada.
- Cubiertas fetales, líquido amniótico, con gran cantidad de gérmenes
- Excrementos de animales recién nacidos, se excretan durante varias semanas.
- Secreciones vaginales luego del aborto.
- La leche, vía de importancia para la transmisión de la enfermedad.
- Puede haber secreciones en heces y secreciones nasales en pequeñas cantidades.
- Las cabras la eliminan frecuentemente a través de la orina.

III.8.1-Vía Respiratoria: Es la menos frecuente se da mediante la inhalación de materiales infectados disecados, polvo y partículas que transportan *Brucellas* penetrando por la mucosa del tracto respiratorio superior. Esta vía puede tener importancia durante el verano cuando los animales se reúnen en corrales y mangas (Guzmán I, E Andrews 2004).

III.8.2-Vía Digestiva: El riesgo para entrar en contacto con las *Brucellas* divide la población en dos grupos: el de bajo riesgo, población en general que la adquiere por el consumo de lácteos o sus derivados procedentes de animales enfermos y el de alto riesgo, constituido por personas cuya actividad esta asociada al contacto frecuente con animales enfermos y sus productos: pastores, ordeñadores, trabajadores de rastro, carniceros, veterinarios y trabajadores de laboratorios (Guzmán I, E Andrews 2004).

El contacto con materiales infectados (abortos, placentas, estiércol, etc.) es probablemente el mecanismo principal. La ingestión de leche o productos lácteos no pasteurizados de procedencia casera supone todavía un mecanismo importante de

contagio en algunas zonas de nuestro país (Guzmán I, E Andrews 2004). También puede transmitirse por la ingestión de verduras o frutas regadas con agua frecuentada por ganado infectado (Guzmán I, E Andrews 2004).

La *Brucella* puede ser transmitida de una mujer embarazada con brucelosis activa a su producto a través de la placenta provocando aborto o brucelosis en el recién nacido (Lopez.et al. 1991). La vía genital puede ser importante solo si se realiza inseminación artificial con semen contaminado, de lo contrario, la brucelosis bovina no es una enfermedad venérea (Lopez.et al. 1991). El semen de un toro infectado puede contener grandes cantidades de Brucellas pero sin embargo no contaminan a la vaca la razón es que el ph uterino de la vaca contribuye a destruir a las *Brucellas* (Lopez.et al. 1991).

III.9-PATOGENIA

La mayoría de los animales se infectan directamente a través de la mucosa oronasal, por ingestión de alimentos contaminados o por inhalación de polvo de los establos con microorganismos que los animales han secretado con la leche o los exudados vaginales después del aborto (Lopez.et al. 1991). *B. abortus*, además de infectar al ganado bovino, puede infectar a otras especies como búfalos, bisontes, alces, jabalíes, zorros, renos, camellos y animales marinos (Lopez.et al. 1991). Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada (Moreno, et. al 1981).

Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas (Lopez.et al. 1991). Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia retículoendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (Lopez.et al. 1991). En los fagosomas de los macrófagos, *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo

la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio (Guzmán- Berri y col 2001).

En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y la activación de una serie de pequeñas GTPasas (Guzmán- Berri y col 2001), tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Corbel 1997). En infecciones experimentales, en ratones, se ha observado que la infección tiene dos fases: durante las primeras dos semanas la bacteria se multiplica rápidamente; en la segunda fase, el número de bacterias se estabiliza hacia la quinta o sexta semana y luego decrece lentamente hasta desaparecer (Guzmán- Berri y col 2001). La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal de bovinos hace que estas bacterias también proliferen extensamente en trofoblastos de la placenta que rodean al feto (Guzmán- Berri y col 2001), lo que condiciona que la principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación, o el nacimiento de animales prematuros poco viables (Ficht 2003). En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo (Hausler y Koontz 1974).

En humanos la infección se produce a través del contacto con secreciones de animales infectados o consumo de leche cruda o queso contaminado. El consumo de carne no es una fuente de contaminación (Hausler y Koontz 1974). *Brucella* puede ingresar al organismo a través de lesiones de la piel mientras se manipulan animales infectados o sus desechos (Hausler y Koontz 1974). En países en que la infección por *brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente (Hausler y Koontz 1974), sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual (Fiori y col 2000). La enfermedad puede ser adquirida por exposición ocupacional de los trabajadores de mataderos, carniceros y veterinarios, al inhalar aerosoles contaminados o en viajes a lugares donde la infección es endémica (Hausler y Koontz 1974). Las infecciones asociadas al trabajo de

laboratorio representan el 2% de los casos y se ha informado que el período de incubación de la brucelosis adquirida por accidente en el laboratorio puede variar entre seis semanas a cinco meses (Fiori y col 2000).

III.9.1- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Dependerán del estado inmunológico del hato. Los síntomas clínicos de la Brucelosis son, principalmente en los machos orquitis y epididimitis de índole bilateral, aunque para algunos autores predominan las unilaterales. A veces, puede haber atrofia testicular. Las localizaciones más frecuentes son: ganglios linfáticos, útero, ubre, órganos genitales de los toros, bazo e hígado (Moreno, et. al 1981). En hembras, la sintomatología por excelencia es el aborto en cualquier fase de la gestación, aunque en ocasiones la gestación llega a término pero se observa elevada mortalidad perinatal, nacimientos débiles, repetición de celos e infertilidad (Moreno, et. al 1981).

La presencia de mastitis puede dar lugar a la presentación de abscesos. Las claudicaciones con articulaciones inflamadas, bursitis y tendinitis pueden ocurrir en cerdos de todas edades, tendiendo a formarse abscesos (Moreno, et. al 1981). La infección, que muchas veces se hace visible únicamente durante la gestación al producirse abortos esporádicos, se difunde después del período de partos sólo lentamente, adopta curso latente y con frecuencia pasa desapercibida, después de darse los abortos, pueden llegar a faltar por completo (Moreno, et. al 1981).

III.10- CUADRO CLÍNICO EN DIFERENTES ESPECIES:

III.10.1-Vacas: Básicamente aborto a partir de la segunda mitad de la gestación se caracteriza por retención placentaria el feto ya sale deformado y degenerado, aparece una inflamación fibrinopurulenta y necrótica de cotiledones y alteración fetal: edema, congestión pulmonar y hemorragias. La placenta se observa difusa y gruesa, los

cotiledones con áreas de necrosis, el feto edematoso y con petequias, contenido estomacal turbio la infección en la ubre es común e intermitente, los animales jóvenes son bastante resistentes a la *B. abortus*, pero su susceptibilidad aumenta con el desarrollo sexual y la preñez (Corbel M. 1997.).

III.10.2-Toro: En toros se produce orquitis con presencia de abscesos, inflamación del epidídimo y órganos accesorios reproductivos. La orquitis puede ser unilateral o bilateral. Semen proveniente de animales infectados transmite la enfermedad al usarlo en inseminación artificial; existen razas que son más susceptibles que otras (Corbel M. 1997.).

III.10.3-Oveja/cabra: Produce una epididimitis, mortalidad perinatal, abortos esporádicos (Corbel M. 1997.).

III.10.4-Hombre: Cuadro generalizado (debilidad, malestar, cefalea, dolores articulares, fiebre ondulante). También sudoración repentina con olor a paja mojada (Corbel M. 1997.)

III.10.1-PRESENTACION DE LA ENFERMEDAD

III.10.1.1-Aguda: Generalmente acompañada por fiebre alta, principalmente vespertina, con malestar general, dolor de cabeza, sudoración, artralgias, y dolores musculares (Corbel M. 1997.).

III.10.1.2-Subaguda: La forma subaguda (fiebre ondulante o fiebre de Malta) es la forma típica y clásica descrita en áreas endémicas. Se presenta con fiebre baja intermitente, frecuentemente con compromiso articular (artritis periférica, sacroileítis y/o espondilitis), alteraciones hematológicas (pancitopenia, trombocitopenia, anemia hemolítica), o daño hepático (hepatitis granulomatosa) (Corbel M. 1997.).

III.10.1.3-Crónica: En la forma crónica con más de un año de enfermedad, generalmente se presenta un cuadro afebril con mialgia, fatiga, depresión, artralgias, y otros. (Hausler y Koontz 1974)

III.10.2- COMPLICACIONES

III.10.2.1-Formas focalizadas o complicaciones

La brucelosis puede afectar a cualquier órgano o sistema, produciendo manifestaciones focalizadas de la enfermedad, que se deben considerar como verdaderas complicaciones. Las formas más frecuentes son: Tromboflebitis, Leucopenia.

Epididimoorquitis, Espondilitis y Artritis periférica especialmente en las caderas, rodillas y hombros. (Hausler y Koontz 1974).

	Signos clínicos
Articular Neurológico	Sacroileitis, artritis periférica, Espondilitis, osteomielitis, bursitis, tenosinovitis. Cefalea, intensa, meningoencefalitis, mielitis, depresión y psicosis, absceso cerebral, neuritis, depresión.
Genitourinario	Epidídimo orquitis lateral, nefritis intersticial, prostatitis y cistitis.
Cardiaco	Anormalidades valvulares, endocarditis, miocarditis, pericarditis. Hepatitis, colesistitis aguda, cirrosis tardía y abscesos, hepatitis granulomatosa, hepatitis difusa no granulomatosa.

Otras:	Incluyen abscesos esplénicos, tiroides o epidurales. Neumonitis, derrame pleural, empiema, colecistitis, uveítis.
Cutánea	Exantema (Macular, papular nodular petequial), eritema nodoso, vasculitis leucocitoclastica. Adenopatía hilliar, bronconeumonía, neumonía cavitada,
Pulmonares	

III.10.3- INMUNIDAD

Conocer la repuesta inmune de los bovinos ante la infección o vacunación con *brucella abortus* revierte gran importancia para el diagnostico y vigilancia de la enfermedad.

En el caso de la *B. abortus* fácilmente escapa de los efectos bactericidas de los anticuerpos y complemento en el plasma (Corbel M. 1997.). La inmunidad protectora depende principalmente de la respuesta mediada por células, en la cual la actividad bactericida de los macrófagos está aumentada por la activación de las linfoquininas, originadas por los linfocitos T (Folch H, A Oñate. 1995.). Los anticuerpos tienen efectos de opsonización, ayudando a la muerte de las bacterias intracelulares, pero sigue siendo una inmunidad pobre. Se ha demostrado que el germen se multiplica más lentamente en los macrófagos de terneros vacunados que en los no vacunados (Folch H, A Oñate. 1995.). Luego de una infección, las inmunoglobulinas IgM son las primeras en aparecer en el suero y su máximo alcanza cerca de las dos semanas para luego desaparecer al mes. La inmunoglobulina IgG aparece enseguida pero no excede a la IgM, y desaparecen a los seis meses promedio (Folch H, A Oñate. 1995.).

Aunque no ha sido posible dilucidar exactamente cuales son los mecanismos que llevan a la inmunidad adquirida frente a la brucelosis bovina, los animales infectados con cepas de campo desarrollan un cierto nivel de inmunidad, pero ésta no es capaz de eliminar la infección (Folch H, A Oñate. 1995.). Por lo general, los animales permanecen infectados de por vida.

Aparentemente la inmunidad adquirida a través de la infección sí es capaz de evitar abortos posteriores al primer o segundo aborto. Los anticuerpos, incluyendo aquellos contra el antígeno O, que se desarrollan después de la infección o de la vacunación con cepa 19, no son capaces de proteger a los bovinos contra la infección (Folch H, A Oñate. 1995.). La inmunidad que protege contra la infección es la inmunidad celular y no está relacionada a los niveles de anticuerpos. Esta inmunidad se puede producir con vacunas y se basa en el desarrollo de los linfocitos T que reaccionan específicamente con los antígenos de *Brucella* (Folch H, A Oñate. 1995.),

Existen elementos que diferencian la respuesta de inmunoglobulina en la infección de campo y durante la vacunación, en esta última también existen diferencias, principalmente relacionadas con la edad del animal en el momento de la vacunación (Folch H, A Oñate. 1995.). Para tratar sobre los aspectos anteriores nos basaremos en los resultados de Nielsen y colaboradores, el cual estudio empleando la técnica de ELISA, animales afectados artificialmente con una cepa de *Brucella abortus* y vacunados con la cepa B-19 (terneros y adultos) (Folch H, A Oñate. 1995.).

III.10.4-RESISTENCIA AL MEDIO AMBIENTE

En condiciones de sequía, ellas solo sobrevivirán si están contenidas en material proteico. En condiciones óptimas, las *Brucellas* pueden sobrevivir en agua corriente (de canilla), suelo húmedo, orina, fetos abortados, exudados uterinos y en tejidos congelados, son sensibles a radiaciones ionizantes, luz ultravioleta. La *Brucella* muere rápidamente con antisépticos usuales y por la pasteurización. Se destruye al hervir la leche a 60°C por 30 minutos. Sin embargo, puede permanecer viva en la leche contaminada en refrigeración hasta por 10 días, en el queso roquefort por 2 meses, en la mantequilla refrigerada por 4 meses. En el medio ambiente pueden sobrevivir en el agua de 10 a 70 días y en el polvo o en el suelo hasta por 10 semanas. (Folch H, A Oñate. 1995)

III.10.5-VACUNACIÓN DE TERNEROS CON CEPA S-19.

Se observó que los primeros anticuerpos en producirse en gran cantidad fueron los del tipo IgM (alrededor del día 5), seguido por los del tipo IgG1, producidos en igual magnitud al día siguiente. De 10 a 15 días después de la vacunación apareció la respuesta de IgG2 en una magnitud de aproximadamente el 50% de la respuesta de IgG1. La IgG2 fue seguida de una pobre pero sustancial respuesta de IgA en suero (Folch H, A Oñate. 1995). La respuesta de anticuerpos se prolongó con estas características hasta un periodo de 8 a 10 meses, a partir de este momento no fueron evidentes. Los animales adultos vacunados de la misma forma siguieron el mismo patrón inmunológico, sin embargo, dos aspectos fueron diferentes:

- La respuesta de anticuerpos fue prolongada, detectándose anticuerpos posteriores al año de vacunación.
- Una parte de los animales permanecieron persistentemente infectados por la cepa vacunal, en estos la respuesta de anticuerpos fue similar a la de aquellos animales con infección de campo.

En los animales que permanecieron crónicamente infectados la respuesta de IgG2 fue considerablemente baja, incluso indetectable en alguno de ellos, mientras que la respuesta de IgM e IgG1 fue de una gran magnitud y sostenida (Folch H, A Oñate. 1995). La carencia de anticuerpos IgG2, puede jugar un rol importante en la inhabilidad del animal para eliminar *B abortus* (Folch H, A Oñate. 1995).

III.11- DIAGNÒSTICO

III.11.1-DIAGNÒSTICO DIRECTO

III.11.2.1-Cultivo: El aislamiento de *Brucella spp.* Constituye el método diagnóstico definitivo. Suele obtenerse por hemocultivo o cultivo de médula ósea y, más raramente, por cultivo de líquido cefalorraquídeo, líquido articular, exudado purulento, etc. El medio clásico de Ruiz Castañeda, que utiliza una fase sólida y otra líquida, es el más apropiado para el diagnóstico. En la mayoría de los procesos agudos, tras incubar el medio 2-4 días, es posible observar en la fase sólida pequeñas colonias que se deslizan por el agar en forma que recuerdan las lágrimas de cera resbalando por la vela. Una pequeña proporción de casos presenta el crecimiento entre los 5-15 días, y sólo de forma excepcional, éste se retrasa hasta pasados 30-45 días. En los procesos agudos, incluso cuando la extracción de los hemocultivos se practica en fase afebril, el porcentaje de aislamiento oscila entre el 90-95% de los casos. En casos de fracaso terapéutico o reinfección este porcentaje no suele superar el 60% (Folch H, A Oñate. 1995).

En los últimos años, debido a la importante sobrecarga de trabajo, los sistemas manuales de hemocultivo han ido sustituyéndose por aparatos de lectura automática. El género *Brucella*, debido a su escasa producción de CO₂, lento crecimiento y baja actividad metabólica, se ha convertido en paradigma para la evaluación de la sensibilidad de estos nuevos sistemas (Folch H, A Oñate. 1995). De ellos se han

evaluado de forma conjunta tres: VITAL (bio Mérieux), BACTEC (Becton-Dickinson) y BACT/ALERT (Órganon Teknika), resultando ser el sistema BACTEC el más eficaz, capaz de detectar la presencia del microorganismo tras 3 a 5 días de incubación (Folch H, A Oñate. 1995). Cabe destacar que todos los aparatos estudiados presentan falsos negativos, circunstancia que obliga, en aquellas áreas donde la enfermedad es endémica, a hacer subcultivos a todos los hemocultivos con sospecha de brucelosis. El aislamiento de *Brucella spp.* a partir de hemocultivo suele ser la primera fuente diagnóstica de la enfermedad en áreas geográficas con muy baja incidencia (Folch H, A Oñate. 1995). En casos de muestras contaminadas (abscesos, restos placentarios, etc.) deben utilizarse medios selectivos de los que, si bien hay varios descritos, probablemente el más accesible y práctico para la mayoría de los laboratorios es el medio modificado de Thayer-Martin (Folch H, A Oñate. 1995).

III.11.2.2-Examen microscópico: Una vez observado el crecimiento en el medio difásico o cuando el aparato automático de hemocultivo detecta un posible crecimiento, la simple tinción de Gram permite hacer el diagnóstico presuntivo de la enfermedad (CloECKAERT A, M Grayon, 2000). *Brucella spp* presenta unas características tintoriales especiales: aunque no es una bacteria ácido-alcohol resistente, no sufre decoloración con ácidos débiles. Así mismo, también la tinción de Gram es peculiar: si el tiempo de exposición al alcohol-acetona es muy breve (simple arrastre por el porta del decolorante, en vez de tiempos de decoloración más prolongados), presenta una decoloración irregular, pudiendo observarse en la misma muestra la coexistencia de pequeños cocobacilos gramnegativos y grampositivos. No es extraño, en contra de lo que se cree, tener un diagnóstico presuntivo de brucelosis por hemocultivo en dos o tres días (CloECKAERT A, M Grayon, 2000).

III.11.2.3-Subcultivo y aspecto colonial: El subcultivo del medio difásico o del frasco procedente del aparato automático, en medio con agar-sangre o agar-chocolate, muestra el crecimiento, al cabo de 48 horas, de pequeñas colonias brillantes, de diferente tamaño y de color miel claro (CloECKAERT A, M Grayon, 2000). Si no se observan cuidadosamente las placas, en casos con crecimiento de escaso número de

colonias, se puede falsear erróneamente algún diagnóstico. Tras la tinción de Gram de estas colonias para observar su aspecto característico, se realizará la reacción de la oxidasa (positiva) y aglutinación con suero específico frente a *Brucella*, suficiente para identificar el aislamiento (Cloekaert A, M Grayon, 2000).

III.11.3-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Dada la extrema sensibilidad que muestra la detección de DNA bacteriano mediante PCR en las distintas muestras estudiadas, es muy probable que en los próximos años se aplique la PCR a muestras de enfermos con sospecha de brucelosis, permitiendo el diagnóstico de la enfermedad con criterios de certeza en aquéllos casos en los que hoy no podemos dar una respuesta precisa (Cloekaert A, M Grayon, 2000).

III.11.3.1-Diagnóstico indirecto: Las pruebas serológicas indican las titulaciones de anticuerpos específicos presentes en cada paciente (Cloekaert A, M Grayon, 2000). Las más utilizadas se comentan a continuación:

III.11.3.2-Aglutinación: En sus diferentes modalidades, es la prueba más utilizada debido a su rapidez y sensibilidad (Cloekaert A, M Grayon, 2000). El aumento significativo del título de anticuerpos es la base diagnóstica de la enfermedad.

III.11.3.3-Rosa de Bengala: Utiliza como antígeno en una suspensión bacteriana a la que se ha añadido el colorante rosa de bengala, enfrentándola al suero sin diluir del enfermo (Bae J. 1999.). Proporciona una aproximación diagnóstica en pocos minutos con una sensibilidad y especificidad muy altas. Presenta elevado grado de correlación con la seroaglutinación y, por su simplicidad, es muy útil como prueba de despistaje inicial o screening (Bae J. 1999.). Sus falsos negativos se limitan a enfermos con procesos de pocos días de evolución y a algunos casos de enfermedad de curso muy prolongado

III.11.3.4-Seroglutinación en tubo o placa con pocillos: Enfrenta diluciones crecientes del suero problema a una cantidad constante de *B. abortus*. Este antígeno reacciona tanto con anticuerpos de esa especie como frente a los de *B. mellitensis* y *B.*

suis, que son las tres especies responsables en la práctica de la totalidad de enfermos con brucelosis (Bae J. 1999.). El título positivo de 1/160 se considera, en un país endémico como España, el punto de corte en el diagnóstico de la enfermedad, no siendo raros los títulos de 1/640 o superiores en las fases iniciales de la enfermedad. Su interpretación requiere conocer los antecedentes del enfermo y valorar las características clínicas presentes puesto que, al inicio de la enfermedad o en casos muy avanzados de la misma, la prueba puede ser, como el Rosa de Bengala, negativa (Bae J. 1999.). Debido a que los anticuerpos responsables de la seroaglutinación son fundamentalmente de la clase IgM, lo habitual es que vayan descendiendo en el transcurso de 3-6 meses, con o sin curación de la enfermedad (Bae J. 1999.).

III.11.3.5-Prueba de Coombs: Es de gran interés para el diagnóstico de la brucelosis crónica. Se utiliza para demostrar la presencia de anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes, fundamentalmente IgG (Bae J. 1999.). El suero de Coombs (inmunoglobulina humana) se encargaría de facilitar la aglutinación de los anticuerpos no aglutinantes del suero problema, fijados a la suspensión antigénica de *B. abortus* (Anderson C, N Vasconcelos2001). El título obtenido es, por ello, como mínimo el de la aglutinación y generalmente es mucho más elevado, tanto más cuanto mayor es el tiempo de evolución de la enfermedad. Pueden persistir en ocasiones de forma prolongada y con titulación elevada, incluso en pacientes con tratamiento adecuado y buena evolución clínica (Anderson C, N Vasconcelos2001). Hay que citar como posibles falsos positivos las reacciones cruzadas con: *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* y *Yersinia enterocolitica* 09, patógenos raros en nuestro país (Basner-Tschakarjan 2004)

III.11.3.6-Seroaglutinación tras tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol: Es una modificación de la seroaglutinación en la que se usa solución salina al 0,85% con 0,1M de 2-mercaptoetanol (Basner-Tschakarjan). Este compuesto es capaz de destruir las moléculas de IgM, perdiendo éstas su capacidad aglutinante, sin interferir con las de IgG que son las que se cuantifican (Basner-Tschakarjan). Aunque se consideraba la persistencia de anticuerpos resistentes al tratamiento con 2-mercaptoetanol como

indicativa de actividad de la enfermedad, esta afirmación clásica es hoy muy cuestionable y en la actualidad prácticamente no se utiliza. En general, la práctica de la seroaglutinación y la prueba de Coombs conjuntamente, permiten el diagnóstico de la mayoría de los casos. La negatividad de ambas pruebas, salvo en los primeros días de la enfermedad excluye la brucelosis. La limitación más importante de las pruebas de aglutinación es que no permiten conocer el estado de actividad de la brucelosis (Basner-Tschakarjan).

III.11.3.7-Enzimoimmunoanálisis: Con estas técnicas podemos detectar la presencia de los anticuerpos específicos que seleccionemos (IgG, IgM o IgA), con unos valores excelentes de sensibilidad y especificidad (Anderson C, N Vasconcelos2001). El antígeno absorbido sobre placas de poliestireno es, fundamentalmente, el lipopolisacárido de *Brucellas* en fase lisa. Los anticuerpos IgM, por su rápida desaparición son valorables, pero no puede olvidarse que los anticuerpos IgG pueden persistir en sujetos curados. Aunque permiten conocer con una mayor precisión el perfil de las inmunoglobulinas en el curso de la enfermedad, tampoco ofrecen la posibilidad de establecer un criterio para discernir entre curación y evolución a cronicidad (Anderson C, N Vasconcelos2001).

III.11.3.8-Inmunofluorescencia indirecta: Presentan una mayor complejidad técnica sin aportar nada a los métodos anteriormente descritos, por lo que no suelen utilizarse (Anderson C, N Vasconcelos 2001).

III.12-TRATAMIENTO

No se conoce un tratamiento práctico.

La erradicación se basa en las pruebas regulares y eliminación de reactores positivos

III.13- CONTROL Y PROFILAXIS

III.13.1-OBJETIVO DE LA PROFILAXIS

Estas incluyen el aislamiento o eliminación de animales infectados, la eliminación de fetos abortados, placentas y secreciones uterinas, así como la desinfección de las zonas contaminadas con productos como: fenoles, halógenos, aldehídos etc. Es especialmente importante aislar a las vacas durante el parto. Las vacas incorporadas recientemente y que se encuentran en avanzado estado de gestación se debe mantener aislada hasta después del parto, ya que en ocasiones algunas vacas infectada no muestran serológica positiva hasta después del parto o aborto.

III.13.2-ESTRATEGIA DE CONTROL DE BRUCELOSIS BOVINA.

Un programa de erradicación por sacrificio necesita que todos los animales detectados como positivos mediante Rosa de Bengala y ELISA en un control diagnostico de rutina sean aislados y sacrificados con rapidez. (Folch H, A Oñate. 1995) Otro método es la vacunación aunque en Nicaragua no se utiliza porque la prevalencia es baja, mencionaremos las vacunas que se usan en otros países ya que las usan como estrategia de control. **B. abortus cepa 19** y **B. melitensis Rev-1** son vacunas vivas que se basan en cepas lisas atenuadas. Ambas pueden inducir grados variables de protección y ambas, también, estimulan la producción de anticuerpos frente a la cadena O lisa. La cepa de **B. abortus 45/20**, es una cepa rugosa con muy pequeña o ninguna capacidad de inducir anticuerpos anti-cadena O. Se desarrolló inicialmente como una vacuna viva, pero se desechó en esa forma por su tendencia a revertir hacia la virulencia y posteriormente se empleó, con cierto éxito, como vacuna muerta con adyuvante oleoso. La cepa **RB51** es una cepa atenuada, como lo indican los ensayos efectuados en ratón, cobayo, caprino y vacuno, de los cuales se elimina en un espacio de tiempo relativamente corto con capacidad abortiva pequeña o nula.

IV- MATERIAL Y MÉTODO

IV.1-Tipo de estudio

La presente investigación corresponde a un estudio descriptivo de corte transversal, el cual se realizó en un periodo de marzo 2008 – junio 2009.

IV.1.2-Lugar de Estudio

El estudio se realizó en fincas lecheras de tres municipios del departamento de León.

IV.1.3-Población de estudio y tamaño de la muestra:

La población total en estudio en los 3 municipios del departamento de León es de 62439 cabezas de ganado bovino. (CENAGRO 2003) Se tomó como población datos ofrecidos por el MAG-FOR distribuidos proporcionalmente en los 3 municipios del departamento de León.

Los cálculos para determinar el tamaño de la muestra se estimaron con el método Win Episcopo versión 2.0, tomando en cuenta de que la cantidad de bovinos muestreados en el periodo de estudio en las fincas de los 3 municipios del departamento de León es de 62439, con un error aceptado de 5% y una seroprevalencia esperada de 50% y con un nivel de confianza de 95%. El tamaño de la muestra calculada fue de 385, pero por causas económicas se decidió trabajar con 292 muestras que representa un error exacto de 5.72%.

IV.1.4-Selección y recolección de la muestra:

IV.1.5-Selección: La selección de las fincas lecheras se hizo por conveniencia y proporcionalmente. (En El Sauce hay mas ganado que en Malpaisillo y Achuapa) en 3 municipios del departamento de León (supervisión del MAG-FOR). Se muestrearon 10 fincas en El Sauce, 8 en Malpaisillo y 6 en Achuapa para un total de 24 fincas. Obteniéndose 12 muestras por finca de las cuales 11 fueron de hembras y 1 de un

semental por finca, las hembras fueron seleccionadas según los factores de inclusión, si no había síntomas se escogió al azar.

IV.1.6-Recolección: Al tomar la muestra se debe estar seguro de que no se ha administrado ningún antibiótico, sujetar al animal, emplear guantes y hacer una venopuncion previa desinfección de la zona. Recolectar la sangre con aguja vacuntainer en tubos al vacio sin anticoagulante e identificar debidamente cada muestra, se elimino adecuadamente el material utilizado para la toma de muestra y se enviaron al laboratorio en gradillas. Posterior en el laboratorio se centrifugó y se colocó el suero en micro viales rotulados y se guardó en congelación.

IV.1.7-Criterios intrínsecos: Vacas de carácter lechero de razas holstein, pardo suizo y de cruces con brahmán.

IV.1.8-Criterios extrínsecos: La forma de manejo de los animales es de pastoreo extensivo.

IV.1.9-Factores de inclusión: Se estudió la prevalencia en las hembras adultas mayores de 2 años y en sementales de la misma edad. Hembras con antecedentes de infertilidad, abortos, nacimientos de crías débiles y que mueran al poco tiempo de nacidos. Hembras con padecimiento de trastornos del aparato reproductor como por ejemplo metritis y piometras.

IV.1.10-Factores de exclusión: Animales menores de dos años, animales de aptitud cárnica, que no hayan iniciado lactación propietarios en desacuerdo con el estudio.

IV.1.11-Unidad de Análisis: Cada una de las muestras de sangre obtenida y procesada con Rosa de Bengala.

IV.1.12-Análisis Estadístico: El análisis estadístico de los resultados de la seroprevalencia se realizó con la prueba de inferencia sobre parámetros en el programa

de Epidat 3.1 Los datos y los resultados fueron procesados por medio de la base de datos SPSS para la obtención de los gráficos.

IV.1.13-Divulgación: La divulgación se realizara en defensa de tesis y se enviara al Ministerio Agropecuario y Forestal (MAG-FOR) por el sistema de vigilancia que ellos poseen.

IV.1.14-Limitaciones: Muestras perdidas por mal manejo, hemolisis y en algunos casos poca cantidad de suero en los microviales a utilizarse. Tamaño de la muestra a procesar, por poca cantidad de reactivos, factor tiempo, factor económico. Al seleccionar la muestra por conveniencia disminuye la precisión al igual que la representatividad aumentando de esta manera el sesgo en el estudio. No se aplicó la técnica de ELISA por falta del antígeno.

IV.1.15-Ventajas del estudio: Los 3 municipios donde se realizó el estudio nos permite que tomemos animales de diferentes zonas del departamento de León además contamos con personal del MAG-FOR que nos ayudo en los municipios que muestreamos.

IV.2- METODOLOGIA DE LAS TECNICAS DIAGNOSTICAS

IV.2.1-Procedimiento de la técnica de Rosa de Bengala

Sobre una placa de cristal cuadrículada se depositó 25 micro litros de suero y antígeno, posteriormente se mezclo con un agitador de cristal finalmente se movió la placa suavemente 6 veces en el mismo sentido, se dejo reposar durante 4 minutos y se procedió a la lectura de los resultados, comenzando por los sueros de referencia positivo y negativo.

IV.3-Materiales a utilizar:

IV.3.1-Muestreo:

1-Tubos de 16 x 100 mm con tapón de hule para la recolección de las muestras.

2-Tubos al vacío (VACUETTE) de 9 ml, 16 x100 mm.

3-Agujas descartables estériles de 18G x 1 ½ ”.

4-Guantes de látex descartables no estériles.

5-Gradillas de 6 x 12 plásticas.

6-Algodón absorbente.

7-Gabachas

8-Botas de hule.

9-Bolsa plástica.

10-Termo

11- Marcadores.

12-Masking tape.

IV.3.2-En el laboratorio:

13-Microviales.

14-Pipetas automáticas multicanal (1-200, 1-50 y 100-1000).

15-Puntas para pipetas automáticas de 50 y 100.

16-Viales plásticos

17-Agua destilada.

18-Centrífuga.

19-Centrífuga para microviales.

20-Refrigeradora.

21-.Reactivos biológicos:

22-Reactivos de Rosa de Bengala (antígenos de B. abortus).

V- RESULTADOS

De las 292 muestras tomadas y procesadas 2 no se tomaron en cuenta porque faltaban varios datos del animal. Empleando la técnica de Rosa de Bengala no se presentó ningún reactor a la prueba. La distribución del sexo y de la edad en el presente estudio se refleja en los siguientes dos gráficos.

Fig.1 Sexo de los animales muestreados en fincas de los 3 municipios del departamento de León.

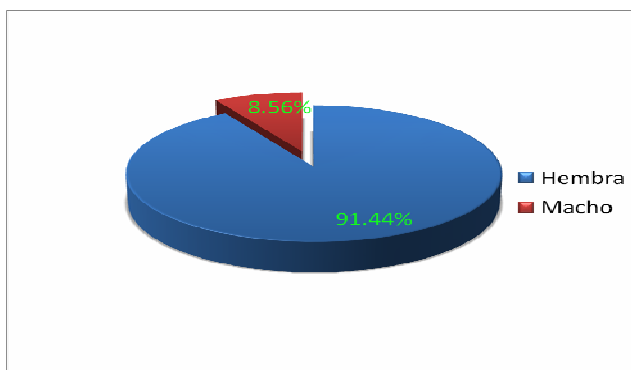
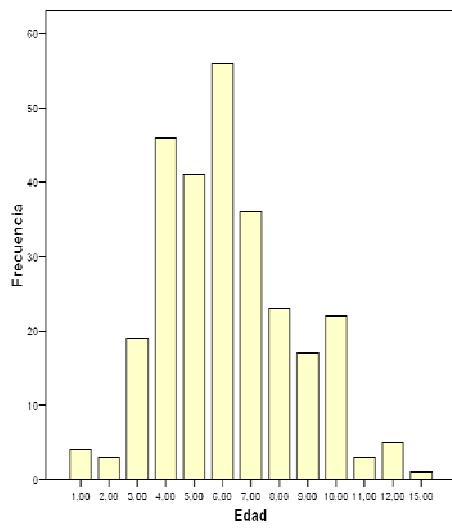


Fig.2 Edad de los animales en años cumplidos en fincas de los 3 municipios del departamento de León



Sintomatología clínica: De las hembras bovinas y machos muestreados reportaron muy pocos casos en las fincas tales como abortos, retención de placenta y metritis

Análisis estadístico:

Al realizar la inferencia sobre parámetros se concluyó que con una prevalencia observada de 0% con un intervalo de confianza IC_{95} (0.00 – 1.26) y una prevalencia desconocida de 50% deberíamos que indicar que este resultado nos rechaza la hipótesis nula por lo que hay un valor de $p= 0.000$. Pero consideramos de contrastar la prevalencia obtenida con los resultados del MAG-FOR del año 2004 (prevalencia 0.12%) que clínicamente sería más apropiada indicando un valor de $p = 0.108$ resultando que no hay diferencia significativa y se acepta la hipótesis nula.

VI- DISCUSIÒN

En nuestro estudio realizado en 24 fincas de 3 municipios del departamento de León trabajando con una muestra de 290 animales entre hembras y machos no se encontro animales reactivos a la tecnica diagnostica de Rosa de Bengala mientras que en el año 2004 el MAG-FOR presentó un reporte con una prevalencia de 0.12% a nivel nacional. Considerando la cantidad de los animales en el estudio del MAG-FOR (nivel nacional) comparada a nuestra muestra indica que las prevalencias observadas son igualmente muy bajas.

Comparando los resultados de nuestro estudio con el realizado por Lesby Bustamante y Roger Barreto, estudiantes de la UNA (Universidad Nacional Agraria) en la zona de San Pedro de Lovago, Chontales en el que se tomo una muestra de 3,410 animales adultos en el año 2005 obtuvieron 3 animales reactivos a Rosa de Bengala y 2 al confirmar con Rivanol obteniendo una prevalencia de 0.06% hay que resaltar: el tamaño de la muestra, las zonas que presentan un clima diferente por lo tanto la prevalencia que obtuvieron no muestra una gran diferencia con la prevalencia obtenida en nuestro estudio. Al igual que en el estudio realizado en el rastro municipal de la ciudad de León por Berner Sanchez y Lissette Campos en el 2006 obtubieron 5 animales reactivos a Rosa de Bengala y ELISA dando una prevalencia del 3.3%. La diferencia es que estos animales eran de descarte lo cual los hace mas sensibles a padecer la enfermedad.

VII-CONCLUSIONES

De un total de 24 fincas en 3 municipios de departamento de Leon (Achuapa, El Sauce y Malpaisillo) no encontramos ningun reactor a brucelosis bovina por lo que probablemente la seroprevalencia en estos lugares sea baja.

Posiblemente no se han introducido animales provenientes de zonas con presencia de la enfermedad, o probablemente las condiciones ambientales de la zona limitaron la sobrevivencia de la bacteria ya que su viabilidad es menor en climas secos.

Probablemente por la conformidad del estudio ya que la selección de la muestra se realizo por conveniencia lo que disminuye la precision al igual que la representatividad, aumentando de esta manera el sesgo en el estudio. Posiblemente estos factores influyeron al no tener ningun rector en las muestras analizadas.

VIII- RECOMENDACIONES

- Mejorar el diagnóstico a nivel nacional utilizando las técnicas de ELISA, PCR y FC por parte del MAG-FOR para obtener resultados confiables.
- Realizar estudios de prevalencia aleatoriamente en la población bovina indicada a padecer de brucelosis a nivel nacional.
- Establecer medidas de vigilancia epidemiológicas con el objetivo de impedir el incremento de reactores, para el mantenimiento de categoría de baja prevalencia de brucelosis en todos los municipios.
- Recomendamos a los productores que durante la compra de ganado bovino, asegurarse de que los animales procedan de fincas libres de brucelosis certificadas por el MAG-FOR.
- Concientizar a la población y personas que trabajen y/o manipulen productos y subproductos de origen bovino sobre el impacto para la salud pública, el rol que juegan otros animales como transmisores de la enfermedad (animales domésticos y silvestres) y las pérdidas económicas que ocasionaría la presencia de la bacteria en el hato.
- Recomendar a los productores que se aseguren de eliminar correctamente los restos de abortos para impedir la probable propagación de la enfermedad y reportar si más de un animal presenta aborto, retención placentaria de forma consecutiva y sin causa aparente.

IX- BIBLIOGRAFIA

Allardent-Servent A, G Bourg, M. Ramuz, M Pages, M.Bellis, G Roizes. 1988. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 170, 4603-4607.

Allen C, L Adams, T Fitch. 1998. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 66, 1008-1016.

Al-Mariri A, A Tibor, P Mertens, X de Bolle, P Michel, J Godfroid, K Walravens, J Letesson. 2001^a. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* 69, 4816-4822.

Al-Mariri A, A Tibor, P Mertens, X de Bolle, P Michel, J Godfroid, K Walravens, J Letesson. 2001^b. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect Immun* 69, 6264-6270.

Anderson C, N Vasconcelos, M Sievertzon, D Haddad, S Liljeqvist, P Berglund, P Liljeström, N Ahlborg, S Stahl, K Berzins. 2001. Comparative immunization study using RNA and DNA constructs encoding a part of the Plasmodium falciparum antigen Pf332. *Scand J Immunol* 54, 117-24.

Aréstegui M, C Gualtieri, J Domínguez, G Scharovsky. 2001. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet Méx* 32, 131-139.

Bae J. 1999. Generation of baculovirus-*Brucella abortus* heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants, and *B. abortus* superoxide dismutase and L7/L12 recombinant proteins. PhD thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA.

Bae J, G Schuring, T Toth. 2002. Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins use of vaculovirus recombinant-expressing whole insects cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Vet Microbiol* 88, 189- 202.

Baldwin C, T Sathiyaseelan, B Naiman, A White, R Brown, S Blumerman, A Rogers, S Black. 2002. Activation of bovine peripheral blood $\gamma\delta$ T cells for cell division and IFN- γ production. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 251- 259. Γδ

Basner-Tschakarjan E, A Mirmohammadsadegh, A Baer, U Hengge. 2004. Uptake and trafficking of DNA in keratinocytes: evidence for DNA-binding proteins. *Gene Ther* 11, 765-74.

Birmingham J, L Tabatabai, B Deyoe, E Jeska, M Nuessen. 1982. Generation of chemotactic factor for granulocytes and monocytes from serum by fractions of *Brucella abortus*. *Immunology* 46, 17-22.

Briones G, N Iñon de Iannino, M Roset, A Vigliocco, P Silva, R Ugalde. 2001. *Brucella abortus* cyclic β -1, 2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in Hela cells. *Infect Immun* 69, 4528-4535.

Boletín Epidemiológico Ministerio Agropecuario y Forestal (MAG-FOR).

Canning P, J Roth, L Tabatabai, B Deyoe. 1985. Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. *J Infect Dis* 152, 913-921.

Caroff M, D Bundle, M Perry, J Cherwonogrodzky, J Duncan. 1984. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect Immun* 46, 384-388.

Celli J, Ch Chastellier, D Franchini, J Pizarro-Cerda, E: Moreno, J Gorvel. 2003 *Brucella* evades macrophage killing vía VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198, 545-556.

Céspedes S, E Andrews, H Folch, A Oñate. 2000. Identification and partial characterization of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *J Med Microbiol* 49, 165-170.

Cloeckaert A, M Grayon, O Grepinet. 2000. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella spp.* Isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 835-839.

Cloeckaert A, N Vizcaino, J Paquet, R Bowden, P Elzer. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. *Vet Microbiol* 90, 229-47.

Corbeil L, K Blau, T Inzana, K Nielsen, R Jacobson, R Corbeil, A Winter. 1988. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 56, 3251-3261.

Corbel M. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3, 213-221.

DeTulleo L, T Kirchhausen. 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J* 17, 4585-4593.

Dieli F, F Poccia, M Lipp, G Sireci, N Caccamo, C di Sano, A Salerno. 2003. Differentiation of effector/memory Vd2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* 198, 391-397.

Donnelly J, J Ulmer, J Shiver, M Liu. 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 15, 617-48.

Donnelly J, M Liu, J Ulmer. 2000. Antigen presentation and DNA vaccines. *Amer J Resp Crit Care Med* 162, 190-193.

Douglas J, E Rosenberg, H Nikaido, D Verstrete, A Winter. 1984. Porins of *Brucella species*. *Infect Immun* 44, 16-21.

Eisenschenk F, J Houle, E Hoffmann. 1999. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* 68, 235-44.

Elzer P, R Phillips, G Robertson, R Roop II. 1996. The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Infect Immun* 64, 4838-4841.

Fernandez D, C Baldwin. 1995. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect Immun* 63, 1130-1133.

Fernandez D, R Benson, C Baldwin. 1995. Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice *Infect Immun* 63, 4029-4033.

Fernandez-Prada C, M Nikolich, R Vemulapalli, N Sriranganathan, S Boyle, G Schurig, T Hadfield, D Hoover. 2001. Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 69, 4407-4416.

Ficht T. 2003. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet Microbiol* 92, 213-223.

Ficht T, S Bearden, B Sowa, G Adams. 1989. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 57, 3281-3291.

Fiori P, S Mastrandrea, P Rappelli, P Cappuccinelli. 2000. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 38, 2005-2006.

Fleeton M, B Sheahan, E Gould, G Atkins, P Liljeström. 1999. Recombinant Semliki Forest virus particles encoding the prME or NS1 proteins of louping ill virus protect mice from lethal challenge. *J Gen Virol* 80, 1189-1198.

Folch H, A Oñate. 1995. Propiedades mitogénicas y caracterización de diferentes fracciones polisacáridas obtenidas de dos especies de *Brucella*. *Arch Med Vet* 27, 85-92.

Forestier C, F Deleuil, N Lapaque, E Moreno, J Gorvel. 2000. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol* 165, 5202-5210.

Frolov I, T Hoffman, B Pragai, S Dryga, HV Huang, S Schlesinger, CM Rice. 1996. Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11371-11377

Gándara B, A López, M Rigel, E Martínez-Romero. 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 39, 235-240.

Giambartolomei G, M Delpino, M Cahanovich, J Wallach, P Balde, C Velikovsky, C Fossati. 2002. Diminished production of T helper 1 cytoquines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella cytoplasmic* proteins in chronic human brucellosis. *J Infect Dis* 186, 252-259.

Golding B, D Scott, O Scharf, L Huang, M Zaitseva, C Lapham, N Eller, H Golding. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect* 3, 43-48.

Gurunathan S, D Klinman, R Seder. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann Rev Immunol* 18, 927-974.

Guzmán I, E Andrews, A González, R Rivers, A Cabrera, A Oñate. 2004. Una vacuna ADN para la brucelosis bovina. *Resúmenes del XIII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria, Valdivia*, pp. 30.

Guzmán-Berri C, E Chaves-Olarte, C Von Eichel-Streibe, I López-Goñi, M Thelestam, S Arvidson, J Gorvel, E Moreno. 2001. GTPases of the Rho subfamily are required for

Brucella abortus internalization in nonprofessional phagocytes. *J Biol Chem* 276, 44435-44443.

Halling S, B Peterson-Burch, B Bricker, R Zuerner, Z Qing, L Li, V Kapur, D Alt, S Olsen. 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genome of *Brucella melitensis* and *Brucella Suis*. *J Bacteriology* 187, 2715-2726.

Hausler W, F Koontz. 1974. Manual of Clinical Microbiology. 2nd ed. E. Lennette, E. Spaulding, J. Truant (eds.). American Society of Microbiology. Washington, D. C. Pgs. 295-301.

Helenius A, B Morein, E Fries, K Simons, P Robinson, V Schirmmacher, C Terhorst, J Strominger. 1978. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 75, 3846- 3850.

Hinsdill R, D Berman. 1967. Antigens of *Brucella abortus* I. Chemical and Immunoelectrophoretic Characterization. *J Bacteriol* 93, 544–549.

Kubuafor, D.K, Awumbila, B. y Akanmori, B.D (2000): Seroprevalence of brucellosis in cattle and humans in the Akwapin-South district of Ghana public health implications. : *Acta trop* Jul 21: 76(1):45-8.

Meck, A.H. (1993). Veterinary epidemiology: challenges and oportunities in research. *Prev. Vet. Med.* 18: 53-60.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Protección Y Sanidad Agropecuaria División de Ganadería manual de normas y procedimientos para el control y erradicación de la brucelosis bovina. Salud animal Managua 1996

Moreno E. Moriyoni I, 2001. The genus *Brucella* In: Dworkin, M., Falkow, S., Roseberg, E., Scheiferk H. Stackenbrand E. (Eds). The prokariotes Electronic Versión Springer New York.

Nelson, J. (1991). Systematic epidemiological method approach to the control of brucellosis. *En: Brucellosis epidemiology course*. Osorno, Chile.

O.P.S., Organización Panamericana de la Salud (1988). Vigilancia epidemiológica. Volumen 1. Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina.

Rolfe, D.C. y W.E. Sykes. (1987). Monitoring of dairy herds for *Brucella abortus* infection when prevalence is low. *Aust. Vet. J.* 64: 97-100.

Schukken, Y.H. and A. Brand. (1994). Health management in herds. *Vet. Res.* 25: 160-164.

U.S.D.A., United States Department of Agriculture. (1965). Supplemental test procedures for the diagnosis of brucellosis. Diagnostic Reagents Manual 65 E. National Veterinary Services. Laboratories. Ames, Iowa.

U.S.D.A., United States Department of Agriculture. (1992). Brucellosis eradication. Uniform Methods and Rules.

Vásquez, J. (1987). Prevalencia de brucelosis bovina en predios sometidos y no a un programa de vacunación con Cepa 19 en las comunas de La Unión y Río Bueno. Tesis, M.V. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

ANEXOS

Aborto por *Brucella*



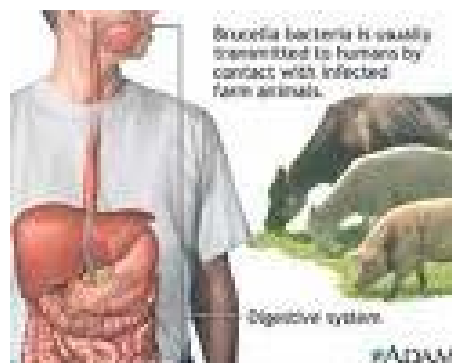
Retención placentaria



Lesiones cutáneas por *Brucella* en humanos.

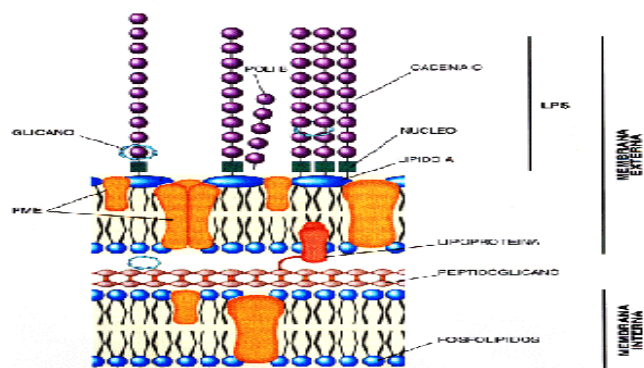


Vías de contaminación para el humano



Recolección de la muestra





Estructura de la Envoltura Bacteriana.

La envoltura celular esta formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio que contiene algunas enzimas, proteínas y un gel glicopeptídico denominado peptidoglicano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) considerado el principal antígeno; este consta de una parte glicolípídica (Lípido A) inserta en la membrana externa, y por tanto no expuesta en la superficie, y otra exclusivamente polisacárida dirigida hacia el exterior.



Técnica de Rosa de Bengala

KIT DE ROSA DE BENGALA



KIT DE ELISA



