

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Control y erradicación de *Brucela abortus* en establos
lecheros**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Jimmy Paul Calle Laureano

Lima-Perú

2009

A José y Elsa, mis padres y guías, les agradezco por su esfuerzo, constancia y el ahínco para que sus hijos sean buenos profesionales.

A Samanta y Carolina, por ser ellas mi razón de vivir y hacerme sentir emociones maravillosas día tras día.

A mi hermana Lupe, gracias a su apoyo y esfuerzo, siempre pendiente de nosotros.

A mis hermanos Jack, José y Lilian por ser los mejores compañeros que un hermano pueda tener.

Al Dr. Alfredo Delgado, por sus consejos y guía en nuestra difícil y a la vez satisfactoria profesión.

ÍNDICE

| CONTENIDO | Pág. |
|--|-------------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LA LITERATURA | 3 |
| 2.1. Situación de la ganadería lechera en el Perú | 3 |
| 2.2. Brucelosis bovina | 6 |
| 2.2.1. Historia | 6 |
| 2.2.2. Importancia económica de la brucelosis bovina | 7 |
| 2.3. <i>Brucella abortus</i> | 8 |
| 2.3.1. Características generales | 8 |
| 2.3.2. Morfología | 10 |
| 2.3.3. Genoma | 11 |
| 2.3.4. Estructura antigénica | 12 |
| 2.3.4.1. Lipopolisacárido | 12 |
| 2.3.4.2. Proteínas de la membrana externa (OMPs) | 15 |
| a. OMP mayores | 15 |
| b. OMP menores | 16 |
| 2.3.4.3. Proteínas citoplasmáticas | 16 |
| 2.3.4.4. Proteínas periplasmáticas | 17 |
| 2.4. Epidemiología de la brucelosis bovina | 17 |
| 2.4.1. Distribución geográfica | 17 |
| 2.4.2. Hospedadores naturales | 18 |
| 2.4.3. Situación de la enfermedad a nivel mundial | 18 |
| 2.4.4. Situación de la enfermedad a nivel nacional | 22 |
| 2.4.5. Transmisión | 24 |

| | |
|---|----|
| 2.4.5.1. Fuentes de infección | 24 |
| 2.4.5.2. Rutas de transmisión | 25 |
| 2.4.5.3. Factores de riesgo | 26 |
| 2.4.6. La brucelosis bovina como zoonosis | 28 |
| 2.4.6.1. La enfermedad en el hombre | 28 |
| 2.4.6.2. Grupos de riesgo | 31 |
| 2.5. Respuesta inmune | 33 |
| 2.5.1. Inmunidad natural | 33 |
| a. Macrófagos | 34 |
| b. Neutrófilos | 34 |
| c. Células asesinas naturales (NK) | 35 |
| d. Complemento | 37 |
| 2.5.2. Inmunidad adaptativa | 37 |
| 2.5.2.1. Linfocitos | 38 |
| a. Linfocitos CD4+ y CD8+ | 38 |
| b. Linfocitos $\gamma\delta$ | 39 |
| c. Linfocitos B | 39 |
| 2.5.2.2. Citoquinas | 40 |
| 2.6. Signos clínicos | 41 |
| 2.7. Fisiopatología | 43 |
| 2.8. Lesiones | 44 |
| 2.9. Diagnóstico de la brucelosis bovina | 45 |
| 2.9.1. Métodos directos | 46 |
| 2.9.2. Métodos indirectos o serológicos | 47 |
| a. Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT) | 48 |
| b. Aglutinación con y sin 2-Mercaptoetanol (2-ME) | 48 |

| | |
|--|----|
| c. Prueba del anillo en la leche | 49 |
| d. Reacción de Huddleson o aglutinación rápida en placa | 49 |
| e. Prueba Rosa de Bengala | 50 |
| f. Prueba del antígeno tamponado en placa (BPA) | 51 |
| g. Prueba de Coombs (Prueba de la antiglobulina) | 51 |
| h. Fijación de complemento | 51 |
| i. Inmunofluorescencia indirecta | 53 |
| j. Prueba de ELISA | 54 |
| k. Prueba de inmunodifusión en agar gel (AGID) | 55 |
| l. Prueba de polarización fluorescente | 56 |
| m. Prueba de flujo lateral IgM/IgG de <i>Brucella</i> (LFA) | 58 |
| n. Prueba de la brucelina | 59 |
| o. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de <i>Brucella abortus</i> | 60 |
| 2.10. Diagnóstico diferencial | 60 |
| 2.11. Prevención | 61 |
| 2.11.1. Higiene | 61 |
| 2.11.2. Cuarentena | 62 |
| 2.11.3. Vacunación | 62 |
| a. <i>B. abortus</i> cepa 19 | 65 |
| b. <i>B. abortus</i> cepa 45/20 | 67 |
| c. <i>B. abortus</i> cepa RB51 | 68 |
| 2.11.3.1. Comparación de la respuesta inmune entre las cepas 19 y RB51 | 70 |
| 2.11.3.2. Vacunas sectorizadas o de subunidades | 71 |
| a. Vacunas de ADN | 72 |

| | |
|--|-----|
| b. Vacunas de ARN | 73 |
| 2.11.3.3. Vacunas subcelulares | 73 |
| 2.12. Control y erradicación de la brucelosis bovina | 74 |
| 2.12.1. Principales medidas de control de brucelosis a nivel internacional | 76 |
| 2.12.2. Principales medidas de control de brucelosis a nivel nacional | 80 |
| 2.12.3. Legislación sobre brucelosis bovina | 81 |
| 2.12.4. Pruebas obligatorias | 83 |
| 2.12.5. Control del movimiento animal | 84 |
| 2.12.6. Programas de control progresivo | 84 |
| 2.12.7. Redes de laboratorios para el control progresivo | 85 |
| 2.12.8. Vigilancia epidemiológica de la brucelosis | 85 |
| 2.12.9. Estrategias de erradicación | 87 |
| 2.12.10. Estudios realizados sobre el control y erradicación de la brucelosis bovina | 87 |
| 2.13. Posibles estrategias de control y erradicación de brucelosis bovina en el Perú | 89 |
| 2.13.1. Estrategias de control durante un brote de brucelosis | 89 |
| 2.13.2. Estrategias de control en zonas endémicas | 91 |
| 2.13.3. Estrategias de control y erradicación en hatos levemente infectados | 92 |
| 2.13.4. Estrategias de control en hatos libres de brucelosis | 93 |
| III. CONCLUSIONES | 94 |
| IV. BIBLIOGRAFÍA CITADA | 95 |
| V. APÉNDICES | 106 |

LISTA DE CUADROS

| N° | Título | Pág. |
|------------------|---|------|
| Cuadro 1. | Principales características de la producción nacional de leche de vaca | 5 |
| Cuadro 2. | Algunas características bioquímicas y antigénicas de <i>B. abortus</i> que permiten clasificarla en biotipos | 9 |
| Cuadro 3. | Tiempo de supervivencia de <i>Brucella sp.</i> en diversos materiales | 10 |
| Cuadro 4. | Mecanismo de transmisión de brucelosis en el hombre y grupos de riesgo | 32 |
| Cuadro 5. | Principales características de las cepas bacterianas más utilizadas en la vacunación contra brucelosis bovina | 64 |

LISTA DE FIGURAS

| N° | Título | Pág. |
|------------------|---|------|
| Figura 1. | Producción nacional de leche de vaca y precio al productor | 4 |
| Figura 2. | Diagrama de la estructura antigénica de <i>Brucella abortus</i> | 13 |
| Figura 3. | Interacción de <i>Brucella sp.</i> con los fagocitos | 36 |
| Figura 4. | Representación de la respuesta inmune dirigida contra <i>Brucella sp.</i> | 42 |
| Figura 5. | Prueba Rosa de Bengala, donde se muestra la reacción de aglutinación | 50 |
| Figura 6. | Prueba de fijación de complemento | 53 |
| Figura 7. | Diagrama de ejecución de la prueba de polarización fluorescente | 58 |

LISTA DE APÉNDICES

| N° | Título | Pág. |
|--------------------|---|------|
| Apéndice 1. | Reglamento para el control y erradicación de la brucelosis bovina | 107 |

RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica producida por *Brucella abortus*, una bacteria intracelular facultativa. La enfermedad se caracteriza por producir abortos, retención de placenta, epididimitis, infertilidad y graves daños económicos a los ganaderos debido a las pérdidas de terneros y disminución en la producción de leche. Los signos de esta enfermedad no son patognomónicos y el diagnóstico depende de la demostración de *Brucella abortus* en el animal afectado ya sea por aislamiento de la bacteria o por la detección de anticuerpos o material genético. El primer paso para reducir el número de animales infectados y disminuir la incidencia suele ser la vacunación. El objetivo principal de un programa de vacunación sistemático y obligatorio es reducir la tasa de infección y obtener hatos resistentes a la brucelosis para luego emprender la erradicación. Sin embargo, esta enfermedad no ha podido ser erradicada en la mayoría de países a pesar de la aplicación de los programas de vacunación debido principalmente a que tales programas de control tienen una duración indefinida y necesitan ser mantenidos aun después de que haya sido alcanzado un bajo nivel de infección, a fin de que la enfermedad no resurja. Asimismo, en muchos países los métodos para el control y erradicación de la brucelosis bovina tienen un respaldo por la regulación y legislación gubernamental. En otros, sin embargo, no existen autoridades que realicen un control sanitario y legal. Por este motivo, en el presente trabajo se realizó una revisión completa de la enfermedad, las herramientas que tenemos para el diagnóstico, las estrategias de vacunación y los tipos de vacunas necesarios para la prevención y finalmente, se caracterizaron los programas de control y erradicación de la brucelosis bovina en los establos lecheros del país. El conocimiento recopilado nos permitirá la implementación de medidas coherentes para lograr más progreso en la prevención y futura erradicación de la brucelosis en el país y por consiguiente, beneficios económicos y mejor protección de la salud pública.

Palabras clave: Brucelosis bovina, diagnóstico, vacunación, control, erradicación

ABSTRACT

The bovine brucellosis is a zoonotic disease produced by *Brucella abortus*, a facultative intracellular bacterium. The disease is characterized to cause abortions, retention of placenta, epididymitis, infertility and severe cost-reducing damages to the cattle farmers due to losses in calves and decrease in the production of milk. The signs of this disease are not pathognomonic and the diagnosis depends on demonstration of *Brucella abortus* in the affected animal either for isolation of the bacterium or for the detection of antibodies or genetic material. The first step to reduce infected animals and to decrease the incidence often is vaccination. The principal systematic and obligatory objective of a program of vaccination is to reduce the rate of infection and to obtain resistant herds to the brucellosis for then to initiate the eradication. However, this disease could not be eradicated at the majority of countries in spite of the application of the programs of vaccination owed principally to which such programs of control have an indefinite duration to and that they need to be maintained even after it had been achieved a low level of infection, in order that the disease not reappear. In like manner, at many countries the methods for control and eradication of the bovine brucellosis have a back for the regulation and governmental legislation. In other countries, however, the authorities that accomplish a sanitary and legal control do not exist. For this motive, in the present work was performed a revision completes of the disease, the tools that we have for the diagnosis, the strategies of vaccination and the necessary types of vaccines for prevention and finally, we characterized the programs of control and eradication of the bovine brucellosis at the milky herds of the country. The compiled knowledge will allow us to the implementation of coherent measures to achieve more progress in prevention and future eradication of the brucellosis at the country and consequently, cost-reducing benefits and better protection of the public health.

Keywords: Bovine brucellosis, diagnosis, vaccination, control, eradication

I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una zoonosis infecto-contagiosa producida principalmente por *Brucella abortus*, una bacteria intracelular facultativa. La enfermedad se caracteriza por producir abortos, retención de placenta, orquitis, epididimitis e infertilidad. Sin embargo, estos signos clínicos no son patognomónicos y el diagnóstico depende de la demostración de *B. abortus* en el animal afectado, ya sea por aislamiento de la bacteria o por la detección de anticuerpos o material genético (Rodríguez *et al.*, 1998; Corbel, 2006).

La brucelosis es una zoonosis considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la de mayor distribución mundial y supone un importante problema de salud pública especialmente en los países poco desarrollados (Garrido y Garrido, 2002). Las estimaciones oficiales sobre las pérdidas económicas anuales por brucelosis bovina en América Latina son de aproximadamente US\$ 600 millones, ocasionando graves daños económicos a los ganaderos debido a las pérdidas de terneros y disminución en la producción de leche (Dragui, 2002; Rivers *et al.*, 2006; Samartino *et al.*, 2007). Asimismo, la prevalencia de la enfermedad en los animales está correlacionada con la infección en humanos, lo cual explica la prioridad otorgada al control de esta infección en las actividades de los servicios de salud animal (Acha y Szyfres, 2003).

El primer paso para reducir el número de animales infectados y disminuir la incidencia de la enfermedad suele ser la vacunación en masa. El objetivo principal de un programa de vacunación sistemático y muchas veces obligatorio, es reducir la tasa de infección y obtener hatos resistentes a la brucelosis para luego emprender la erradicación. No obstante, esta enfermedad no ha podido ser erradicada en la mayoría de países en desarrollo a pesar de la aplicación de los programas de vacunación y otras formas de prevención, debido principalmente a que los programas de control utilizados tienen una duración indefinida y necesitan ser mantenidos aún después de que haya sido alcanzado un nivel de infección bajo para evitar que la enfermedad re-emerja (Radostits *et al.*, 2002; Corbel, 2006).

En muchos países, los métodos para el control de la brucelosis son respaldados por regulaciones y legislaciones gubernamentales, aunque en otros no existen autoridades que realicen un control sanitario y legal. Por lo tanto, los procedimientos para el manejo de los hatos lecheros infectados pueden variar extensamente. Por este motivo, en el presente trabajo se realiza una revisión de la literatura sobre la enfermedad, las herramientas que se tienen para el diagnóstico, las estrategias de vacunación, los tipos de vacunas necesarios para la prevención y finalmente, se describen los programas de control y erradicación de la brucelosis en hatos lecheros que se utilizan en diferentes partes del mundo.

Esta recopilación de información nos brindará una mejor perspectiva para la implementación de medidas coherentes con miras al mayor progreso en la prevención y la futura erradicación de la brucelosis en nuestro país, y por consiguiente, se lograrán mayores beneficios económicos y mejor protección de la salud pública.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Situación de la ganadería lechera en el Perú

La ganadería bovina constituye un importante sector en la economía del país, no sólo como fuente de alimento sino también como fuente de trabajo para la población. En nuestro país, el sector lechero se está integrando progresivamente a la economía global, caracterizada por exportaciones e importaciones privadas de productos y subproductos lácteos, menor intervención del gobierno y por las inversiones foráneas en la industria lechera (Gamarra, 2001).

El Perú tiene dos principales sistemas de producción láctea: al pastoreo y en estabulación, con el 78% de las vacas lecheras manejadas por los pequeños productores. Los grandes productores tienen tierras con gran valor agrícola, forraje de variable calidad y un precio de leche más alto, lo que favorece la implementación de mejores estrategias en alimentación y manejo del hato, mientras que los pequeños productores generalmente están localizados en tierras con bajo valor agrícola, inferior precio de la leche, sin acceso a agua y electricidad, y limitado conocimiento del apropiado manejo del ganado bovino (Gómez *et al.*, 2007).

El sector lechero del país tiene algunas fortalezas y oportunidades como por ejemplo la experiencia para manejar distintos sistemas de producción en costa,

sierra y selva; la capacidad de sobrevivir con adversas condiciones en control de precios o enfermedades y la capacidad de desarrollo de la ganadería bovina en condiciones ambientales muy variadas y alejadas de los puestos y centros de producción. Igualmente, el Perú tiene una potencial capacidad de producción y autoabastecimiento (Gamarra, 2001; Piskulich, 2001).

La población de bovinos en el país es de aproximadamente 4'990,000 animales con una tasa de crecimiento anual de 1.8% desde el año 2000; la proporción de vacas lecheras a nivel nacional es aproximadamente el 12.6% de esta población (598,800 animales) (FAO/AGAL, 2005) con un rendimiento promedio de 6.4 kg de leche al día por vaca. La producción promedio de leche fresca a nivel nacional es de 1,428.9 toneladas con un precio promedio de 0.91 soles el litro (MINAG, 2007) (Figura 1).

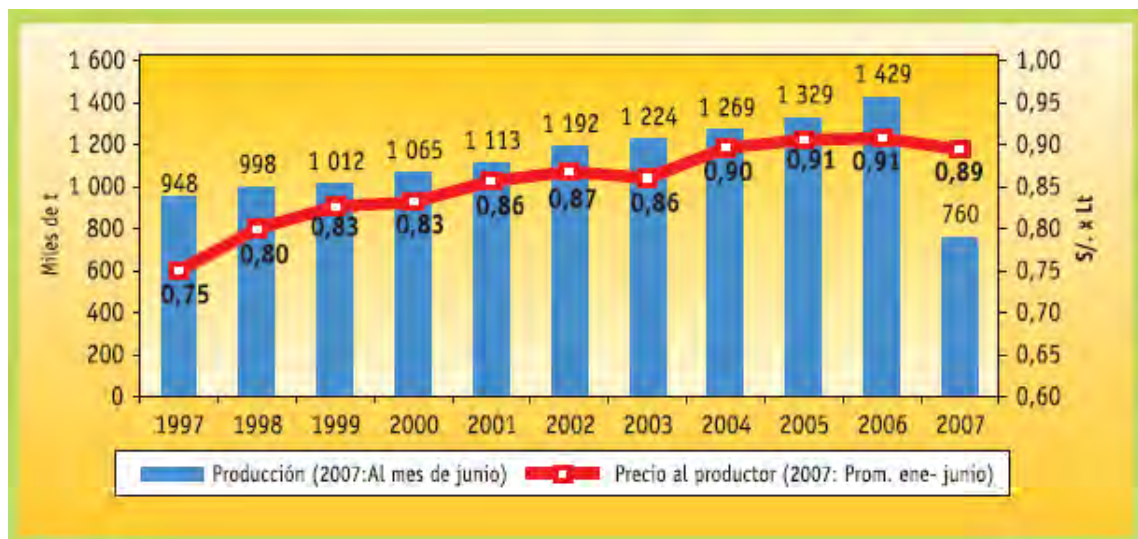


Figura 1. Producción nacional de leche de vaca y precio al productor.
Fuente: MINAG (2007)

La mayor producción de leche fresca se localiza en las cuencas lecheras de Arequipa (23%), Cajamarca (16%), Lima (16%) y La Libertad (5%) las que representan en total el 60% de la producción nacional (Gómez *et al.*, 2003). Las diferencias en la producción láctea en las distintas cuencas se deben a los diferentes sistemas de producción y las diferencias tecnológicas. Las zonas

cercanas a las cuencas lecheras presentan un nivel tecnológico superior con relación al resto del país (Gamarra, 2001).

En el Perú, la producción lechera está aumentando a un ritmo de 5% desde el año 1992, sin embargo, el consumo per cápita promedio de leche en Perú es sólo de 42 a 54 litros cuando lo recomendado por la FAO es de 120 litros por habitante al año (Olivera, 2001; FAO/AGAL, 2005).

Lima es el principal mercado para lácteos en el país. El producto más consumido es la leche evaporada seguida por la leche pasteurizada, leche condensada, leche en polvo y leche maternizada. Los derivados lácteos más consumidos son el yogurt, el queso, la crema y la mantequilla (Gamarra, 2001; Piskulich, 2001). El Cuadro 1 nos muestra las principales características de la producción de leche bovina en nuestro país.

Cuadro 1. Principales características de la producción nacional de leche de vaca

| Producto | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Leche fresca* | 948,0 | 998,1 | 1011,8 | 1065,2 | 1112,6 | 1192,0 | 1224,3 | 1269,5 | 1329,3 | 1428,9 |
| Litros/vaca | 4,9 | 5,3 | 6,3 | 6,6 | 6,8 | 6,3 | 6,4 | 6,3 | 6,3 | 6,4 |
| Precio/litro de leche | 0.75 | 0.80 | 0.83 | 0.83 | 0.86 | 0.87 | 0.86 | 0.90 | 0.91 | 0.91 |
| Derivados de leche | | | | | | | | | | |
| Leche evaporada* | 152,6 | 163,3 | 178,9 | 221,9 | 211,6 | 245,3 | 270,8 | 312,1 | 327,8 | 358,8 |
| Leche pasteurizada* | 21,3 | 32,2 | 42,8 | 43,7 | 48,7 | 55,3 | 56,7 | 57,7 | 63,1 | 58,0 |
| Yogurt* | 12,7 | 18,9 | 23,4 | 26,8 | 29,4 | 37,2 | 40,3 | 51,9 | 58,8 | 67,7 |
| Utilización de la leche | | | | | | | | | | |
| Fresca* | 243,1 | 242,7 | 301,9 | 436,6 | 473,2 | 559,4 | 549,4 | 643,4 | 695,8 | 758,0 |
| Polvo descremada* | 5,1 | 9,4 | 10,2 | 9,7 | 8,0 | 7,1 | 6,3 | 5,6 | 7,1 | 4,2 |
| Polvo entera* | 10,4 | 9,9 | 6,0 | 5,9 | 5,7 | 2,6 | 3,9 | 2,9 | 4,6 | 3,6 |

* En miles de toneladas

Fuente: MINAG (2007)

La cuenca lechera del sur del país es una de las principales abastecedoras de leche en el Perú. Más del 90% de la producción de esta cuenca es producida por Arequipa, con la irrigación de Majes produciendo más del 40% de la leche (Olivera, 2001). Esta región cuenta con una población bovina

lechera estimada en 86,200 animales, distribuida en alrededor de 9,500 hatos que producen un volumen estimado en 600,000 litros diarios. El 75% de esta producción se acopia en las plantas procesadoras de leche y la diferencia se comercializa informalmente (López *et al.*, 1994).

En Cajamarca se cuenta con un gran impulso del sector lácteo debido a la creación de una Cámara Láctea, una marca colectiva y sello de calidad de algunos derivados lácteos y educación y capacitación de los ganaderos en tecnología y gestión empresarial (Ecurra, 2001).

En las cuencas de Lima y La Libertad el sistema intensivo es común. Sus sistemas estabulados producen leche destinada a fines industriales y cuentan con tecnología medianamente moderna. Los niveles de producción son altos, con una producción promedio de 5,900 litros/vaca/campaña y 22 litros diarios por vaca en ordeño, utilizándose animales de alto valor genético, siendo la raza Holstein predominante (Gómez *et al.*, 2003).

En cuanto a los problemas del sector lechero de nuestro país, éste tiene una serie de debilidades y amenazas comenzando por las deficiencias tecnológicas, en nutrición, calidad de leche, transporte y manejo de la materia prima. Igualmente, contamos sólo con una pequeña estructura productiva, pocas tierras y ganado. El nivel de ingreso de los consumidores está limitado, el 75% de la producción nacional se consume como leche fresca. Más del 70% del negocio de lácteos se concentra en una sola empresa. Además, se tiene un veto sanitario por no ser un país libre de enfermedades como fiebre aftosa o brucelosis (Gamarra, 2001).

2.2. Brucelosis bovina

2.2.1. Historia

En 1886, David Bruce, un médico inglés, aisló un microorganismo más tarde llamado *Brucella melitensis*, el agente causal de la enfermedad llamada fiebre

malta. En 1895, Bernhard Bang, un médico danés, aisló *Brucella abortus* de bovinos que sufrían abortos contagiosos. En 1921, fue reportada la infección humana con el agente de la enfermedad de Bang en Rodesia por Beyan y en 1924 en el Reino Unido por Orpan. La estrecha relación taxonómica entre los agentes de la fiebre malta y la enfermedad de Bang fue finalmente reconocida por el trabajo de Alice Evans en Estados Unidos. Evans sugirió que los agentes caprinos y bovinos formaban un género distinto y propuso el nombre *Brucella* en honor a Bruce (Young, 2005; Dellamea, 2006).

2.2.2. Importancia económica de la brucelosis bovina

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países. La Organización Internacional de Epizootias (OIE) considera a la brucelosis como una de las enfermedades transmisibles de mayor importancia en bovinos debido a que afecta la sanidad y la producción de leche y además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos (Aréstegui *et al.*, 2001; Estein, 2006).

Asimismo, la brucelosis ocasiona significativas pérdidas monetarias debido a que provoca abortos, metritis, esterilidad temporal o infertilidad que alarga el período entre lactancias y el nacimiento de animales débiles, lo que interrumpe el programa reproductor (Garrido y Garrido, 2002; Radostits *et al.*, 2002).

Por otro lado, esta enfermedad constituye un importante problema para la salud pública ya que la mayoría de las bacterias del género son patógenas para el hombre, quien adquiere la infección por el consumo leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto directo con material infeccioso (Estein, 2006).

2.3. *Brucella abortus*

2.3.1. Características generales

La clasificación taxonómica sitúa al género *Brucella* en el dominio *Bacteria*, clase *Proteobacteria*, subclase *alpha*, grupo *Rhizobiaceae* y familia *Brucellaceae* (Garrido y Garrido, 2002). Desde el punto de vista taxonómico, todas las especies de *Brucella* deberían clasificarse como *Brucella melitensis* debido a lo puesto de manifiesto por los estudios de hibridación de ADN que demuestran que el género tiene una sola especie (Quinn *et al.*, 2002). Respecto a *Brucella abortus*, se reconocen mundialmente 7 biotipos (1 al 7) porque se suprimieron los biotipos 7 y 8, y el actual biotipo 7 corresponde al 9 de la antigua clasificación (Garrido y Garrido, 2002; Acha y Szyfres, 2003) (Cuadro 2).

Las bacterias del género *Brucella* son aerobias estrictas o microaerófilas, capnófilas, catalasa positivas, ureasa positivas; algunos biotipos requieren de un 5 a 10% de CO₂ para su aislamiento primario (Rodríguez *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 2002). Tienen un metabolismo oxidativo basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares (Castro *et al.*, 2005).

Brucella puede crecer en cualquier medio de cultivo pero lo hace mejor en medios selectivos. Para el aislamiento puede utilizarse un medio nutritivo adecuado, como el agar Columbia, suplementado con 5% de suero y agentes antimicrobianos apropiados (Quinn *et al.*, 2002). También pueden utilizarse el agar Triptosa, el agar *Brucella*, el agar suero-dextrosa, el agar tripticasa-soya, el agar glicerol-dextrosa y medios enriquecidos con aminoácidos, bases y vitaminas como la niacina (Garrido y Garrido, 2002). El desarrollo *in vitro* suele ser lento (2-5 días) por lo que debe mantenerse la incubación al menos durante cuatro a seis semanas a 37°C (Rodríguez *et al.*, 1998; Velasco y Yamasaki, 2002).

La diferenciación de especies y biotipos se realiza mediante la apariencia de sus colonias, pruebas bioquímicas, requerimientos específicos de cultivo, inhibición por colorantes, pruebas de aglutinación con sueros monoespecíficos anti A y M, y fagotipificación por el lisado con el bacteriófago Tbilisi (Cuadro 2) (Quinn *et al.*, 2002; Velasco y Yamasaki, 2002; Acha y Szyfres, 2003).

Para el cultivo específico de *B. abortus* se puede utilizar el medio Thayer-Martin modificado o el medio Farrell provisto de un agar suero-dextrosa complementado con bacitracina, cicloheximida, ácido nalidíxico, nistatina, polimixina B y vancomicina (Garrido y Garrido, 2002) y para el cultivo del biotipo 2 de *B. abortus* se requiere un enriquecimiento del medio con sangre o suero. *B. abortus* no es hemolítica en agar sangre (Quinn *et al.*, 2002).

En el aislamiento primario, las colonias de *B. abortus* se presentan lisas, pequeñas, brillantes, azuladas y translúcidas después de la incubación durante 3 a 5 días. Además, las cepas lisas virulentas de *B. abortus* pueden crecer en cultivos de células mononucleares sanguíneas, macrófagos peritoneales, macrófagos de glándula mamaria y líneas celulares de mamíferos (Aréstegui *et al.*, 2001; Quinn *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Algunas características bioquímicas y antigénicas de *B. abortus* que permiten clasificarla en biotipos

| Especie | Biotipo | Producción de H ₂ S | Necesidad de CO ₂ | Sensibilidad a los colorantes | | Aglutinación con sueros monoespecíficos | |
|-------------------|---------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------|---|---|
| | | | | Tionina | Fucsina | A | M |
| <i>B. abortus</i> | 1 | + | + | - | + | + | - |
| | 2 | + | + | - | - | + | - |
| | 3 | + | + | + | + | + | - |
| | 4 | + | + | - | + | - | + |
| | 5 | - | - | + | + | - | + |
| | 6 | - | - | + | + | + | - |
| | 7 | + | - | + | + | + | + |

Modificado de Castro *et al.* (2005)

La bacteria no se multiplica en el ambiente, simplemente persiste y la viabilidad fuera del hospedador depende de las condiciones ambientales

(Radostits *et al.*, 2002). El microorganismo es sensible a la luz solar, a los desinfectantes y a la pasteurización, puede sobrevivir varios meses en el agua a temperaturas de 4 a 8°C; 2.5 años a 0°C o durante años congelado. En orina resiste 30 días, en fetos abortados 60 días y en exudado uterino 200 días; la acidificación de la leche elimina estas bacterias pero pueden mantenerse por algunos meses en la mantequilla y en los quesos blancos procesados con cuajo (OPS/OMS/BID, 1986; Dragui, 2002). En el Cuadro 3 se muestran algunos tiempos de supervivencia de *Brucella* en diferentes materiales.

Cuadro 3. Tiempo de supervivencia de *Brucella sp.* en diversos materiales

| Material | Tiempo de supervivencia |
|--|--------------------------------|
| 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 |

Fuente: Castro *et al.* (2005)

2.3.2. Morfología

Brucella abortus es un cocobacilo pequeño gramnegativo que mide 0,5-0,6-1.5 µm, no móvil, no forma esporas, carece de pilis o flagelos, de cápsula y de plásmidos nativos (Velasco y Yamasaki, 2002; Young, 2005). Como no se decolora por el ácido acético al 0.5% en la tinción Köster o Stamp, o también llamada técnica modificada de Ziehl-Neelsen (ZNM), se clasifica como ZNM positivo (Garrido y Garrido, 2002; Quinn *et al.*, 2002).

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (L) o rugosas (R). El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido en la superficie bacteriana. *B. abortus* es clasificada como una especie lisa. Las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas (Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006).

2.3.3. Genoma

El género *Brucella* es altamente específico, todos sus miembros muestran más de 95% de homología por lo que se le considera un género monoespecífico (Aréstegui *et al.*, 2001). 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. Dos características genéticas de *Brucella* llaman especialmente la atención. En primer lugar, la existencia de dos cromosomas circulares (2.1 y 1.5 mbp) en la mayoría de las especies y biotipos, y en segundo lugar, la ausencia de plásmidos (Garrido y Garrido, 2002). 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.). Se estima, además, que el 8% del genoma de *Brucella* se destina a funciones necesarias para la supervivencia y la virulencia (Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006).

Hay una pronunciada asimetría de los genes en diferentes categorías funcionales entre los dos cromosomas de *Brucella*, sin embargo, cada uno contiene genes que son esenciales para la integridad estructural y metabólica (Young, 2005).

2.3.4. Estructura antigénica

Estructuralmente, el género *Brucella* posee una envoltura celular característica formada por la membrana externa, la membrana interna y un espacio periplasmático intermedio.

La membrana externa es una capa de lipopolisacárido proteico de aproximadamente 9 nm de grosor rica en fosfatidilcolina. Las microfotografías electrónicas revelan una densa capa de 3 - 5 nm de grosor que consiste de un complejo mucopeptídico-muramil asociado con las lipoproteínas. El componente más abundante y mejor estudiado de la membrana externa es el lipopolisacárido (LPS) (Castro *et al.*, 2005; Young, 2005; Estein, 2006), sin embargo, existen otros componentes lipídicos como la ornitina y los ácidos grasos de la cadena larga del lípido A que contribuyen a la resistencia contra sustancias bactericidas (Aréstegui *et al.*, 2001).

En el periplasma hay proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano (PG) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. Las proteínas de la matriz y las porinas penetran la capa de peptidoglicano a intervalos irregulares. El espacio periplasmático de baja densidad separa la capa de PG de la membrana celular. El citoplasma es rico en ADN, ARN, y proteínas citosólicas, algunas de ellas importantes desde el punto de vista del diagnóstico (Figura 2) (Young, 2005; Estein, 2006).

2.3.4.1. Lipopolisacárido

El principal componente de superficie de *Brucella sp.* es el lipopolisacárido (LPS) que se conoce también con el nombre de *endotoxina* y es altamente resistente a la degradación por los macrófagos. En el LPS 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, que se ancla al complejo en la membrana celular

externa. Las cepas lisas (L) contienen el complejo completo, mientras que las cepas rugosas (R) carecen de la cadena colateral O (Castro *et al.*, 2005; Young, 2005; Seleem *et al.*, 2008).

El LPS de *Brucella* desempeña un importante papel en la protección contra los péptidos catiónicos bactericidas (defensina NP-2, lactoferrina, cecropinas, lisozimas, péptidos derivados de la bacterenecina, el antibiótico tipo defensina polimixina B y los extractos lisosomales de los leucocitos polimorfonucleares) (Seleem *et al.*, 2008).

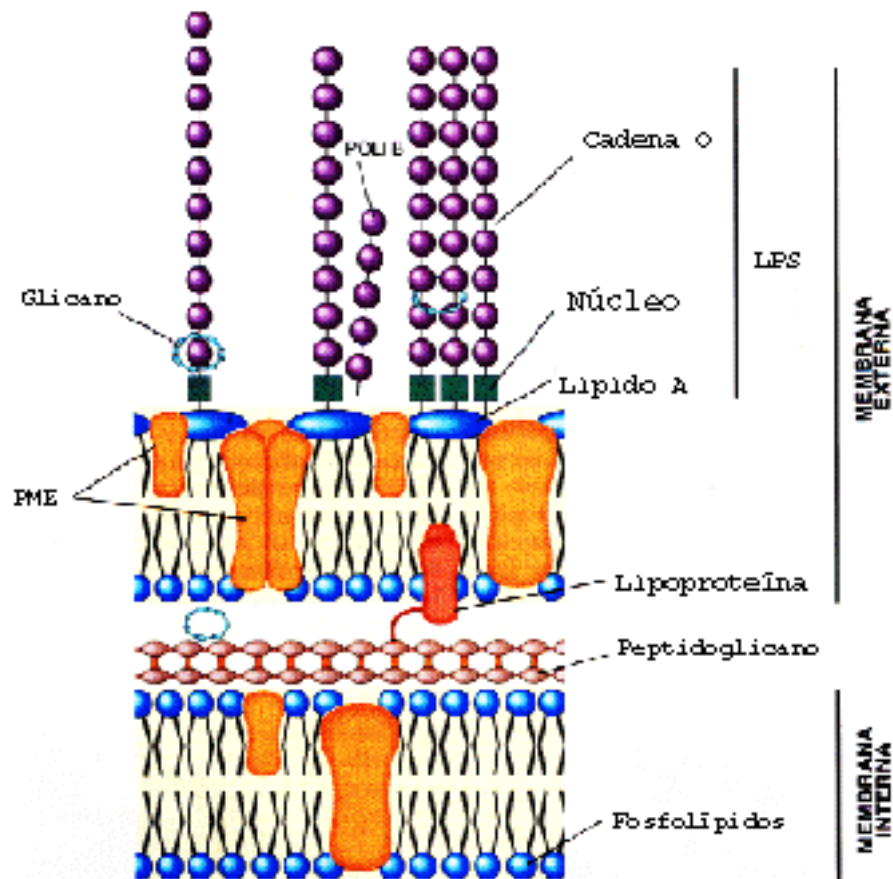


Figura 2. Diagrama de la estructura antigénica de *Brucella abortus*. PME: proteínas de membrana externa. Modificado de Castro *et al.* (2005)

El lípido A es un glucolípido que contiene glucosalina 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-L (liso) pero no en el del LPS-R (rugoso) (Garrido y Garrido, 2002; Castro *et al.*, 2005).

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 de TNF- α , interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), los cuales son mediadores de la mayoría de los síntomas de choque séptico. Las moléculas de manosa que presenta el extremo terminal del LPS de *Brucella* (cepa lisa) favorecen la adherencia a los fagocitos mononucleares del hospedador, ya que éstos tienen receptores de manosa (Rivers *et al.*, 2006).

El polisacárido O es la porción más distal del LPS, la parte más expuesta de la bacteria y blanco de los anticuerpos. Las especies lisas de *Brucella* inhiben la apoptosis celular a través de la acción de este polisacárido a través de un mecanismo independiente del TNF- α . Debido a esta inhibición de la apoptosis, *Brucella* puede escapar de la vigilancia inmune del hospedador y evitar la activación de la respuesta inmune por factores liberados por las células muertas y evitar la inducción de las células presentadoras de antígeno (Seleem *et al.*, 2008).

El PSO contiene varios epítomos: el epítomo A predomina en las cepas de *B. abortus* y consiste de un homopolímero lineal compuesto por aproximadamente 100 residuos de N-formil perosamina que es el componente inmunodominante de las cepas lisas de *B. abortus* (Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006). La presencia de perosamina explica las reacciones cruzadas con otras bacterias gramnegativas. Un epítomo común, el epítomo C, está presente en todas las especies de *Brucella* y explica las reacciones cruzadas serológicas entre ellas (Castro *et al.*, 2005; Young, 2005).

El género *Brucella* contiene otro polisacárido denominado hapteno superficial o hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O, pero no está unido al núcleo (Garrido y Garrido, 2002; Castro *et al.*, 2005).

2.3.4.2. Proteínas de la membrana externa (OMPs)

En el género *Brucella* han sido identificadas varias proteínas de membrana externa y han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo a su masa molecular aparente: el Grupo I se relaciona con la biosíntesis de la propia envoltura celular y tiene un peso molecular entre 88 a 94 kDa; el Grupo II es equivalente a las porinas de otras bacterias gramnegativas, como Omp 2, OmpC y OmpF y tiene un peso molecular entre 35 a 40 kDa; y las proteínas del Grupo III con un peso molecular entre 25 a 31 kDa interaccionan fuertemente con el LPS (Rodríguez *et al.*, 1998; Young, 2005; Rivers *et al.*, 2006).

Estos tres grupos de proteínas de membrana externa son reconocidos por el sistema inmune durante el curso de la infección y son de mucho interés debido a su especificidad, porque no muestran reacción cruzada con otros gérmenes, y por su potencial utilización en el campo de las vacunas y el diagnóstico serológico (Rodríguez *et al.*, 1998).

Las OMPs de *Brucella* se clasifican en mayores y menores de acuerdo con su abundancia relativa, hallándose ambas intercaladas en la membrana y estrechamente unidas al LPS por fuerzas hidrofóbicas. Muchas de estas OMPs han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional (Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006).

a. OMP mayores

Las OMPs mayores son insolubles en disolventes acuosos. En la década del 80, estas proteínas fueron identificadas por primera vez en *B. abortus* en una fracción insoluble en dodecil sulfato de sodio extraída a partir de la envoltura celular. Dicha fracción contiene dos de las OMPs mayores: una de

25-27 kDa y otra de 36-38 kDa. Actualmente, estas proteínas se denominan Omp25 (grupo 3) y Omp2b (grupo 2). En las especies rugosas, las OMPs se encuentran bien expuestas mientras que en las lisas los anticuerpos no pueden acceder a los epítomos específicos posiblemente por el impedimento estérico ocasionado por las largas y abundantes cadenas del polisacárido O (Estein, 2006).

b. OMP menores

Las OMPs menores son la Omp1 y las lipoproteínas Omp10, Omp16, Omp19 que, a diferencia de las mayores, no se encuentran asociadas al PG. Entre otras proteínas minoritarias se ha descrito una lipoproteína de 8 kDa unida en forma covalente al PG que posee epítomos comunes con la lipoproteína Braun de *E. coli* (Young, 2005; Estein, 2006).

2.3.4.3. Proteínas citoplasmáticas

Entre las proteínas citoplasmáticas se han caracterizado las proteínas del estrés térmico, que se expresan a niveles elevados en el ambiente intracelular. Entre estas se encuentran GroEL (60 kDa), GroES (10 kDa), DnaK (70 kDa) y HtrA (60 kDa). También se han hallado las proteínas YajC y UvrA así como una bacterioferritina (BFR), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), las proteínas ribosomales L7/L12 y cp24, y una lumazina sintetasa. La proteína ribosomal L7/L12 parece desempeñar un papel en la estimulación de la inmunidad celular tipo Th 1 (Aréstegui *et al.*, 2001; Young, 2005; Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006) y es importante en la respuesta de hipersensibilidad retardada en la prueba de brucelina (Garrido y Garrido, 2002).

2.3.4.4. Proteínas periplasmáticas

Entre las proteínas periplasmáticas que han sido identificadas se encuentran la superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) que inactiva los intermediarios oxígeno reactivos (Young, 2005), la BP26 o CP28, la P39 (Estein, 2006) y la enzima catalasa (Rivers *et al.*, 2006).

La SOD Cu-Zn forma parte del sistema de defensa antioxidante de *Brucella*, el cual protege a la bacteria de los efectos tóxicos de los intermediarios reactivos del oxígeno, ya que transforma los radicales superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno gaseoso (O_2), contribuyendo a la supervivencia intracelular de *Brucella* (Aréstegui *et al.*, 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 generado al interior del macrófago después de la fagocitosis de la bacteria, transformándolo en agua y oxígeno. La expresión de estas enzimas favorecería la permanencia de *Brucella* en el interior del fagocito (Young, 2005; Rivers *et al.*, 2006).

2.4. Epidemiología de la brucelosis bovina

2.4.1. Distribución geográfica

La brucelosis bovina causada por *B. abortus*, antiguamente distribuida a través de todo el mundo, ha sido erradicada o reducida a una prevalencia baja en muchos países mediante programas nacionales de erradicación (Quinn *et al.*, 2002). El biotipo 1 de *B. abortus* es universal y es el predominante de los siete que se presentan en el mundo. En América Latina se han detectado los biotipos 1, 2, 3, 4 y 6; en Centroamérica sólo se han identificado los biotipos 1 y 2; en África y China predomina el biotipo 3; en los Estados Unidos se han

aislado los biotipos 1, 2 y 4 (Moreno, 2002; Radostits *et al.*, 2002; Acha y Szyfres, 2003).

2.4.2. Hospedadores naturales

Si bien *B. abortus* es reconocida como la principal causa de aborto en bovinos, también puede infectar otras especies como ovejas, cabras, perros, caballos, búfalos, animales silvestres como los alces, jabalíes, zorros, renos, camellos y bisontes, y también puede infectar al hombre (Dragui, 2002; Rivers *et al.*, 2006).

2.4.3. Situación de la enfermedad a nivel mundial

La brucelosis bovina existe en todo el mundo. Tres países ganaderos importantes en América como son Brasil, Argentina y México todavía tienen programas limitados de control de la enfermedad (Acha y Szyfres, 2003).

La estimación actual de brucelosis bovina en Argentina está entre 10 y 13% de hatos infectados y la tasa individual de infección está entre 2 y 2.5%. No hay un requerimiento para la identificación de *Brucella* por un veterinario acreditado, sin embargo, debido a la educación continua a través de reuniones regionales y locales, publicaciones y cursos, se ha incrementado el envío de muestras al laboratorio para el diagnóstico bacteriológico de brucelosis. El aislamiento más común es del biotipo 1 de *B. abortus*, no obstante, el biotipo 2 también ha sido hallado (Samartino, 2002).

La brucelosis bovina debido a *B. abortus* es la infección por *Brucella* más prevalente en Brasil. El impacto económico de la brucelosis bovina ha sido estimado en US\$ 32 millones anualmente. De acuerdo a los reportes oficiales, la prevalencia de brucelosis bovina en Brasil es de 4 a 5%, con una prevalencia mayor en las regiones con una mayor densidad de bovinos (Poester *et al.*,

2002). En el estado de Mato Grosso do Sul fue determinada una prevalencia real de 5.6% en 210 hatos con un total de 2,376 vacas de más de 24 meses de edad, analizadas serológicamente mediante las pruebas Rosa de Bengala y confirmando los resultados con la prueba 2-mercaptoetanol. Sin embargo, la prevalencia de infección por hato fue de 37.7% (Monteiro *et al.*, 2006).

Por otro lado, algunas localidades tienen prevalencias mucho más bajas como por ejemplo el Municipio de Ilhéus, en Bahía, donde se ha estimado una prevalencia de 1.9% utilizando pruebas como la aglutinación lenta en tubo, Rosa de Bengala y 2-mercaptoetanol (Ribeiro *et al.*, 2003). Además, en el estado de Paraíba se determinó una prevalencia de 0.34%, aunque la distribución de animales reactivos era bastante amplia: en 8 de los 18 municipios que conforman dicho estado (44.44%) (Leite *et al.*, 2003).

La brucelosis bovina es una enfermedad importante en Venezuela. *Brucella abortus* ha sido identificado como el patógeno causante de brucelosis en humanos y animales. Los resultados obtenidos con pruebas de alta sensibilidad y especificidad indican una prevalencia de aproximadamente 10.5%. Esta prevalencia es aún más alta en algunas áreas del país donde la enfermedad produce serios problemas en bovinos, búfalos y humanos (Vargas, 2002).

En Chile, la brucelosis bovina está concentrada en la X Región del país. En un estudio de prevalencia en 1991 se determinaron tasas de animales seropositivos que fluctuaron entre un 23 y un 38% según la provincia, además, la información obtenida en el año 1997 revela que más del 60% de los rebaños infectados del país se localizan en esta región afectando con mayor frecuencia a rebaños de orientación lechera (Rosenfeld *et al.*, 2007).

En Colombia, la brucelosis generalmente no es considerada una enfermedad de alto riesgo y se han determinado prevalencias de sólo 1.5% a pesar de la baja adopción de las medidas de vacunación (Otte *et al.*, 1995). En cuanto a Paraguay, la última estimación de la prevalencia de *B. abortus* en bovinos fue 3.15% y las pérdidas económicas debido a brucelosis en bovinos se estimaron en US\$ 23.5 millones por año (Baumgarten, 2002).

En Centroamérica la situación de la brucelosis bovina es más dramática que en Sudamérica. Se ha estimado que la prevalencia de brucelosis bovina es de 4 a 8% y la tasa de infección del hato, principalmente lecheros, es de 10 a 25%. Las pérdidas económicas debido a brucelosis han sido estimadas en US\$ 25 millones por año. La mayoría de animales transportados de un estable a otras áreas para el comercio y beneficio raramente son inspeccionados, excepto cuando pasan de un país a otro. Los mataderos raramente inspeccionan para detectar brucelosis. Los establecimientos de bovinos lecheros tienen una mayor densidad de animales y por lo tanto, mayor prevalencia de brucelosis (Moreno, 2002).

En México, la brucelosis bovina continúa siendo uno de los principales problemas zoonosarios que aquejan a la ganadería y no se ha podido cuantificar debido a que no existen datos reales sobre la prevalencia en bovinos (Rentería *et al.*, 2003).

En Europa, la brucelosis está mucho mejor controlada y hasta erradicada en algunas zonas, pero aún se encuentran países que no están libres de la enfermedad como Francia, Grecia, Irlanda, Italia, Portugal y España. Sin embargo, estos países han aprobado desde el año 2000 programas de erradicación de la brucelosis bovina con co-financiamiento de la Unión Europea (Godfroid y Käsbohrer, 2002).

Los países europeos oficialmente libres de brucelosis son Austria, Alemania, la provincia de Bolzano en Italia, Luxemburgo, Holanda y Gran Bretaña (Godfroid y Käsbohrer, 2002). Gran Bretaña ha logrado oficialmente el estado libre de brucelosis desde el año 1985 después de aplicar un exitoso esquema obligatorio de erradicación. A pesar de esto, ha habido cierta cantidad de brotes de la enfermedad siendo el más reciente el ocurrido en el año 2004 (McGiven *et al.*, 2008). También se han declarado libres de brucelosis países como Bélgica, Bulgaria, Dinamarca, Hungría, Suiza y Rumania (Acha y Szyfres, 2003).

Muchos países nórdicos también son zonas libres de brucelosis en comparación con otras partes del mundo. Tienen bases sólidas para la vigilancia y el control de la enfermedad en rumiantes con legislaciones y regulaciones nacionales. Finlandia, Islandia, Noruega y Suecia están declarados libres de brucelosis y el objetivo de sus programas de vigilancia es monitorear, proteger y mantener el estado libre de la enfermedad (Valsson *et al.*, 2001).

El panorama es muy diferente en los países asiáticos. China ha reportado la brucelosis en 25 de sus 32 provincias con algunas áreas permaneciendo endémicas (Deqiu *et al.*, 2002). En países como Irak, la política de análisis de animales y sacrificio de los individuos positivos no es un método ideal o práctico para el control porque muchos propietarios no cooperan, además es difícilmente posible porque no hay un presupuesto para compensación (Shareef, 2006). En Sri Lanka, se ha reportado una prevalencia de brucelosis bovina de 4.7% en vacunos y 4.2% en búfalos mediante la prueba de ELISA indirecta (Silva *et al.*, 2000).

En la India, la brucelosis bovina es endémica en todos los estados y parece estar incrementándose actualmente, debido tal vez a un incrementado comercio y movimiento rápido del ganado. La prevalencia de la enfermedad se ha determinado en 6.6% hasta 60% en algunas partes del país. La brucelosis se ha establecido por sí misma y se disemina rápidamente en la población ya que el sacrificio de bovinos está prohibido por motivos religiosos. Asimismo, la preponderancia del servicio de monta natural de toros en la India, especialmente en los búfalos, es tal vez otro factor importante en el mantenimiento y diseminación de la enfermedad. La vacunación contra la brucelosis bovina no es practicada, excepto en las granjas grandes, privadas organizadas e infectadas (Renukaradhya *et al.*, 2002).

En el continente africano la brucelosis es prevalente en la parte sub-Sahariana de los sistemas de producción de ganado, aunque su presencia aún sigue siendo no reconocida por la carencia de vigilancia por veterinarios y el

sistema sanitario, y por la ausencia de instalaciones de diagnóstico de laboratorio. Los datos preliminares sugieren que la incidencia de brucelosis es mucho más alta en los sistemas de producción pastoriles donde se mezclan grandes cantidades de animales y que es mucho menor para los animales estabulados. En general, la prevalencia de brucelosis es usualmente más alta y el control más problemático en las poblaciones pastoriles y migratorias, que comprenden una significativa proporción de la población agropecuaria de África (Smits y Cutler, 2004).

En Tanzania, se están llevando a cabo análisis serológicos para que las medidas de control de brucelosis sean implementadas próximamente. El reporte de estos análisis reveló una tasa de prevalencia de 10.8% con diferencias significativas por el tipo de manejo, tipo y categoría de animales, incluyendo animales exóticos (Jiwa *et al.*, 1996).

En Uganda también ha sido determinada la prevalencia de brucelosis en bovinos. El distrito de Mbarara es el principal sector lechero del país e incluye zonas de pastoreo y zonas agrícolas. La prueba comúnmente utilizada para detección de brucelosis es Rosa de Bengala. La prevalencia determinada por hatos fue de 55.6%, la prevalencia individual fue de 15.8% y el rango de hatos infectados fue desde 1 a 90%. La prevalencia de reactores se incrementó con la edad de los animales. Las prevalencias individual y de hatos son más altas en la zona de pastoreo (Bernard *et al.*, 2005).

2.4.4. Situación de la enfermedad a nivel nacional

Datos recientes indican que la prevalencia de brucelosis no es mayor al 1% en bovinos lecheros de crianza intensiva y semi-intensiva, pero existen casos esporádicos de abortos por *Brucella sp.* en pequeños criadores no organizados que constituyen una permanente amenaza para el resto de ganaderos (Rivera, 2001).

En los departamentos de Arequipa, Cajamarca, La Libertad, Lambayeque, Moquegua y Tacna se utiliza la prueba del anillo en leche como prueba tamiz para brucelosis bovina. Las pruebas positivas a la prueba del anillo en leche son evaluadas mediante la prueba Rosa de Bengala y como prueba confirmatoria se utiliza la prueba de Fijación de Complemento que se realiza en el Laboratorio de Sanidad Animal del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) para todas las muestras a nivel nacional. En el año 2003 se ha obtenido una prevalencia a nivel nacional de 0.026% para brucelosis bovina en 260,412 vacunos lecheros evaluados (SENASA, 2008).

En Arequipa se realizó un estudio para evaluar el estado y evolución de la brucelosis bovina causada por *Brucella abortus*, durante 1987 a 1993. El monitoreo se realizó identificando tres veces por año hatos lecheros positivos y sospechosos a la prueba de anillo en leche durante siete años. Paralelamente, muestras de sangre de toda la población bovina adulta procedente de los hatos positivos a la prueba de selección fueron analizadas para identificar animales infectados mediante la prueba de aglutinación en placa. Después de siete años de control de la enfermedad en la región, se tuvo una prevalencia en 1993 de 1.22% de hatos reactivos a la prueba del anillo en leche y 0.18% animales infectados con la prueba confirmatoria. El programa de control de la enfermedad permitió identificar al final del estudio, 5,318 hatos libres de brucelosis, los cuales se han beneficiados con el 0.5% de sobreprecio en el valor de la leche (López *et al.*, 1994).

En la provincia de Canta (Lima) se estimó una prevalencia de 0.21%, sin embargo, en este estudio no se determinó la especie de *Brucella* detectada y se sugiere que la infección en bovinos de este lugar puede deberse a *B. melitensis* debido a las características de explotación mixta con cabras (Huguet *et al.*, 2005). Por otro lado, ha habido casos confirmados de brucelosis por *B. abortus* en los departamentos de Cajamarca (7), Lambayeque (1), Lima (61), Madre de Dios (3) y Piura (4) en el año 2002 y en el año 2003 los bovinos reactivos fueron de Cajamarca (5), La Libertad (57) y Madre de Dios (6) (SENASA, 2008).

En algunas partes del país se ha podido demostrar la ausencia de *Brucella* sp. en bovinos, como en el caso de la provincia de Parinacochas (Ayacucho) donde ninguno de los 385 animales muestreados en 4 distritos del lugar presentaron anticuerpos aglutinantes, indicando que estos animales no han estado expuestos a la bacteria (Valdivia y Rivera, 2003). Asimismo, desde el año 2003 los departamentos de Lambayeque, Ica, Junín, Cusco, Amazonas, Tacna, Puno y Moquegua continúan por cuarto año consecutivo con una prevalencia de 0% (SENASA, 2008).

2.4.5. Transmisión

2.4.5.1. Fuentes de infección

Los animales infectados sirven como reservorio de la infección, persistiendo frecuentemente el microorganismo y excretándolo de forma indefinida (Quinn *et al.*, 2002). La fuente principal de infección en un establo suele ser una hembra infectada introducida en un hato libre (OPS/OMS/BID, 1986) que descarga el microorganismo a través de la placenta, feto, fluidos, sangre y secreciones uterinas (Garrido y Garrido, 2002; Acha y Szyfres, 2003).

B. abortus se puede excretar por descarga vaginal a partir de los 39 días de exposición. El aborto o el parto de un ternero viable contamina las pasturas y el agua de bebida y esta es una fuente de infección común para el ganado y el hombre. La excreción masiva de bacterias puede continuar hasta por 15 días (Dragui, 2002; Corbel, 2006).

Los terneros pueden infectarse en útero o cuando son alimentados con leche o calostro de hembras enfermas (England *et al.*, 2004). Los toros infectados presentan semen de calidad pobre pudiendo excretar el organismo por esta vía en el período agudo de la infección (Dragui, 2002; Garrido y Garrido, 2002), por lo tanto, la inseminación artificial con estos toros puede transmitir y diseminar la enfermedad (Corbel, 2006) si no son detectados,

aunque está demostrado que los toros raramente diseminan la enfermedad (England *et al.*, 2004).

2.4.5.2. Rutas de transmisión

La mayoría de los animales se infecta directamente a través de abrasiones 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 (OPS/OMS/BID, 1986; Rivers *et al.*, 2006). La principal ruta de transmisión en las vacas es la oral por la costumbre que tienen de lamer las membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos (Acha y Szyfres, 2003).

La brucelosis también puede deberse a la contaminación de la ubre durante el ordeño. *B. abortus* se puede propagar desde una vaca cuya leche contiene la bacteria hasta otra vaca no infectada, lo que es importante no tanto por su efecto como agente de aborto sino por la consecuencia sobre las pruebas de aglutinación en leche y la presencia de la bacteria en la leche de consumo humano (Radostits *et al.*, 2002).

La infección también puede tener lugar por contacto venéreo o por infección congénita *in utero* y la bacteria puede permanecer latente en el ternero durante los primeros meses de vida. El animal permanece serológicamente negativo hasta su primer parto, momento en el que comienza a diseminar el microorganismo (Quinn *et al.*, 2002; Radostits *et al.*, 2002; Corbel, 2006).

Se puede lograr una transferencia de embriones de donantes infectadas sin que se transfiera la infección y es poco probable que una superovulación reactive la liberación de la bacteria en el útero en el momento que se recogen los embriones. Por lo tanto, la transferencia de embriones es una técnica segura para salvar el material genético de los animales infectados (Radostits *et al.*, 2002).

2.4.5.3. Factores de riesgo

La severidad de la enfermedad depende de muchos factores tales como vacunación previa, edad, sexo, y factores de manejo como el tamaño y densidad del hato. Los abortos son más prevalentes en los animales no vacunados (Radostits *et al.*, 2002; Corbel, 2006).

En cuanto a la edad, las vaquillonas que se mantienen separadas de las vacas presentan con frecuencia una tasa de infección más baja que estas últimas, ya que por ser sexualmente inmaduras son altamente resistentes a *B. abortus*. Las vaquillonas expuestas a la infección antes del servicio son susceptibles y se infectan, pero por lo general no abortan (Acha y Szyfres, 2003) aunque el riesgo de aborto estará presente cuando ellas maduren debido al fenómeno de latencia de la brucelosis. Ha sido estimado que la latencia ocurre en aproximadamente el 5% de la progenie de las vacas infectadas (Corbel, 2006). La susceptibilidad aumenta con el desarrollo sexual y con la preñez por eso las vacas constituyen el grupo más susceptible y en ellas la infección es común y el aborto es frecuente (Dragui, 2002; Acha y Szyfres, 2003).

El tipo de crianza también está correlacionado con la enfermedad. Se sabe que el riesgo de transmisión está reducido en la crianza extensiva de bovinos, donde existe una menor densidad de animales y el promedio de vida es más corto. En contraste, el manejo de tipo intensivo favorece el contacto más estrecho entre los bovinos y por lo tanto aumenta la posibilidad de transmisión (Moreno, 2002).

Muma *et al.* (2007) condujeron en Zambia un estudio para investigar los factores de riesgo para seropositividad de *Brucella* en bovinos. Ellos tomaron datos de prácticas de crianza, estrategias de pastoreo y estructura del hato, y muestras de suero de bovinos mayores de 2 años de edad en 124 establos. Un modelo de regresión logística identificó ciertas áreas geográficas con la más alta probabilidad de infecciones por *Brucella* debido tal vez a su cercanía con un asentamiento humano permanente y al pastoreo en planicies con contacto

de animales silvestres. Igualmente, los hatos con mayor densidad de animales tuvieron mayores probabilidades de infección.

En Francia se realizó un estudio sobre factores de riesgo para brucelosis bovina debido a una tasa inusualmente alta de reacciones serológicas falsas positivas. Entre las conclusiones más saltantes destacan que la probabilidad de que un hato sea positivo está estrecha y positivamente ligada al tamaño del hato; la presencia de otros animales, como cabras, incrementa el riesgo de seropositividad y mayor cantidad de animales jóvenes aumenta la probabilidad de reacciones falsas positivas (Pouillot *et al.*, 1998).

El estudio realizado por Monteiro *et al.* (2006) en el estado Mato Grosso do Sul (Brasil) determinó que factores de riesgo tales como la explotación de ganado de carne, la raza cebú y la presentación de abortos en un establo estaban altamente correlacionados con la presentación de brucelosis bovina y concluyeron que los programas de control debían enfocarse principalmente en estos factores de riesgo.

En el estudio realizado por Leite *et al.* (2003) se estratificó por edad la recolección de muestras séricas de bovinos, y por tres diferentes ecoregiones en el estado de Paraíba, y no se halló diferencias significativas de riesgo a la enfermedad por edad ni por tipo de región y se confirmó que la enfermedad estaba ampliamente distribuida a través de todo el estado a pesar de las diferentes ecoregiones que lo conforman.

En un estudio de control de brucelosis en México, la compra e introducción de bovinos, el escaso control sobre la movilización de los animales, la alta incidencia de abortos y el grado de hacinamiento fueron algunos factores determinantes en la presentación de brucelosis (Rentería *et al.*, 2003).

En el estudio realizado en Sri Lanka por Silva *et al.* (2000), la edad, la zona agroecológica y el sistema de manejo practicado en las granjas de los bovinos muestreados fueron estudiados como factores de riesgo para seropositividad a brucelosis. Los bovinos que tenían más de 3 años de edad, provenían de

zonas áridas y estaban criados bajo un sistema de manejo extensivo tuvieron mayor probabilidad de ser seropositivos debido probablemente a un contacto no restringido entre los animales. Aproximadamente el 75% de los machos hallados seropositivos en este estudio provenían de la zona árida.

Según la extensa literatura existente sobre factores de riesgo para brucelosis (Radostits *et al.*, 2002; Smits y Cutler, 2004) los principales factores que contribuyen a aumentar la prevalencia y diseminar la enfermedad incluyen los sistemas y prácticas de manejo en las granjas, la superficie de las instalaciones, la higiene de la granja, el movimiento de ganado, la mezcla y comercio de animales, el porcentaje de animales que se han inseminado artificialmente, el número de vacas que abortaron el año anterior, la política del propietario respecto a la eliminación de los animales positivos, y compartir las mismas pasturas. Los materiales de abortos poseen un riesgo para infección significativamente alto si no son apropiadamente manejados y descartados. Similarmente, la contaminación ambiental contribuye a una mayor diseminación del microorganismo entre los animales.

2.4.6. La brucelosis bovina como zoonosis

2.4.6.1. La enfermedad en el hombre

Por ser una antropozoonosis, la brucelosis causa importantes pérdidas económicas al sistema sanitario y representa un importante problema de salud pública en muchos países, especialmente en aquellos en vías de desarrollo (Rodríguez *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2005).

La 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 medida en las secreciones genitales, contaminando de esta forma el suelo, los corrales, la paja de las camas, el agua de arroyos, canales y pozos (Radostits *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2005).

El hombre se infecta por vía conjuntival, cutánea o a través de las membranas mucosas, los trabajadores rurales y veterinarios pueden contagiarse por manipular fetos abortados, terneros nacidos vivos de madres infectadas, durante los exámenes ginecológicos y por palpación rectal; también están expuestos los trabajadores de frigoríficos y aquellos que consumen leche o sus derivados provenientes de animales enfermos. El consumo de carne no es una fuente de contaminación (Dragui, 2002; Rivers *et al.*, 2006).

En países en que la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente, sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual. La enfermedad puede ser adquirida por exposición en viajes a lugares donde la infección es endémica. Las infecciones asociadas al trabajo de laboratorio representan el 2% de los casos (Rivers *et al.*, 2006).

El período de incubación es variable y oscila entre una y tres semanas pero puede prolongarse por un lapso superior. Se ha informado que el período de incubación de la brucelosis adquirida por accidente en un laboratorio puede variar entre seis semanas a cinco meses (Castro *et al.*, 2005).

En los humanos, la brucelosis puede afectar cualquier órgano o sistema y por lo tanto, cursar con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Los síntomas y signos iniciales son a menudo inespecíficos y no existe ninguna asociación sindrómica patognomónica. Los síntomas iniciales son fiebre alta, astenia, sudoración y escalofríos, cefalea, dolores musculares y artromialgias. Otros síntomas que se reportan son anorexia, pérdida de peso, malestar general, estreñimiento e insomnio. Debido al empleo de los antibióticos ya no se registra el clásico patrón de fiebre ondulante (Rodríguez *et al.*, 1998).

Luego de un período de tiempo la brucelosis se autolimita o se vuelve crónica por la capacidad de *Brucella* de sobrevivir en el interior de las células fagocíticas y la falta de efectividad del tratamiento antibiótico para erradicarla completamente (Rodríguez *et al.*, 1998). Es difícil la identificación de la enfermedad en la etapa crónica, ya que los signos y síntomas pueden ser

comunes a otras enfermedades como salmonelosis, fiebre tifoidea, tuberculosis y leptospirosis. El término brucelosis crónica debe reservarse a pacientes cuya enfermedad lleve un período de evolución mayor de seis meses. Las recaídas se presentan en el 15% de los casos, luego de 2 a 3 meses de terminado el tratamiento (Castro *et al.*, 2005).

En el hombre el impacto es alto. Dentro de las pérdidas hay que tener en cuenta: hospitalización, licencias prolongadas, análisis y tratamiento. Aunque la enfermedad induce alguna forma de inmunidad duradera es frecuente observar la presencia de episodios de re-infección en aquellas personas que permanecen en una situación de riesgo por su continua exposición al germen (Rodríguez *et al.*, 1998; Dragui, 2002).

Para el diagnóstico de brucelosis humana se emplean habitualmente como pruebas tamices la prueba Rosa de Bengala o Huddleson y como pruebas confirmatorias la aglutinación lenta en tubo con y sin 2-mercaptoetanol, Coombs y la fijación de complemento (Castro *et al.*, 2005).

En el hombre, el enfoque lógico para prevenir la brucelosis consiste en el control y eliminación de la infección en los animales. En un estudio retrospectivo realizado por Shareef (2006) en Irak, fue demostrada una correlación positiva entre la prevalencia de brucelosis entre los animales y el hombre ya que este país, por ejemplo, no cuenta con un planeamiento estratégico para el control o erradicación de la enfermedad en los animales.

En Chad fueron evaluadas las relaciones entre las seroprevalencias de la brucelosis en humanos y animales. Un total de 860 personas y 1637 animales fueron analizados para detectar anticuerpos contra *Brucella spp.* Fue hallada una seroprevalencia de 3.8% en los humanos y una seroprevalencia de 7% en bovinos, sin embargo, no fue hallada una correlación entre el estado serológico para brucelosis en humanos y la proporción de animales seropositivos a la enfermedad. Por otra parte, fue hallado un alto riesgo para adquirir brucelosis debido a la conducta humana de consumo de leche cruda y el contacto con placentas del ganado (Schelling *et al.*, 2003).

Otras estrategias de control para prevenir la brucelosis humana son la pasteurización de la leche, la vacunación del ganado y la eliminación de los animales infectados (Zinsstag *et al.*, 2005). Hay que destacar que las vacunas vivas para brucelosis son patógenas para el hombre. Esto impone, por un lado, precauciones particulares durante la manipulación de la vacuna, y por el otro, introduce un importante problema de salud pública (Estein, 2006).

El tratamiento más habitual para la brucelosis humana es la administración de rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y oxitetraciclina durante largos períodos (Radostits *et al.*, 2002).

2.4.6.2. Grupos de riesgo

La brucelosis en los humanos es un peligro ocupacional. Principalmente es una enfermedad de los animales que es transmitida directamente o indirectamente al hombre. Los trabajadores de lecherías, pastores, veterinarios, trabajadores de mataderos, carniceros, el personal de laboratorios y el personal que maneja animales están particularmente en riesgo. La manipulación de la carcasa de un animal infectado puede suponer una grave exposición (Deqiu *et al.*, 2002; Garrido y Garrido, 2002; Radostits *et al.*, 2002). Ello constituye un problema no controlado de salud pública en muchos países en desarrollo. La OMS ha incluido a esta enfermedad en el grupo de riesgo III del Manual de Bioseguridad en Laboratorio (OPS/OMS/BID, 1986; Acha y Szyfres, 2003).

El estudio realizado por Agasthya *et al.* (2007) en la India demostró que la brucelosis aún es un peligro ocupacional en los médicos veterinarios y la mayoría de los casos de brucelosis pueden ser fácilmente confundidos debido a la naturaleza engañosa de los síntomas y signos clínicos. Todos los casos que mostraron la presencia de anticuerpos a *Brucella abortus* tuvieron variadas manifestaciones clínicas de brucelosis.

El mecanismo de transmisión más frecuente en el medio rural es el ingreso del microorganismo a través del contacto con animales infectados a través de la piel traumatizada, de la mucosa nasal y de la conjuntiva. Esto se produce principalmente en pastores, veterinarios, matarifes, ganaderos y labradores. La inhalación suele ser el principal medio de transmisión en los trabajadores de laboratorios (Cuadro 4) (Rodríguez *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Mecanismos de transmisión de brucelosis en el hombre y grupos de riesgo

| Vía de Infección | Puerta de entrada | Fuente de Infección | Población en riesgo |
|---------------------|---|--|--|
| Oral | Mucosa digestiva | Leche cruda, derivados lácteos | Población en general |
| Por contacto | Piel erosionada, conjuntiva, mucosa nasal | Productos animales contaminados: placenta, heces, secreciones vaginales | Trabajadores en contacto con animales infectados o sus productos: veterinarios, matarifes, cuidadores, personal de laboratorio |
| Respiratoria | Mucosa nasal | Aerosoles en laboratorios con muestras contaminadas, vacunas vivas, aerosoles en establos, lanas | Personal de laboratorio, trabajadores de la lana, personal de limpieza de establos |
| Parenteral | Inoculación accidental, transfusiones | Vacunas vivas, material biológico contaminado | Personal de laboratorio, veterinarios, población en general |

Fuente: Castro *et al.* (2005)

Los médicos confunden muchos casos de brucelosis porque no es considerada una enfermedad común. Los médicos deben tener en mente la posibilidad de una exposición ocupacional o ambiental en casos de fiebre. También es importante capacitar sobre la enfermedad a tales profesionales para que pueda ser realizada la evaluación periódica y ser tomadas las precauciones necesarias en las personas ocupacionalmente expuestas (Agasthya *et al.*, 2007).

En el estudio realizado por Swai y Schoonman (2008) en Tanzania, un país mayormente agrícola, hubo evidencia de una extensa exposición de los humanos a *B. abortus*. También hubo evidencia de una variación de tipo ocupacional en la distribución y fuerza de la infección. La prevalencia de los individuos que seroconvirtieron a *B. abortus* fue mayor en los trabajadores de mataderos (19.5%) que en otros grupos como pastores (2.9%) y otras categorías (2.3%), confirmando que la brucelosis es un potencial problema de salud pública.

Asimismo, el estudio realizado por Ramalho *et al.* (2008) en Brasil, indica que la mayor parte de los trabajadores de mataderos y un pequeño porcentaje de trabajadores rurales también están expuestos a *B. abortus*. También se halló un mayor porcentaje de reactores masculinos, debido probablemente a una mayor presencia masculina en el trabajo con ganado. El grupo etario con mayor exposición fue el grupo de más de 40 años, debido probablemente a un mayor tiempo de exposición.

2.5. Respuesta inmune

2.5.1. Inmunidad natural

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de la respuesta innata para reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta Th1 en el hospedador. Los macrófagos, los neutrófilos, las células asesinas naturales (NK) y el complemento juegan un rol clave en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo (Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006).

Los receptores tipo Toll (TLR) también desempeñan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune innata. Estos receptores presentes en las células fagocíticas profesionales reconocen productos microbianos uniéndose directamente a ellos e inducen señales intracelulares que activan factores de

transcripción (como NF- κ B) que modulan la producción de citoquinas (Rivers *et al.*, 2006).

a. Macrófagos

Los macrófagos juegan un rol central en la respuesta inmune frente a *Brucella*, ya que actúan como células fagocíticas profesionales y como células presentadoras de antígenos. Sin embargo, *Brucella* es capaz de inhibir su destrucción por parte de los macrófagos (Castro *et al.*, 2005). Los macrófagos son la principal célula blanco de esta infección (Saldarriaga *et al.*, 2002).

Los macrófagos procesan antígenos en sus compartimentos intracelulares y los presentan en el contexto del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) a los linfocitos T, promoviendo de esta manera la respuesta inmune adaptativa. Las funciones bactericidas frente a *Brucella* se deben al hierro presente en los macrófagos, ya que éste cataliza una reacción metabólica que incrementa la actividad de las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno, las cuales son inducidas por el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006).

b. Neutrófilos

Los neutrófilos son las primeras células del hospedador que se ponen en contacto con *Brucella*. Son atraídos al sitio de la infección por estímulos químicos originados o derivados del microorganismo, para posteriormente fagocitar la bacteria, preferentemente opsonizada (Saldarriaga *et al.*, 2002; Rivers *et al.*, 2006) y diseminar las bacterias por dos mecanismos: protegiéndolas de las actividades bactericidas de los anticuerpos y complemento, y transportándolas hacia los tejidos linfoides y los órganos del sistema retículo-endotelial donde la bacteria infecta a los macrófagos y se multiplica en su interior (Estein, 2006).

Una vez que el patógeno es fagocitado, se desarrolla una serie de mecanismos destructivos en el neutrófilo con el fin de eliminar la bacteria, mediante la desgranulación de los gránulos del neutrófilo y el aumento del consumo de oxígeno que lleva a la aparición del radical superóxido, peróxido de hidrógeno y otros radicales derivados del oxígeno, junto con la activación de la enzima mieloperoxidasa y la fusión del lisosoma con los fagosomas que contienen la bacteria, liberándose hidrolasa ácida, glicosidasa, proteasa y lipasa (Saldarriaga *et al.*, 2002).

No obstante, la bacteria ingerida puede sobrevivir al mecanismo destructivo de los fagocitos, gracias a moléculas de bajo peso molecular que inhiben el sistema antibacteriano mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-haluro (Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006), lo que permite la inhibición de la función fagosoma-lisosoma por la acidificación rápida del medio. Por lo tanto, este es el mecanismo principal para la supervivencia intracelular de *Brucella* y un determinante principal de la virulencia bacteriana (Garrido y Garrido, 2002; Quinn *et al.*, 2002). 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, tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplasmático rugoso (Figura 3) (Rivers *et al.*, 2006).

Es así que, aunque los neutrófilos son las primeras células relacionadas con la eliminación de patógenos extraños, ellos son considerados de baja eficiencia contra *Brucella*, ya que esta bacteria puede crecer y sobrevivir en su interior y además es diseminada a través de éstos a los diferentes órganos y localizaciones, desarrollándose una infección persistente (Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006).

c. Células asesinas naturales (células NK)

Las células NK forman parte de la primera línea de defensa contra *Brucella* y una vez que son activadas pueden eliminar células infectadas. *B. abortus*

puede activar la actividad lítica de las células NK, estimulando la producción de interleucina 12 (IL-12) por parte de las células presentadoras de antígenos. IL-12 además estimula a las células NK a secretar IFN- γ (Saldarriaga *et al.*, 2002; Rivers *et al.*, 2006).

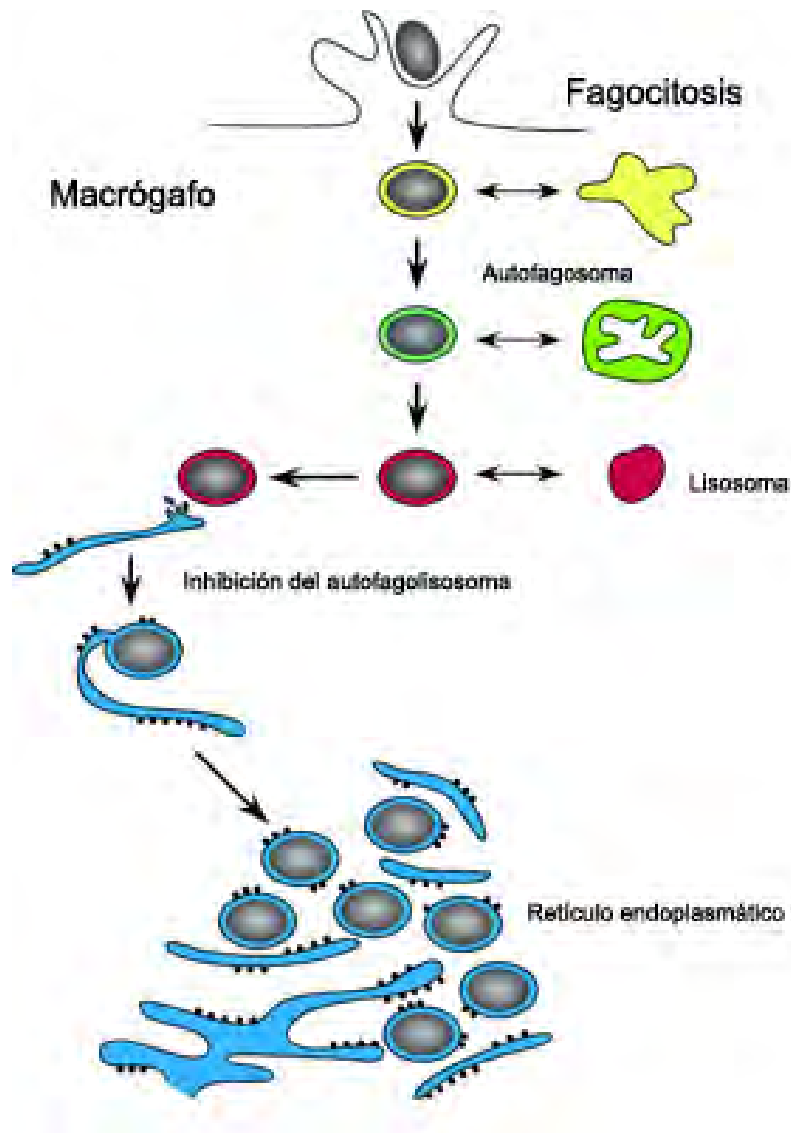


Figura 3. Interacción de *Brucella sp.* con los fagocitos.

d. Complemento

El complemento tiene un papel muy importante en la defensa contra *Brucella* cuando ésta se encuentra en el compartimiento extracelular y en bajo número (Estein, 2006). Después de la entrada de *Brucella* al organismo, se activa el complemento por la vía alterna. Sin embargo, se ha demostrado que esta vía es incapaz de eliminar la cepa virulenta de *Brucella abortus* 2308 (Rivers *et al.*, 2006). Por otro lado, la activación de la vía clásica se inicia con la presencia de bajas concentraciones de anticuerpos IgM e IgG anti-LPS, y la vía de las lectinas, mediada por la proteína fijadora de manosa, también se puede activar, lográndose de esta forma la lisis bacteriana (Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006).

2.5.2. Inmunidad adaptativa

Las funciones de la respuesta inmune adaptativa en la brucelosis se basan principalmente en tres mecanismos. Primero, la generación de una respuesta humoral con producción de anticuerpos Th1, tales como IgG2a que opsonizan al patógeno para facilitar la fagocitosis; segundo, la activación de la función bactericida de los macrófagos por acción del IFN- γ producido por las células T CD4+, CD8+ y células T $\gamma\delta$, y tercero, la lisis de las células infectadas por medio de los T CD8+ y las células T $\gamma\delta$ (Estein, 2006).

Las citoquinas son moléculas clave para una adecuada respuesta inmune mediada por células. La exposición prolongada de un animal a *Brucella* cambiaría la naturaleza de la respuesta inmune, desde una inmunidad mediada por células hacia una respuesta humoral (caracterizada por la producción de IgM e IgG1), respuesta que se relaciona con una disminución en la actividad de las células Th tipo 1, con una baja en la producción de IFN- γ , favoreciéndose de esta forma un incremento de la actividad de las células Th tipo 2, disminuyendo la respuesta inmune celular, lo que favorecería de esta forma el establecimiento de la enfermedad crónica (Rivers *et al.*, 2006).

2.5.2.1. Linfocitos

a. Linfocitos CD4+ y CD8+

Los linfocitos T CD4+ median la activación de los macrófagos a través de la producción de IFN- γ y permiten la lisis de la bacteria fagocitada (Aréstegui *et al.*, 2001). Después de la activación de los macrófagos, las células T inmaduras (Th0) se diferencian en células efectoras y de memoria, que están programadas para secretar distintos patrones de citoquinas. Las células Th1 secretan interleucina-2 (IL-2) e INF- γ , citoquinas que están asociadas con la protección contra bacterias intracelulares; los linfocitos Th2 producen interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10), lo que parece ser contraproducente para el control de la infección causada por *Brucella* (Saldarriaga *et al.*, 2002).

La generación de células Th1 de memoria sólo puede realizarse si la respuesta inicial al estímulo se asocia a la producción de IL-12 e IFN- γ . Los linfocitos T CD8+ que pueden producir IFN- γ , lisan las células infectadas que son incapaces de producir por sí mismas la destrucción de la bacteria intracelular, permitiendo que la bacteria sea fagocitada por un macrófago capacitado que pueda destruirla (Aréstegui *et al.*, 2001).

El rol principal de la secreción de IFN- γ por las células Th1 en la inmunidad contra *Brucella* es activar la función bactericida de los macrófagos y linfocitos T CD8+ citotóxicos, así como la estimulación de la secreción de IgG2a. En términos numéricos, la población celular predominante es la de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ . Las células citotóxicas T CD8+, menos numerosas, pueden actuar como células efectoras y eliminar macrófagos infectados directamente con *Brucella*. Las células blanco son reconocidas por las células citotóxicas en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad mayor de clase I (MHC I) y son eliminadas por la acción de perforinas y granzimas (Rivers *et al.*, 2006).

b. Linfocitos $\gamma\delta$

Las células T $\gamma\delta$ representan una pequeña población de linfocitos, con un patrón único de reconocimiento de antígenos. Las células T $\gamma\delta$ secretan TNF- α e IFN- γ después de ser activadas por antígenos no peptídicos, en su mayoría fosfoantígenos, los cuales no son presentados en el contexto del MHC. Mediante la secreción de estas citoquinas, activan la función bactericida de los macrófagos y, además, son capaces de lisar células infectadas por citotoxicidad directa. En bovinos menores de un año, la población celular predominante es la de células T $\gamma\delta$ y no la de células T $\alpha\beta$, lo que sugiere que el rol de este tipo celular es más significativo en la infección del ganado con brucelosis. De todas maneras, en bovinos, la producción de IFN- γ por estas células es menor que la producida por las células CD4+ (Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006).

c. Linfocitos B

Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA. Se ha comprobado que tanto IgM como IgG, en bajas concentraciones, son capaces de promover la lisis de *Brucella* a través de la vía clásica del complemento. También se han encontrado títulos elevados de IgG anti-SOD Cu-Zn en animales infectados. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos, en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados. Estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos en ciertas propiedades tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo, la incapacidad de activar complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación (Castro *et al.*, 2005).

La opsonización acoplada al aumento de eliminación de *Brucella* intracelular podría ser considerada como el principal rol de los anticuerpos contra la infección con *Brucella*. Aunque paradójicamente, en la brucelosis bovina, la alta

concentración de IgG durante la infección activa previene la lisis extracelular de la bacteria mediada por complemento y promueve la fagocitosis bacteriana, aumentando la localización intracelular de la bacteria y la extensión de la enfermedad (Rivers *et al.*, 2006).

2.5.2.2. Citoquinas

Las citoquinas son moléculas clave en el control de la brucelosis, ya que permiten dirigir las respuestas hacia una respuesta inmune celular o humoral. Estas incluyen el IFN- γ , la IL-12 y el TNF- α (Aréstegui *et al.*, 2001). *B. abortus* estimularía a las células presentadoras de antígeno para que secreten IL-12, la que induce a los linfocitos Th0 a diferenciarse en linfocitos Th1, secretores de IFN- γ (Saldarriaga *et al.*, 2002).

El IFN- γ participa en la regulación de los mecanismos defensivos de los macrófagos y es considerado un factor crucial para el desarrollo de la protección contra la infección por *Brucella* (Rivers *et al.*, 2006). Además, estimula la actividad antimicrobiana, aumenta la eliminación de los patógenos fagocitados y favorece el procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos mediante la cooperación con una segunda señal provista por el LPS y el TNF- α endógeno, con el propósito de promover el aumento de la producción de citoquinas que estimulan la inflamación, producción de óxido nítrico y la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor clase II (Aréstegui *et al.*, 2001).

El TNF- α contribuye a la resistencia frente a *Brucella* por una vía independiente del IFN- γ , estimulando el flujo de fagocitos al sitio de infección y participa en la activación de los macrófagos (Rivers *et al.*, 2006). La adición de TNF- α exógeno restringe el crecimiento intracelular de *Brucella* (Aréstegui *et al.*, 2001). Además, parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados (Castro *et al.*, 2005).

La interleucina-18 (IL-18), citoquina sintetizada por macrófagos activados, también estimula la producción de IFN- γ , por lo que actúa sinérgicamente con IL-12 sobre las células T en la estimulación de la respuesta mediada por células contra *Brucella* (Rivers *et al.*, 2006). Igualmente se ha determinado la producción de IL-1 e IL-6 aunque en menores cantidades en respuesta a la inducción con bacterias vivas o muertas (Saldarriaga *et al.*, 2002).

La IL-10, producida por linfocitos CD4⁺ Th2, macrófagos activados y algunas poblaciones de células B, inhibe la respuesta Th1, ya que disminuye la capacidad de presentar antígenos de los macrófagos e inhibe la secreción de IFN- γ , por lo tanto, aumenta la susceptibilidad a la infección por *Brucella*, sugiriéndose que las células CD8⁺ pueden inhibir la producción de IL-10 (Saldarriaga *et al.*, 2002; Rivers *et al.*, 2006).

En resumen, el macrófago infectado produce TNF- α que actúa autocrinamente e IL-12 que activa la producción de citoquinas tipo Th1, como el IFN- γ . Esta citoquina a su vez activa macrófagos y regula negativamente la producción de IL-10, la cual regula negativamente estos mecanismos. Adicionalmente los macrófagos infectados regulan la expresión de moléculas de adhesión como el B7.1, B7.2 e ICAM/1 que favorecen la adhesión entre células presentadoras de antígeno y las células T e indirectamente por medio de la IL-12, regulan otras moléculas de adhesión como el LFA-1 sobre los linfocitos (Saldarriaga *et al.*, 2002) (Figura 4).

2.6. Signos clínicos

Se ha demostrado que el período de incubación es extremadamente variable e inversamente proporcional al desarrollo del feto. Cuanto más adelantada está la preñez, más corto es el período de incubación de *Brucella* (Acha y Szyfres, 2003; Corbel, 2006).

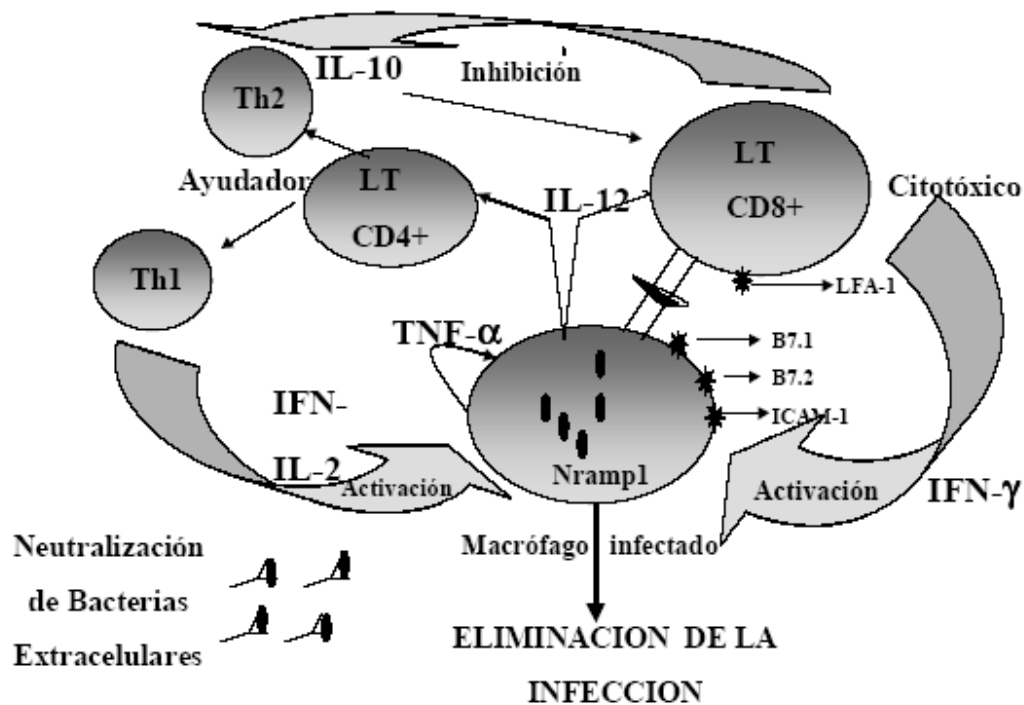


Figura 4. Representación de la respuesta inmune dirigida contra *Brucella sp.* Fuente: Saldarriaga *et al.* (2002).

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, 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 (Rivers *et al.*, 2006).

Se sabe que un porcentaje de las vacas y vaquillonas que se infectan durante la primera gestación abortan; si la infección es reciente pueden abortar hasta el 40% de estos animales, mientras que si los animales conviven con la infección durante 2 años este síntoma es menos evidente y las gestaciones posteriores normalmente se llevan a término. Otros signos clínicos clásicos en las hembras son la retención de placenta, metritis e infertilidad (OPS/OMS/BID, 1986; Dragui, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Las hembras no preñadas no muestran

signos clínicos y cuando se infectan con anterioridad a la concepción generalmente no abortan (Acha y Szyfres, 2003).

La infección en los terneros es de una duración limitada, en contraste con las vacas, en las cuales la infección de las glándulas mamarias y los ganglios linfáticos asociados persiste durante muchos años. El microorganismo puede ser excretado de manera intermitente en la leche (Dragui, 2002; Quinn *et al.*, 2002).

En los machos, los órganos afectados incluyen las vesículas seminales, los testículos y epidídimo. Cuando la enfermedad se presenta, uno o ambos testículos pueden aumentar de tamaño, con disminución de la libido, lo que puede ocasionar una infertilidad temporal o permanente (OPS/OMS/BID, 1986; Quinn *et al.*, 2002). A veces puede haber una atrofia testicular debido a adherencias y fibrosis (Acha y Szyfres, 2003) o abscesos en testículos y epidídimo (Rivers *et al.*, 2006).

En los países tropicales se observan frecuentemente higromas alrededor de las articulaciones o en los discos intervertebrales cuando la enfermedad es endémica en un rebaño (Quinn *et al.*, 2002) en especial con el biotipo 3 de *B. abortus* (Corbel, 2006).

2.7. Fisiopatología

Las cepas virulentas de *Brucella*, cuando son fagocitadas por los macrófagos en las membranas mucosas, son transportadas hasta los ganglios linfáticos y hay una bacteriemia transitoria, luego estas bacterias son diseminadas hacia otros tejidos incluyendo el bazo, los ganglios linfático mamarios e ilíacos. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas (Dragui, 2002; Radostits *et al.*, 2002; Acha y Szyfres, 2003). Los ganglios linfáticos responden a la invasión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que

puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (Rivers *et al.*, 2006).

Posteriormente, la bacteriemia intermitente da como resultado la difusión y localización del microorganismo en los órganos del tracto reproductivo y en las glándulas asociadas en los animales sexualmente maduros. El eritritol, un alcohol polihídrico, actúa como un factor de crecimiento para *B. abortus* y está presente en una concentración elevada en la placenta del ganado bovino. Este factor de crecimiento también se encuentra en otros órganos tales como la glándula mamaria y el epidídimo (Dragui, 2002; Garrido y Garrido, 2002; Quinn *et al.*, 2002; Rivers *et al.*, 2006). Asimismo, las células de la placenta, al igual que los fagocitos mononucleares, contienen una gran cantidad de receptores de manosa, lo que favorece la unión con las moléculas de manosa del extremo terminal del LPS de *Brucella* (Aréstegui *et al.*, 2001; Rivers *et al.*, 2006).

Después que una vaca aborta o pare con normalidad, el microorganismo no permanece mucho tiempo en el útero. La infección se vuelve crónica y *Brucella* se refugia en los ganglios linfáticos y en la glándula mamaria del animal (Acha y Szyfres, 2003).

2.8. Lesiones

Los abortos son consecuencia de la inflamación de la placenta, la cual presenta necrosis que afecta a los cotiledones que aparecen blandos, de color amarillento y cubiertos con una capa delgada de exudado parduzco (OPS/OMS/BID, 1986). La invasión del útero gestante produce una grave endometritis ulcerosa de los espacios intercotiledóneos. La bacteria invade el alantocorion, los líquidos fetales y los cotiledones placentarios, provocando la destrucción de las vellosidades (Quinn *et al.*, 2002; Radostits *et al.*, 2002).

Carvalho *et al.* (2008) realizaron un trabajo sobre la interacción de *Brucella abortus* y las células trofoblásticas para comprender mejor la patogénesis de la

placentitis y el aborto inducidos por *Brucella*. Se evaluaron injertos de membranas corioalantoideas inoculadas con *B. abortus* cepa 2308 y adicionalmente se evaluaron vacas experimentalmente infectadas. Los resultados indicaron que *B. abortus* modula la respuesta inmune innata por las células trofoblásticas suprimiendo la expresión de mediadores pro-inflamatorios durante las etapas tempranas de la infección, lo que es seguido por un retraso y la expresión moderada de quimioquinas pro-inflamatorias. Ellos concluyeron que esta respuesta trofoblástica probablemente contribuye a la placentitis inducida por *B. abortus*.

En los machos, la orquitis necrotizante producida por la bacteria ocasiona lesiones fibróticas localizadas (Quinn *et al.*, 2002). En fetos infectados experimentalmente se ha observado hiperplasia linfoide en múltiples ganglios linfáticos, depleción linfoide en la corteza del timo, hiperplasia cortical de las suprarrenales y focos inflamatorios diseminados formados principalmente por grandes leucocitos mononucleares (Radostits *et al.*, 2002).

2.9. Diagnóstico de la brucelosis bovina

El diagnóstico de la enfermedad en los animales debe realizarse sobre la base del hato. La identificación de uno o más animales infectados es suficiente evidencia de que la infección está presente en el hato y que otros animales serológicamente negativos pueden estar incubando la enfermedad y presentan un riesgo (Corbel, 2006).

Asimismo, algunas veces el diagnóstico de brucelosis depende de determinados métodos, por ejemplo, algunos toros infectados son negativos a las pruebas de aglutinación en suero y sólo se pueden identificar mediante el aislamiento de la bacteria en semen o en pruebas de aglutinación en plasma seminal (Radostits *et al.*, 2002).

Respecto a la leche cruda y productos lácteos no pasteurizados, se han utilizado pruebas de aglutinación en placa y aglutinación en tubo con y sin 2-mercaptoetanol para identificar animales positivos en estudios de hatos (Langoni *et al.*, 2000).

Las pruebas diagnósticas en general se clasifican en dos categorías: aquellas que demuestran la presencia del organismo (métodos directos) y aquellas que detectan una respuesta inmune a sus antígenos (métodos indirectos) (Corbel, 2006).

2.9.1. Métodos directos

Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos del individuo. Las preparaciones teñidas por ZNM a partir de muestras como cotiledones, abomaso, contenido estomacal fetal y supuraciones uterinas frecuentemente revelan características de cocobacilos ZNM positivos; igualmente se pueden utilizar muestras fetales de bazo y pulmón (Dragui, 2002; Quinn *et al.*, 2002). También se sugiere intentar el aislamiento desde nódulos linfáticos, en especial los retromamarios; glándula mamaria, semen, epidídimo, líquido articular, calostro y leche (Garrido y Garrido, 2002; Acha y Szyfres, 2003). Debe ser tomada precaución ya que otros agentes infecciosos tales como *Coxiella burnetii* o *Chlamydia* pueden parecerse superficialmente a *Brucella* (Corbel, 2006).

El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria (Samartino *et al.*, 2007), frecuentemente a partir de hemocultivos. La técnica más utilizada para realizarlos es la de Ruiz Castañeda, que consiste en la inoculación de sangre en frascos herméticamente cerrados que contienen, simultáneamente, un medio líquido (caldo triptosa) y un medio sólido (agar triptosa). Los cultivos deben mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días (Castro *et al.*, 2005).

Hay que destacar que el cultivo bacteriológico de *Brucella* es una técnica fácil, rápida y económica pero tiene una baja sensibilidad en muestras de leche y productos lácteos (Garrido y Garrido, 2002) y al utilizar muestras de leche y semen las pruebas deben repetirse si el resultado es negativo ya que la descarga de *Brucella* puede ser intermitente (Acha y Szyfres, 2003).

2.9.2. Métodos indirectos o serológicos

Las dificultades para el aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos y la falta de signos patognomónicos hacen que los métodos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado. Las pruebas serológicas son utilizadas para la identificación de rebaños infectados o de animales individuales en los planes de erradicación (Quinn *et al.*, 2002). Existen numerosas pruebas que están destinadas a detectar no sólo el mayor número de individuos infectados sino al mismo tiempo diferenciar entre infectados y vacunados, así como detectar las reacciones cruzadas.

La mayoría de las pruebas de laboratorio utilizan como antígenos suspensiones de *Brucella* en fase L o R, según la cepa bacteriana. Las cepas recomendadas por los organismos internacionales en la elaboración de los mismos son *B. abortus* 1119-3 ó S99. Estos antígenos permiten detectar anticuerpos anti *B. abortus*, *suis* y *melitensis* (Castro *et al.*, 2005). Hay que destacar que se considera poco fiable el diagnóstico serológico cuando se realiza durante el período comprendido entre las 2-3 semanas antes y después del parto (Radostits *et al.*, 2002).

Brucella comparte algunos antígenos con otras bacterias gramnegativas como *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9, *E. coli* O:116 y O:157, *F. tularensis*, *Salmonella* grupo N O:30, *Pseudomonas maltophilia* y *Vibrio cholerae*, y consecuentemente, pueden presentarse reacciones cruzadas en las pruebas de aglutinación (Rodríguez *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 2002).

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

a. Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT)

También llamada aglutinación en placa, es la más antigua (1897) y la más utilizada aún para el diagnóstico de brucelosis animal y humana. Es una prueba semi-cuantitativa que tiene una baja especificidad y sensibilidad y puede conducir a resultados negativos y reacción cruzada con bacterias gramnegativas (Garrido y Garrido, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Se recomienda su uso sólo en ausencia de otras técnicas alternativas (Corbel, 2006).

Para su ejecución se realizan diluciones crecientes del suero a investigar que se enfrentan con cantidades constantes de antígeno observándose la presencia o no de aglutinación luego de un período de incubación. De esa forma se determina el título como la máxima dilución aglutinante. Utiliza una suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5% como antígeno, tamponada a un pH entre 6 y 7. Detecta anticuerpos IgM, IgG1 e IgG2. No existe un acuerdo en cuanto al título que indica una infección activa (Castro *et al.*, 2005).

b. Aglutinación con y sin 2-Mercaptoetanol (2-ME)

Es una variante de la prueba anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor que inactiva los anticuerpos de clase IgM. Posee una buena especificidad y puede presentar una buena sensibilidad (Samartino *et al.*, 2007).

Para realizar esta prueba se ejecutan simultáneamente las pruebas de aglutinación en tubo con y sin tratamiento del suero con 2-ME. La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM. Para esta prueba se utiliza una suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5% como antígeno y se detecta anticuerpos IgG e IgM. El título es significativo cuando es mayor de 1:20 (Castro *et al.*, 2005).

Las desventajas de esta prueba son el tiempo para su ejecución, el gran volumen que se necesita de reactivos y material de vidrio, y la utilización de reactivos tóxico (Samartino *et al.*, 2007).

c. Prueba del anillo en la leche

Es una prueba realizada sobre grandes volúmenes de leche para descubrir infecciones en el hato y es muy barata. Es sensible aunque puede no ser muy fiable en rebaños grandes mayores a 100 animales (Quinn *et al.*, 2002; Radostits *et al.*, 2002). Detecta anticuerpos IgM e IgA (IgG1). Para su ejecución un pequeño volumen de leche es mezclado con el antígeno teñido con hematoxilina o tetrazolio trifenílico y se tampona a un pH 3.3 a 3.7 (Garrido y Garrido, 2002). Si el anticuerpo específico está presente en la leche, se unirá al antígeno y formará un anillo azul en la base de la columna de leche (Corbel, 2006). Esta prueba produce reacciones falsas positivas en vacas vacunadas muy recientemente o en muestras alteradas con calostro o con problemas de mastitis (Garrido y Garrido, 2002).

Esta prueba también ha sido analizada con relación a su aplicación para el diagnóstico individual de brucelosis bovina, sin embargo, ha demostrado un alto porcentaje de resultados falso positivos (Silva *et al.*, 2007).

d. Reacción de Huddleson o aglutinación rápida en placa

Para realizar esta prueba se enfrentan cantidades decrecientes del suero a investigar con cantidades constantes de antígeno y se observa la presencia o no de aglutinación. Se utiliza una suspensión de *B. abortus* al 3 -10% de gérmenes en fenol, con verde brillante y cristal violeta como antígeno. Se detectan anticuerpos IgM, IgG1, IgG2 e IgA. El título es significativo cuando es mayor de 1:40. En ocasiones se observa el fenómeno de prozona, donde puede estar ausente la aglutinación en los títulos más altos a causa de un

exceso de anticuerpos. Este hecho debe tenerse en cuenta para evitar falsos resultados negativos por esa causa (Castro *et al.*, 2005).

e. Prueba Rosa de Bengala

Es la prueba más difundida, cualitativa, rápida, barata, de ejecución simple en placa y es utilizada como prueba tamiz porque permite el procesamiento de un gran número de muestras por día. Posee una óptima sensibilidad, una buena especificidad y detecta infecciones precoces (Radostits *et al.*, 2002; Acha y Szyfres, 2003; Samartino *et al.*, 2007).

Para su realización se pone en contacto una parte del suero (30 μ l) con 30 μ l de antígeno y se observa la presencia de aglutinaciones. Esta prueba utiliza como antígeno suspensiones de *B. abortus* al 8,5%, ajustadas a pH 3.6, con el agregado del colorante Rosa de Bengala en tampón lactato muy ácido. Detecta anticuerpos IgM e IgG1. Se informa como positiva o negativa y requiere la confirmación mediante fijación de complemento o ELISA (Garrido y Garrido, 2002; Quinn *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2005).

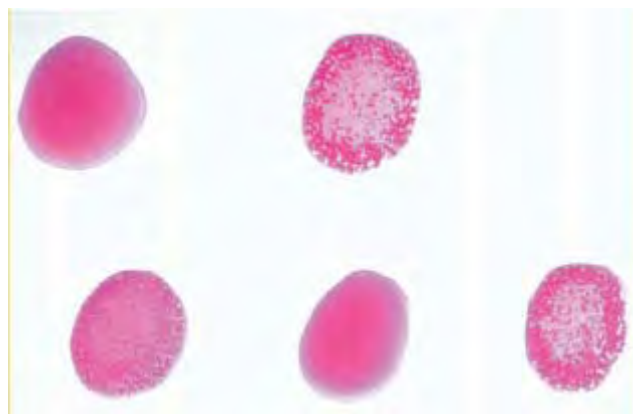


Figura 5. Prueba Rosa de Bengala, donde se muestra la reacción de aglutinación. Fuente: Corbel (2006).

Las reacciones falsas positivas se deben a la actividad residual de anticuerpos de la vacunación, a la presencia de anticuerpos del calostro en

terneros, a reacciones cruzadas con ciertas bacterias y a errores de laboratorio (Radostits *et al.*, 2002).

f. Prueba de antígeno tamponado en placa (BPA)

Es otra de las pruebas tamices que se realiza en placa. Se ponen en contacto 80 µl de suero con 30 µl de antígeno y se observa la presencia de aglutinación. Para esta prueba se utiliza una suspensión de *B. abortus* al 11% con cristal violeta y verde brillante. Detecta anticuerpos IgM e IgG1. Se informa como positiva o negativa según el resultado de la aglutinación (Castro *et al.*, 2005).

g. Prueba de Coombs (Prueba de la antiglobulina)

Es una prueba de aglutinación en tubo que permite detectar tanto anticuerpos completos como incompletos o carentes de poder aglutinante (IgM, IgG1 e IgG2). Es una técnica muy laboriosa y no muy útil frente a sueros de bovinos (Garrido y Garrido, 2002). Para su ejecución se realizan diluciones seriadas del suero a investigar, que se incuban con una suspensión antigénica de *B. abortus* para que se produzca la aglutinación mediada por los anticuerpos completos. Las suspensiones correspondientes a las diluciones mayores se lavan adecuadamente y se agrega un suero anti-especie (Coombs) para detectar de esta forma la aglutinación mediada por los anticuerpos incompletos. Para esta prueba se utiliza una suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5% como antígeno (Castro *et al.*, 2005).

h. Fijación de complemento

Es una prueba altamente sensible y específica, de referencia internacional y es confirmatoria para animales individuales (Quinn *et al.*, 2002), pero es lenta,

compleja, difícil de estandarizar (Dragui, 2002; Acha y Szyfres, 2003) y necesita de un buen laboratorio y personal entrenado (Corbel, 2006). Presenta mejor correlación con los aislamientos en animales natural o experimentalmente infectados, lo que la hace la prueba de referencia para la validación de otras pruebas serológicas (Samartino *et al.*, 2007).

En la primera etapa de la reacción se incuban diluciones del suero inactivado con el antígeno y el complemento. En la segunda etapa se agrega el sistema hemolítico y se compara la hemólisis con los estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis (Figura 6). Puede utilizarse una dilución 1:200 del antígeno empleado en la reacción de Huddleson (1119-3), o un antígeno soluble denominado HS que se prepara a partir de una suspensión bacteriana tratada con solución salina caliente. Esta prueba detecta anticuerpos IgG1. El título significativo es mayor de 1:20 (Castro *et al.*, 2005).

La prueba de fijación de complemento casi nunca ofrece resultados inesperados y es muy útil para diferenciar títulos debidos a la vacunación de aquellos debidos por la infección. Además, tras una infección natural, los títulos para la fijación de complemento no disminuyen si la enfermedad se torna crónica (Radostits *et al.*, 2002).

Adone *et al.* (2002) decidieron verificar la eficiencia de la prueba de fijación de complemento utilizando una preparación combinada de la cepa 99 lisa (S99) de *Brucella abortus* con la cepa RB51 rugosa de *B. abortus* como antígeno para detectar bovinos vacunados o infectados. El análisis comparativo con las pruebas de fijación de complemento que utilizaron los antígenos S99 y RB51 separadamente, mostró que no ocurría una reducción de la sensibilidad o de la especificidad cuando era utilizada la combinación S99/RB51, indicando que estos antígenos combinados podrían ser utilizados en los sistemas de vigilancia para mejorar la eficiencia de los análisis preliminares en los hatos al poder detectar cepas lisas y rugosas.

Adicionalmente, se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del antígeno utilizado en la prueba de fijación de complemento (Mathias *et al.*,

2007), que analizó 14 lotes del antígeno 1119-3 con una antigüedad de 9 meses hasta más de 23 años mantenidos en refrigeración. Estos lotes se compararon con un lote producido 9 meses antes del análisis. Los lotes más antiguos dieron una mayor proporción de títulos séricos que fueron exactamente iguales a los títulos del lote de referencia y los antígenos producidos 4 años dieron la menor proporción de sueros con el mismo título del lote de referencia, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados muestran que la mayoría de sueros tuvo similares resultados con todos los lotes de antígenos evaluados y que no hay relación entre el período de fabricación del antígeno y los resultados de las pruebas.

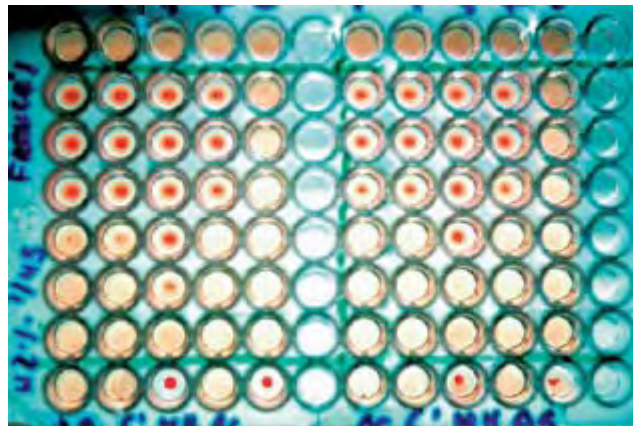


Figura 6. Prueba de fijación de complemento. Fuente: Corbel (2006).

i. Inmunofluorescencia indirecta

Es una prueba de interacción primaria. Para su realización se incuban diluciones crecientes del suero a investigar sobre una impronta de *Brucella*. Se agrega luego el anticuerpo anti-especie marcado con una sustancia fluorescente y se observa en un microscopio de fluorescencia, determinándose el título. Utiliza como antígeno una suspensión de bacterias fijadas a un portaobjeto y detecta anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes. El título significativo es mayor de 1:80 (Castro *et al.*, 2005).

j. Prueba de ELISA

Es una técnica altamente sensible, específica y versátil, emplea muy pequeña cantidad de suero y da muy buenos resultados aun en presencia de hemólisis. Para brucelosis puede utilizarse la prueba de ELISA indirecta (ELISA-I) como prueba confirmatoria (Quinn *et al.*, 2002) o la prueba de ELISA competitiva (ELISA-C) (Castro *et al.*, 2005). Esta última prueba es capaz de diferenciar animales vacunados con la cepa 19 de los animales infectados con cepas de campo (Dragui, 2002; Quinn *et al.*, 2002; Samartino *et al.*, 2007).

La especificidad de la prueba de ELISA ha sido estimada en 99.7% y una sensibilidad del 98.6%, lo que la hace comparable si no superior a las pruebas como fijación de complemento, 2-ME y la prueba del antígeno tamponado en placa (Saravi *et al.*, 1995).

Por otro lado, debe ser destacado que aunque la prueba de ELISA es más sensible que la prueba Rosa de Bengala, algunas veces no detecta animales infectados que son positivos a dicha prueba. También es importante señalar que la prueba de ELISA es sólo marginalmente más específica que Rosa de Bengala o Fijación de Complemento (Corbel, 2006).

En la prueba de ELISA-I el antígeno se fija a placas de poliestireno, se incuba con el suero a investigar, posteriormente se incuba también con un anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas. Los antígenos pueden ser particulados o solubles, LPS u otras proteínas bacterianas, aunque se recomienda el LPS-L de la cepa 99 de *B. abortus*. Esta prueba detecta anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes aún en muestras de leche (Garrido y Garrido, 2002; Castro *et al.*, 2005).

Una prueba de ELISA-I para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* ha sido validada en muestras de leche y suero de bovinos. Para las muestras de leche se determinó una sensibilidad de 99.6% y una especificidad

de 99.1% a 100%. Para las muestras séricas, la sensibilidad fue del 99.6% y la especificidad de 98.6%. Esta prueba utiliza un lipopolisacárido liso de *B. abortus* como antígeno (Nielsen *et al.*, 1996; Vanzini *et al.*, 1998).

En la prueba ELISA-C se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo O del LPS-L, que compite con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima. Esta prueba detecta anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes. Se consideran positivos aquellos sueros con un porcentaje de inhibición mayor del 28% (Castro *et al.*, 2005).

Se han descritos pruebas de ELISA-C para diferenciar la respuesta de anticuerpos de bovinos vacunados con la cepa 19 y bovinos infectados con *B. abortus*. Para esta prueba se puede utilizar lipopolisacárido o proteínas recombinantes A y G de receptores de inmunoglobulina G como antígeno y un conjugado IgG de cabra anti-ratón para la detección. La especificidad de esta prueba ha sido determinada en 99.7% y la sensibilidad en 100% y además, la prueba no ha demostrado reacción cruzada cuando se analizan sueros positivos para anticuerpos contra algunas enterobacterias (Nielsen *et al.*, 1995; Portanti *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2008).

k. Prueba de inmunodifusión en agar gel (AGID)

Es una técnica de doble difusión en geles. Es rentable por su simplicidad y bajo costo y puede realizarse en laboratorios no especializados (Garrido y Garrido, 2002). Se efectúa la reacción de doble difusión del suero a investigar frente a un suero control observando las reacciones de identidad. Utiliza antígeno soluble HS. Detecta anticuerpos IgG e IgM (Castro *et al.*, 2005).

Se ha investigado la efectividad de la prueba de inmunodifusión en agar gel sobre la detección de bovinos vacunados con la cepa 19. La sensibilidad y especificidad fueron comparadas con pruebas serológicas convencionales

como Rosa de Bengala, la prueba de aglutinación en tubo y fijación de complemento. Los resultados indicaron que el 90% de sueros de los bovinos vacunados fueron positivos por las pruebas convencionales 3 meses después de la vacunación, pero fueron negativos por la prueba AGID, sugiriendo que la prueba AGID puede ser útil para diferenciar animales infectados y animales vacunados (Erdenebaatar *et al.*, 2002).

La prueba de inmunodifusión en agar gel ha sido validada para su utilización en bovinos utilizando un polisacárido de *B. abortus* 119-3, demostrando una buena habilidad para diferenciar animales vacunados. Esta prueba es comparable a las pruebas de aglutinación en placa, aglutinación en tubo, Rosa de Bengala y 2-ME, con una mayor sensibilidad, aunque menor especificidad para la detección de brucelosis bovina, lo que la hace una promisoría alternativa para el diagnóstico complementario (Daffner *et al.*, 1999; Megid *et al.*, 1999).

Sin embargo, el estudio realizado por Costa *et al.* (1999) utilizando el polisacárido O con el objetivo de diferenciar anticuerpos vacunales por la infección con *B. abortus*, determinó que esta técnica no puede diferenciar con absoluta confiabilidad dichos anticuerpos vacunales, por lo que la prueba AGID como prueba confirmatoria podría causar el mantenimiento de animales infectados en el hato.

I. Prueba de polarización fluorescente

Esta técnica puede realizarse en sangre entera y leche y puede ser ejecutada en un laboratorio simple o en el campo. Es rápida y de fácil ejecución, requiere poco volumen de suero y no es afectada por la hemólisis (Dajer *et al.*, 1999; Dragui, 2002; Samartino *et al.*, 2007).

El fundamento de esta prueba se basa en una rotación aleatoria y el tamaño molecular es el principal factor que influye en la velocidad de esta rotación. Los

anticuerpos al unirse al antígeno cambian la velocidad de rotación de la molécula. Si se hace incidir un haz de luz fluorescente polarizada, el ángulo de difracción cambia en función del anticuerpo unido. Este cambio es medido por un detector que lo traduce en una señal (Figura 7). Emplea el antígeno PSO de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína. La interpretación de esta prueba es similar al ELISA-I (Castro *et al.*, 2005; Samartino *et al.*, 2007).

Esta prueba tiene la ventaja de su facilidad de implementación y rapidez de ejecución lo que permite obtener un diagnóstico rápido y preciso en pocos minutos. También puede diferenciar animales vacunados con la cepa 19 de los animales infectados con cepas de campo (Samartino *et al.*, 2007), y tiene una alta sensibilidad y especificidad, con lo que se podría evitar el sacrificio de un gran número de animales en los programas nacionales de erradicación de la enfermedad (Dajer *et al.*, 1999).

Para evaluar la prueba de polarización fluorescente, Nielsen *et al.* (1998) analizaron varios grupos de sueros bovinos pertenecientes a diversos países como Argentina, Chile, México, Estados Unidos y Canadá, tanto de animales infectados con cultivos positivos a *Brucella abortus* como de animales negativos a diversas pruebas como Rosa de Bengala y fijación de complemento. La sensibilidad de la polarización fluorescente para los animales con cultivos positivos fue desde 87.5% hasta 100% y la especificidad fue del 88%. Respecto a los sueros provenientes de Canadá, país donde la brucelosis bovina ha sido erradicada hace más de 10 años, la sensibilidad y la especificidad llegaron al 100%, con la conclusión de que la prueba de polarización fluorescente es potencialmente útil como una prueba serológica para el diagnóstico de la infección por *Brucella abortus*.

Polarización Fluorescente

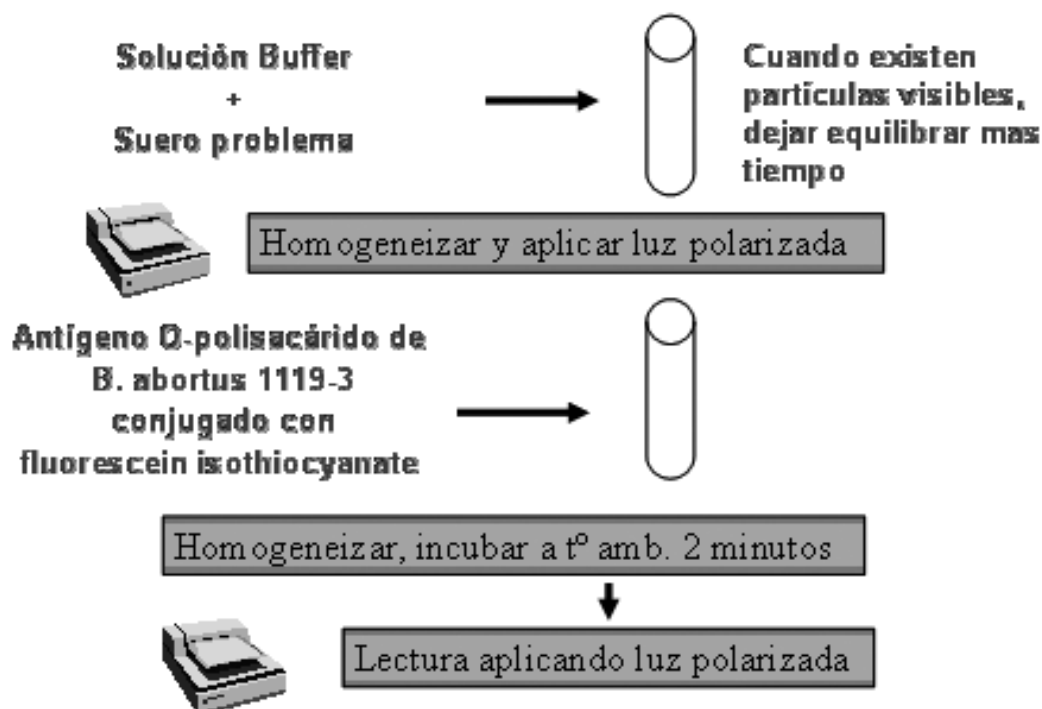


Figura 7. Diagrama de ejecución de la prueba de polarización fluorescente. Fuente: Samartino *et al.* (2007).

m. Prueba de flujo lateral IgM/IgG de Brucella (LFA)

Esta prueba fue desarrollada originalmente para el serodiagnóstico de brucelosis humana y posteriormente se adaptó para el análisis en los animales susceptibles a la enfermedad. La prueba LFA es rápida y simple, altamente sensible y específica, no necesita de una experiencia o entrenamientos específicos, ni equipo caro, electricidad o refrigeración, haciéndola ideal para su uso en países de pobres recursos o áreas remotas sin acceso a laboratorios (Smits y Cutler, 2004).

El antígeno utilizado es una preparación de LPS de *B. abortus* cepa 1119-3 para capturar los anticuerpos séricos específicos. Los resultados de la prueba se leen a los 10 minutos de iniciada por inspección visual de la tinción de las

líneas de prueba y control en los pozos del aparato de prueba. Las pruebas son negativas cuando no es observada una tinción en la línea de prueba (Abdoel *et al.*, 2008).

n. Prueba de la brucelina

Es una prueba de hipersensibilidad retardada que requiere la inoculación intradérmica de una preparación antigénica (brucelina) que provoca, en caso de infección o vacunación) una reacción cutánea cuya interpretación es similar a la de la prueba de tuberculina. Es sensible y específica pero pueden ocurrir reacciones falsas positivas en animales vacunados. Puede utilizarse la preparación antigénica brucelina INRA o el Brucelergeno OCB. Es una prueba de utilidad en los establos que no vacunan (Garrido y Garrido, 2002; Corbel, 2006).

En un estudio realizado por Bercovich y Muskens (1999), se analizaron 896 bovinos de hatos libres de brucelosis y 96 bovinos pertenecientes a hatos infectados utilizando la prueba de brucelina. Se consideró un incremento ≥ 2 mm en el grosor de la piel para considerar la prueba positiva. Los resultados mostraron que 6 de los 896 bovinos no infectados salieron positivos en la prueba, indicando una especificidad de 99.3%. Entre los 96 bovinos infectados, 44 de estos salieron positivos serológica o bacteriológicamente, y de estos 44 bovinos, 33 fueron positivos con la prueba de brucelina, indicando una especificidad del 75%. El valor de esta prueba se demostró por su habilidad para detectar infecciones mucho antes que puedan ser detectadas por las pruebas serológicas y por confirmar la infección en bovinos con resultados serológicos ambiguos.

Se ha utilizado esta prueba cutánea con la cepa RB51 como antígeno, junto con un protocolo epidemiológico de investigación, para identificar más apropiadamente a los bovinos vacunados con la cepa RB51 (Tittarelli *et al.*, 2008).

o. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de *Brucella abortus*

Se ha utilizado la prueba de reacción en cadena de la polimerasa convencional y en tiempo real como potenciales herramientas para la detección de *Brucella abortus* en diferentes tipos de muestras en bovinos naturalmente infectados. Esta prueba amplifica variadas regiones del genoma de *Brucella*, ya sea en muestras de leche, sangre, semen o tejidos linfoides (O'Leary *et al.*, 2006).

La sensibilidad total de la PCR es más alta que el método de cultivo y su ejecución es más rápida (Hamdy y Amin, 2002), además, es ventajosa sobre otras técnicas debido a su habilidad para amplificar dentro de pocas horas una secuencia específica del patógeno presente a bajas concentraciones en una muestra complicada como lo es el semen. La detección de *Brucella* en el semen con una prueba tan sensible como la PCR eliminaría el uso de animales infectados como donadores de semen, asegurando con eso la salud reproductiva de las vacas inseminadas (Vinodh *et al.*, 2008).

Esta prueba también ha sido utilizada para diferenciar bovinos vacunados con la cepa RB51 de bovinos infectados con cepas de campo y adicionalmente diferenciar animales infectados con bacterias antigénicamente relacionadas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella urbana* y *Pasteurella multocida* (Adone *et al.*, 2001).

2.10. Diagnóstico diferencial

Todos los países que han calculado las pérdidas económicas de la brucelosis, han llegado a la conclusión que son millonarias, principalmente por los problemas de aborto (Dragui, 2002). Los agentes bacterianos más comunes involucrados en el aborto en bovinos son *Brucella abortus*, *Leptospira sp.*, *Campylobacter sp.* y *Salmonella sp.* (Rivera, 2001).

Otros agentes bacterianos aislados de abortos son *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Listeria monocytogenes* y *Ureaplasma diversum* (Syrjälä *et al.*, 2007). Según experiencias realizadas por distintos autores una vaca infectada produce un 20% menos de leche en relación con su potencial de producción por la interrupción de la lactancia debido al aborto y la concepción demorada (Dragui, 2002; Acha y Szyfres, 2003, Corbel, 2006).

Otras causas que deben ser descartadas en caso de un brote de abortos son los procesos causados por *Trichomonas fetus*, *Neospora caninum*, el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, *Aspergillus sp.*, y procesos de tipo nutricional y de isoinmunización de la preñez (Radostits *et al.*, 2002).

2.11. Prevención

Para brucelosis bovina, las medidas de prevención incluyen una estricta higiene en los establos, cuarentena de los animales recientemente adquiridos y un estricto programa de vacunación. Igualmente hay que tener una cuidadosa selección de los animales de reemplazo, estos deben ser adquiridos de hatos libres de *Brucella*. Las pruebas serológicas antes de la adquisición son necesarias a menos que los animales provengan de poblaciones en áreas que se sabe son libres de la enfermedad (Corbel, 2006).

2.11.1. Higiene

La meta de la aplicación de métodos de higiene para la prevención de la brucelosis bovina es la reducción de la exposición de animales susceptibles con aquellos que están infectados, o con sus descargas y tejidos. Los factores tales como los métodos de manejo animal, los patrones de comercio, la prevalencia de los signos clínicos, el tipo de instalaciones y el grado de dedicación de los propietarios también afectarán el éxito del control. Frecuentemente, los propietarios de los animales están pobremente informados

sobre la transmisión de la enfermedad y las recomendaciones para prevenirla. Medidas tales como la separación de los animales antes del parto pueden ser difíciles o imposibles de implementar (Corbel, 2006).

Se ha determinado que *Brucella sp.* es sensible a concentraciones de 0.5 a 1% de desinfectantes con grupos fenol, halógeno, amonio cuaternario y aldehído. Además, el gluconato de clorhexidina es un antiséptico eficaz contra *B. abortus* y se recomienda para el lavado de brazos y manos de manipuladores de animales y de veterinarios que entran en contacto con tejidos y material contaminado (Radostits *et al.*, 2002).

2.11.2. Cuarentena

Este es el período de tiempo durante el cual se restringen los movimientos del ganado y se realizan pruebas a todos los animales antes de mezclarlos con el resto del hato. La duración de la cuarentena debe ser lo suficientemente larga para que todos los animales dispongan de tiempo suficiente para desarrollar la enfermedad. Este período suele variar entre 30 y 120 días o hasta que todos los animales adultos hayan completado una gestación sin signos de infección (Radostits *et al.*, 2002; Corbel, 2006).

2.11.3. Vacunación

La vacunación es una herramienta fundamental para controlar la brucelosis. El objetivo de un programa de vacunación sistemática y obligatoria de terneras es reducir la tasa de infección y obtener hatos resistentes a la brucelosis, para luego emprender la erradicación. El lapso necesario para lograr ese objetivo se estima entre 7 y 10 años de vacunación sistemática de las terneras jóvenes (Acha y Szyfres, 2003). Esta medida se puede interrumpir cuando la prevalencia alcanza niveles bajos (Quinn *et al.*, 2002).

Los bovinos vacunados correctamente tienen menores probabilidades de infectarse que el resto de animales, y por lo tanto, no son una fuente de cepas naturales de la bacteria. A medida que se reduce el número de animales infectados en un rebaño, se reducen las posibilidades de exposición y por consiguiente, se reduce el número de nuevos casos (Radostits *et al.*, 2002). Por otro lado, hay que destacar que la reducción de la prevalencia de la brucelosis en los animales a través de la vacunación en masa también conducirá a la reducción de la brucelosis en la población humana (Smits y Cutler, 2004).

La vacunación de los animales usualmente resulta en la eliminación de la enfermedad clínica y la reducción en la cantidad de organismos excretados por los animales que llegan a ser infectados. Adicionalmente, es más probable que los propietarios de los animales acepten la vacunación como un método de control. En muchos países, la vacunación es la única medida práctica y económica de control de la brucelosis animal (Corbel, 2006).

Con el objetivo de prevenir la diseminación de la brucelosis, se han utilizado clásicamente cepas bacterianas atenuadas y componentes antigénicos propios de *Brucella* para el desarrollo de las vacunas. Las vacunas tradicionales en brucelosis han seguido dos líneas principales de desarrollo: las vacunas atenuadas vivas y las vacunas inactivadas o bacterinas (homólogas o heterólogas); en ambos casos se trata de vacunas celulares (bacteria entera) (Cuadro 5) (Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006).

Por medio de estudios con vacunas vivas de *Brucella* en animales y humanos, fue demostrado que las vacunas vivas desempeñan un importante papel en la prevención y control de la brucelosis, sin embargo, también fue hallado que las vacunas vivas de *Brucella* tienen desventajas tales como ser inestables y algunas veces causar casos de brucelosis en los animales vacunados; no poder diferenciar una respuesta vacunal de una infección natural con algunas de las pruebas disponibles rutinariamente; algunas vacunas vivas no pueden ser utilizadas en animales preñados y en lactación;

algunas vacunas vivas causan alergias parecidas a la infección con *Brucella* virulenta (Dequiu *et al.*, 2002).

Cuadro 5. Principales características de las cepas bacterianas más utilizadas en la vacunación contra brucelosis bovina

| Cepas vacunales | |
|--|--|
| S19 | RB51 |
| Cepa lisa | Cepa rugosa, más atenuada que S19 |
| Posee la cadena O en su LPS | No posee la cadena O en su LPS |
| Genera anticuerpos que interfieren en las pruebas diagnósticas impidiendo diferenciar entre un animal vacunado y otro infectado. | Los anticuerpos que genera no interfieren en las pruebas diagnósticas. |
| Puede provocar abortos en el 1.4% de los casos en vacas preñadas. | Provoca abortos en el 0.1% de las vacas preñadas. |

Modificado de Castro *et al.* (2005)

Contrariamente, el empleo de vacunas atenuadas asegura la inducción de una respuesta inmunitaria completa contra un gran número de componentes y una re-estimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria (Estein, 2006). Además, no se han reportado problemas a nivel linfocítico en los animales vacunados con las cepas convencionales de *B. abortus* (Kunkle *et al.*, 1995).

La fuente y calidad de las vacunas también son críticas en un programa de vacunación. La dosificación y los métodos de administración varían de acuerdo a los animales y esto puede afectar los resultados globales. Por ejemplo, frecuentemente es recomendado que la vacunación con la cepa 19 debe estar limitada a las hembras sexualmente inmaduras. Esto es para minimizar la estimulación de los anticuerpos post-vacunales que pueden confundir la interpretación de las pruebas diagnósticas y también para prevenir posibles abortos inducidos por las vacunas en los animales adultos (Corbel, 2006). Asimismo, las vacunas liofilizadas son mejores que las vacunas líquidas por su mayor estabilidad y longevidad, pero deben mantenerse en refrigeración en todo momento y sólo deben reconstituirse cuando se necesiten (Radostits *et al.*, 2002).

En el diagnóstico de la brucelosis bovina es de especial interés conocer la evolución de las inmunoglobulinas en la infección y en la vacunación. En ambas aparecen primero las IgM y luego las IgG. La diferencia es que mientras en la infección las IgG tienden a incrementarse y a persistir, en las terneras vacunadas entre los 3 y 8 meses de edad, las IgG tienden a desaparecer alrededor de los seis meses después de la vacunación (Rojas *et al.*, 2001; Acha y Szyfres, 2003).

También se ha reportado que la vacunación contra otros agentes infecciosos podría interferir en la vacunación contra brucelosis. En Argentina se ha demostrado que una parte de los bovinos sometidos a controles sanitarios de brucelosis arrojan reacciones inespecíficas posteriores a una vacunación contra campilobacteriosis con la prueba de antígeno tamponado en placa (BPA) y la prueba de seroaglutinación en tubo de Wright (SAT). Los animales se mantienen reactivos entre los 46 y 59 días post-vacunación. Por lo tanto, la prevención de la campilobacteriosis por medio de vacunas aplicadas muy próximas a un control sanitario de brucelosis podría interferir con las técnicas diagnósticas de esta enfermedad, con la consecuente dificultad que ocasionaría para definir el destino de los animales (Jacobo *et al.*, 2002).

A continuación se describen las vacunas convencionales utilizadas en la inmunización de bovinos contra brucelosis:

a. *B. abortus* cepa 19

Esta es la vacuna de elección para la vacunación en bovinos, consagrada por su uso universal a pesar de ser una cepa viva atenuada lisa; confiere protección durante toda la vida útil del animal y tiene un bajo costo. Se recomienda la vacunación de animales de poca edad, terneras entre 3 y 8 meses, que pierden rápidamente los anticuerpos originados por la vacuna. En los animales adultos la vacunación conduce a la presencia de títulos altos que interfieren con el diagnóstico (Quinn *et al.*, 2002; Acha y Szyfres, 2003; Smits y Cutler, 2004).

Se estima que entre el 65 al 80% de los animales quedan protegidos contra el aborto y un 55% contra la infección cuando se vacunan con la cepa 19. Ya que el efecto antiabortivo de la vacuna es muy pronunciado, se reduce una de las principales fuentes de infección (Dragui, 2002; Acha y Szyfres, 2003; Estein, 2006).

Los anticuerpos específicos producidos contra este antígeno vacunal son de tipo IgG1, IgG2b e IgM. Sin embargo, los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa interfieren con el diagnóstico tradicional de bovinos infectados con cepas de campo de *B. abortus*, por lo que tiene un uso limitado en la vacunación del ganado; esta cepa puede también inducir aborto en hembras preñadas y es patógena para la especie humana (Radostits *et al.*, 2002; Smits y Cutler, 2004; Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006).

En un programa de vacunación sistemática, los mejores resultados se obtienen cuando se logra una cobertura anual de 70 a 90% de las terneras en edad de ser vacunadas. No deben vacunarse los machos ni las hembras de más de 8 meses de edad. Como se mencionó anteriormente, tampoco se recomienda la revacunación (Acha y Szyfres, 2003) ya que esta vacuna aglutinógena induce anticuerpos que interfieren con las pruebas serológicas de rutina, impidiendo la diferenciación entre animales infectados y vacunados.

Al respecto, se han implementado modificaciones en la forma de administración de esta vacuna: reducción de la dosis inyectada, permitiendo vacunar animales púberes sin consecuencias serológicas duraderas; el uso de la vía conjuntival ha mostrado inducir buena inmunidad con una respuesta serológica de corta duración, permitiendo incluso la revacunación. Finalmente, la restricción etaria, (vacunación de animales pre-púberes) con dosis completa, permite la diferenciación de la mayoría de los animales vacunados, a partir de una cierta edad y mediante el uso de técnicas complementarias (Estein, 2006).

Se han realizado diversos estudios sobre la vacuna cepa 19, su utilización y dosis de administración. Bustamante *et al.*, en el año 2000, realizaron un estudio para determinar mediante diversas pruebas diagnósticas si los

anticuerpos que se presentan en bovinos adultos revacunados con dosis reducida de la cepa 19 de *B. abortus* son debidos a una infección o a la vacunación e intentaron el aislamiento para determinar su especie y biotipo. No obstante, concluyeron que las pruebas oficiales como fijación de complemento o inmunodifusión no son adecuadas para diferenciar sueros de vacas revacunadas con la cepa 19.

Jardim *et al.* (2006) en Brasil, evaluaron el uso de una dosis reducida de la cepa 19 de *B. abortus* en un hato de animales adultos utilizando la prueba de fijación de complemento, Rosa de Bengala, 2-ME y ELISA. Ellos concluyeron que esta vacunación influyó en el diagnóstico serológico con las pruebas utilizadas y que ninguna de las técnicas alcanzó una especificidad adecuada para su uso bajo aquellas condiciones, hasta 3 meses después de la vacunación. Por lo tanto, la vacunación de animales adultos con una dosis reducida de la cepa 19 interfiere con el diagnóstico serológico del rebaño.

En otro trabajo, vaquillas Nelore de 18 meses de edad fueron vacunadas con la dosis estándar de la cepa 19 y se evaluó la persistencia de los títulos de anticuerpos con pruebas como aglutinación en placa, Rosa de Bengala y fijación de complemento. Un año después de la vacunación, la mayoría de las vaquillas no mostró títulos significativos de anticuerpos. Considerando el riesgo al que están sujetos los animales de áreas endémicas y de hatos infectados, y considerando la clara reducción de los títulos serológicos de anticuerpos, es asumido que en el caso de las vaquillas Nelore que no hubieran sido vacunadas entre los 3 y 8 meses de edad, sería razonable vacunarlas a los 18 meses de edad si están expuestas a un alto riesgo de infección por *Brucella* (Mathias *et al.*, 2001).

b. *B. abortus* cepa 45/20

La cepa 45/20 es una cepa rugosa, avirulenta, fue desarrollada por 20 pasajes repetidos de *Brucella abortus* 45 en cobayos. A pesar de que no

induce anticuerpos contra la cadena O del LPS e induce una protección significativa contra la infección por *Brucella abortus*, no es muy utilizada porque es inestable y puede revertir a su forma virulenta *in vivo*, motivo por el cual es utilizada como una vacuna muerta. La cepa 45/20 también ha sido utilizada en forma inactiva pero adicionada junto a un adyuvante oleoso, que ha demostrado una relativa efectividad, pero provoca una reacción inflamatoria local en el sitio de la inyección (Smits y Cutler, 2004; Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006).

Esta cepa es menos eficaz que la vacuna cepa 19, pero ha sido utilizada en algunos planes de erradicación. La vacuna cepa 45/20 se puede utilizar durante un brote para inmunizar animales seronegativos y se debe administrar en dos dosis con un intervalo de 6 meses (Radostits *et al.*, 2002). Cuando se administra a animales adultos no induce un título persistente de anticuerpos (Quinn *et al.*, 2002).

c. *B. abortus* RB51

Brucella abortus RB51 es una cepa rugosa, resistente a rifampicina, que ha sido derivada de la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308. Esta vacuna es recomendada actualmente para el uso como vacuna para terneros a una dosis entre 1×10^{10} y 3.4×10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) (Olsen *et al.*, 1999). Adicionalmente, origina buena protección contra abortos y no produce un resultado detectable en las pruebas serológicas utilizadas en los programas convencionales de vigilancia contra brucelosis, lo que constituye una ventaja sobre la vacuna cepa 19 (Dragui, 2002; Quinn *et al.*, 2002; Rivers *et al.*, 2006).

La protección que proporciona la vacunación con esta cepa se debe a la activación de linfocitos T. La vacunación induce altos niveles de IFN- γ , lo cual es fundamental en las etapas primarias de la infección. La vacunación del ganado permite la diferenciación entre bovinos vacunados y aquellos

infectados con cepas de campo debido a que no induce anticuerpos contra la cadena O del lipopolisacárido (Rivers *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha determinado que puede causar placentitis, endometritis e infección fetal en vaquillas adultas que han sido vacunadas durante la preñez (Rivers *et al.*, 2006), aunque otros estudios indican que esta cepa atenuada no produce abortos cuando se inmunizan hembras preñadas. Además, parecería ser de baja virulencia para el hombre, se aplica en una sola dosis y genera protección aún aplicada en forma oral (Castro *et al.*, 2005).

La cepa RB51 es usada actualmente en Estados Unidos, Chile, Colombia, Costa Rica, México, Venezuela y Uruguay para el control de la brucelosis bovina. En Argentina se utiliza en forma voluntaria y tiene un permiso provisional. Sin embargo, los datos de protección en bovinos son contradictorios y dependen de la vía de administración, la dosis, la edad del animal vacunado y la prevalencia de la enfermedad en el hato (Ramírez *et al.*, 2002; Corbel, 2006; Estein, 2006).

En un estudio llevado a cabo por Olsen *et al.* (1999), doce vaquillas fueron vacunadas subcutáneamente con la cepa RB51. La cepa vacunal fue recuperada del nódulo linfático cervical superficial 14 semanas después de la vacunación en dos de los seis animales que recibieron la dosis de 1.6×10^{10} UFC de RB51, pero no de alguno de los animales vacunados con la dosis de 3.2×10^{10} . La mayor dosis de RB51 estimuló un mayor título de anticuerpos.

En un segundo estudio realizado por Olsen (2000), fue evaluada la eficacia de una dosis reducida de la cepa RB51 en bovinos adultos. Fueron vacunadas vaquillas Hereford con tres regímenes de dosis de RB51: 3×10^9 UFC una vez, 1×10^9 UFC una vez o 1×10^9 UFC dos veces. Otra vez, los bovinos vacunados con la mayor dosis de RB51 tuvieron una mayor respuesta de anticuerpos y mayores respuestas linfoproliferativas que los otros tratamientos de RB51. Luego del desafío con la cepa virulenta 2308, cuatro de seis vaquillas control abortaron a mitad de la preñez y fue recuperada la cepa 2308 de los tejidos de estos 6 animales no vacunados. En comparación, no fue recuperada

la cepa 2308 ni la cepa RB51 de los tejidos de las vaquillas vacunadas con ninguna de las dosis de RB51. Los datos sugieren que la vacunación con una dosis reducida de RB51 protege a los bovinos adultos contra el aborto o la infección causada por la exposición a *B. abortus* virulenta durante la consiguiente preñez.

2.11.3.1. Comparación de la respuesta inmune entre las cepas 19 y RB51

Se han ejecutado variados estudios para comparar las respuestas inmunes de los animales vacunados con las principales vacunas contra la brucelosis bovina. Stevens *et al.* (1995) midieron las respuestas inmunes después de 12 semanas de la vacunación de bovinos ya sea con la cepa 19 o RB51. Los bovinos vacunados con la cepa 19 produjeron anticuerpos que aglutinaron con el antígeno 1119-S en la prueba de aglutinación en tubo, pero los bovinos vacunados con la cepa RB51 no produjeron anticuerpos aglutinantes. Luego, fueron obtenidas mediante biopsia muestras de células del nódulo linfático cervical superficial de estos bovinos y se incubaron *in vitro* con la cepa 2308 de *B. abortus*, mostrando similares respuestas proliferativas. Estos resultados sugieren que los bovinos vacunados con la cepa 19 o con la cepa RB51 tienen similares respuestas inmunes, pero a diferencia de la cepa 19, la cepa RB51 no induce resultados positivos en la prueba de aglutinación en tubo utilizada para el diagnóstico de brucelosis en bovinos.

Por otro lado, Samartino *et al.* (2000), revacunaron terneras ya sea con la cepa 19 o con la cepa RB51, que ya habían sido vacunadas anteriormente con la cepa 19 de *B. abortus*. Todos los animales revacunados con la cepa 19 seroconvirtieron, mientras que ninguno de los animales revacunados con la cepa RB51 seroconvirtieron. Además, 8% de los animales revacunados con la cepa 19 abortaron, mientras que no hubo abortos en el grupo de animales vacunados con la cepa RB51 y cuatro de los 25 animales revacunados con la cepa 19 diseminaron dicha cepa vacunal en la leche por al menos 7 días,

mientras que sólo 1 vaca de las vacunadas con la cepa RB51 diseminó esta cepa vacunal por la menos 3 días post-parto, concluyendo que la revacunación de terneros utilizando la cepa RB51 y vacunados anteriormente con la cepa 19 parece ser un procedimiento seguro sin consecuencias negativas para el diagnóstico.

El estudio realizado por Poester *et al.* (2000) confirma las observaciones previas de que los bovinos adultos, preñados o no, no seroconvierten en las pruebas tradicionales para brucelosis después de la vacunación con la cepa RB51. Es de interés destacar que la revacunación no cambia el estado serológico convencional, indicando que las vacunaciones múltiples con la cepa RB51, de adultos normales o bovinos preñados, pueden ser realizadas sin afectar los resultados serológicos. Esta característica es de importancia práctica ya que permite la revacunación de animales para incrementar la inmunidad sin consecuencias serológicas.

Ramírez *et al.* (2002) compararon la respuesta serológica y el tiempo de saneamiento en hatos bovinos con brucelosis, vacunados con la cepa 19 o con la cepa RB51. Los hatos se habían incorporado al Programa de Erradicación de Brucelosis Bovina entre 1996 y 1999, y al momento de este estudio se encontraban bajo la condición de “hato saneado”. Se evaluaron las seroprevalencias, el tiempo de saneamiento y los intervalos de tiempo dentro de éste, el número de análisis y el lapso de tiempo entre los análisis de animales vacunados con la cepa 19 y con la cepa RB51. Por conclusión se determinó que el uso de la cepa RB51 y las políticas de control asociadas a su uso reducen el tiempo de saneamiento y el número de análisis para brucelosis bovina.

2.11.3.2. Vacunas sectorizadas o de subunidades

Las vacunas de subunidades, llamadas también vacunas de componentes, contienen únicamente fragmentos particulares del microorganismo patógeno y

no el organismo completo. Actualmente, se pueden utilizar estos componentes purificados (proteínas, péptidos o ADN) derivados de los microorganismos y se elaboran vacunas por técnicas de biología molecular (Dellamea, 2006). Las ventajas de este tipo de vacunas son su baja seroreactividad y el débil potencial para producir alergias (Deqiu *et al.*, 2002).

a. Vacunas de ADN

La inmunización con ácido desoxirribonucleico (ADN) representa un nuevo enfoque para el desarrollo de vacunas. En la inmunización genética el antígeno es naturalmente procesado y presentado por las vías endosómica y citosólica, promoviendo así respuestas mediadas por anticuerpos y células. Se inyecta directamente al organismo fragmentos de ADN que contienen genes de *Brucella*. Las células absorben ese ADN y lo usan para producir proteínas de *Brucella*. Estas proteínas estimulan al organismo para que produzca una respuesta inmunitaria de defensa contra la enfermedad (Dellamea, 2006; Estein, 2006).

El empleo de estas vacunas tiene la ventaja de generar una respuesta específica contra las proteínas codificadas por el ADN en la célula, eliminando por lo tanto el riesgo de infección; son muy estables y resistentes a los cambios de temperatura a diferencia de las vacunas convencionales. Finalmente, la producción a gran escala se puede efectuar por métodos estandarizados, relativamente simples y económicos (Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006).

Aunque estas vacunas inducen una respuesta inmune de perfil Th1, no se han logrado los niveles de protección obtenidos con las vacunas vivas atenuadas para brucelosis (Estein, 2006).

b. Vacunas de ARN

Además de los vectores plasmidiales, existen otros vectores de expresión como los basados en el virus Semliki Forest (SFV). Estos vectores son partículas virales suicidas del SFV, cuyo genoma corresponde a un ARN desnudo auto-replicable, cuya secuencia contiene inserto el gen de interés que codifica para la proteína con capacidad inmune. Experimentos previos han demostrado la alta eficiencia de estos sistemas de expresión para expresar proteínas heterólogas en células eucariotas, así como también la capacidad para conferir excelentes niveles de protección en animales inmunizados con estos sistemas de expresión, superando incluso a las vacunas ADN (Rivers *et al.*, 2006).

2.11.3.3. Vacunas subcelulares

Se han probado distintos antígenos de *Brucella* en su capacidad de inducir respuesta inmune mediada por células. Estos antígenos forman parte de la estructura de la bacteria, como la lipoproteína de 18 kDa presente en la superficie de *Brucella*, la proteína periplásmica P39, la proteína bacterioferritina y la proteína ribosomal L7/L12, que produce una protección equivalente a la alcanzada con la cepa 19 de *B. abortus* en ratones, con activación de células T CD4+ que secretan niveles significativos de IFN- γ . También se han probado las proteínas de choque térmico, como las proteínas UvrA, GroEL, GroES y HtrA de *B. abortus*, ya que se ha encontrado que éstas son altamente inmunogénicas en el curso de la infección con *Brucella*, estimulando tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral en el huésped infectado (Saldarriaga *et al.*, 2002).

No obstante, los componentes anteriormente mencionados no son capaces de estimular una respuesta inmune protectora eficiente frente a la infección con *Brucella*. Los mejores resultados se han obtenido con la proteína de 18,5 kDa, SOD Cu-Zn de *B. abortus*, que es capaz de inducir una respuesta celular de

tipo Th1, con inducción de la producción de IFN- γ e IL-2, pero no de IL-4 (Rivers *et al.*, 2006).

Las vacunas subcelulares reúnen importantes ventajas: son seguras e inocuas, ya que no existe posible reversión a la forma de campo como en las vacunas vivas atenuadas, ni peligro de transmisión a animales sanos; son más específicas, ya que en su diseño deberían ser incluidos antígenos diferentes a los empleados en el serodiagnóstico para poder distinguir animales infectados de vacunados; son eficaces, debido a que sólo incluyen aquellos antígenos capaces de inducir inmunidad protectora y adyuvantes o citoquinas que mejoren su presentación, dirigiendo asimismo el impacto sobre el sistema inmunitario (Estein, 2006).

2.12. Control y erradicación de la brucelosis bovina

Las justificaciones para la prevención y control de la brucelosis en las poblaciones animales son las mismas que para el control de la enfermedad en la población humana: beneficios económicos y la protección de la salud pública (Corbel, 2006). Los costos de un programa de control incluyen: la compensación por los animales sacrificados, los honorarios del equipo de profesionales veterinarios, los materiales utilizados, los costos de laboratorio y los costos administrativos (Bernués *et al.*, 1997).

El control de la brucelosis se apoya en la identificación de los animales infectados y en la eliminación de los mismos. Asimismo, la vacunación de los animales indemnes constituye un importante pilar en un plan de control para que en una etapa posterior, la enfermedad pueda ser erradicada (Estein, 2006). Sin embargo, la vacunación sola no es suficiente y debe ser acompañada por otras medidas tales como la restricción y control del movimiento y comercio de animales, sacrificio de los animales infectados y mejoramiento del estado sanitario de las granjas para reducir la diseminación de la enfermedad (Smits y Cutler, 2004).

Las operaciones de certificación de rebaños libres se apoyan en el serodiagnóstico, teniendo en cuenta la elección de las pruebas a ser aplicadas, sus características intrínsecas, costo y la practicidad de la ejecución. Se establecen las pruebas de rutina, a intervalos regulares, con sacrificio de los animales positivos, hasta la obtención de tres o más pruebas negativas para todos los animales de reproducción. Como el diagnóstico positivo significa la remoción del animal de la población, las características de sensibilidad y especificidad de las pruebas se tornan muy importantes, pues la obtención de resultados falso-positivos significa sacrificar animales sanos, y resultados falso-negativos significa dejar fuentes de infección en contacto con animales sanos (Samartino *et al.*, 2007). Primero se utilizan las pruebas de alta sensibilidad como pruebas tamiz y luego las pruebas confirmatorias de menor sensibilidad pero de mayor especificidad (Dragui, 2002).

Idealmente, el control efectivo debe ser una combinación de buen diagnóstico, vacunación y tratamiento. Las creencias tradicionales y los hábitos pueden interferir con el control de la enfermedad y prohibir su aceptación debido a la falta de conocimiento. Una educación integrada sobre la enfermedad y la participación de la comunidad en el programa puede evitar este problema, e incrementar la eficacia de las medidas de control. En ausencia de fuertes medidas gubernamentales y medios para realizar una vacunación en masa, el establecimiento de otras medidas de control dependerá de la aceptación voluntaria de los propietarios del ganado. Es bastante seguro que ellos no quieran cooperar en ausencia de incentivos y beneficios económicos (Smits y Cutler, 2004).

La obtención del estado libre de brucelosis en Gran Bretaña desde 1985 fue debida a la continuidad de las medidas tomadas para reducir el riesgo de la enfermedad. Estas medidas incluyeron el análisis sanguíneo periódico de los rebaños de carne, toros lecheros y otros animales que no eran evaluados por las muestras en tanque de leche, a intervalos de 2 años (McGiven *et al.*, 2008). Actualmente, todos los bovinos lecheros que contribuyen a leche en tanque son analizados mensualmente utilizando la prueba de ELISA. Si la muestra del

tanque de leche es positiva, todos los bovinos que contribuyeron a esa leche son analizados utilizando ELISA para muestras de sangre (England *et al.*, 2004).

Dos factores fundamentales que afectan el éxito de un programa de control y erradicación de la brucelosis bovina son la permanencia en el rebaño de animales positivos (fracaso de la estrategia de sacrificio inmediato de animales reaccionantes) y las prevalencias de infección superiores al 17% (Rosenfeld *et al.*, 2007).

2.12.1. Principales medidas de control de brucelosis a nivel internacional

En Venezuela se ha establecido el “Programa de Control y Erradicación de Brucelosis”. Este programa establece el control de salida de los animales, el beneficio de los reactores serológicamente positivos y la vacunación obligatoria de las terneras con la cepa 19. La prueba diagnóstica oficial es la prueba de aglutinación rápida en placa y las pruebas adicionales para la confirmación del diagnóstico incluyen la aglutinación en tubo, la prueba con 2-mercaptoetanol, la fijación de complemento y ELISA competitiva. El principal problema encontrado en este programa de control es la carencia de cooperación de los establos en el beneficio de los animales reactores, ya que no hay un esquema de indemnización para reemplazar a los bovinos afectados (Vargas, 2002).

El Servicio Nacional de Salud Animal (SENACSA) es la organización encargada de los programas de brucelosis en Paraguay. En 1978 se estableció la Campaña Nacional para el Control y Erradicación de Brucelosis con el uso obligatorio de la vacuna cepa 19 de en las terneras de 3-8 meses de edad sólo por una vez; el uso de la vacuna RB51 en vaquillas de más de 8 meses de edad, incluyendo vacas adultas con resultados negativos a brucelosis; uso de un esquema de revacunación con RB51, una vez, incluyendo los animales vacunados previamente con la vacuna cepa 19, con resultados negativos a

brucelosis; uso de la vacuna RB51 en los hatos libres de brucelosis en vaquillas de hasta 15 meses de edad. Adicionalmente, se establecieron otras medidas como el requerimiento en los establos de un “estado libre de brucelosis”; uso de pruebas estándar para detectar brucelosis en bovinos, identificación de los animales vacunados y positivos; control del movimiento de los animales incluyendo las importaciones, ferias y subastas. Asimismo, la identificación y eliminación de los animales positivos es obligatoria (Baumgarten, 2002).

Las estrategias utilizadas para el control de la brucelosis bovina en Brasil son: la vacunación obligatoria de las terneras entre los 3 – 8 meses de edad con la vacuna cepa 19, la única vacuna oficial; la acreditación voluntaria de hatos libres de brucelosis de acuerdo con los estándares internacionales; el monitoreo voluntario de los bovinos de carne con un esquema de muestreo periódico; pruebas diagnósticas para el ganado antes del movimiento interestatal o la entrada a ferias y exhibiciones de ganado; beneficio obligatorio de los bovinos positivos en mataderos aprobados; estandarización de los procedimientos de análisis a través de cursos cortos para veterinarios acreditados. La prueba Rosa de Bengala es el procedimiento tamiz estándar. Los animales que salen positivos son sometidos a pruebas más específicas como 2-mercaptoetanol o fijación de complemento. Hay una dificultad para implementar una política de prueba y sacrificio ya que no hay disponibilidad de un fondo de compensación (Poester *et al.*, 2002).

El actual programa de control y erradicación de brucelosis bovina en Argentina contempla los siguientes puntos: coordinación de actividades a nivel regional y local por la conformación de unidades sanitarias locales; revisión del programa de control 3 años después de haber iniciado, evaluando serológicamente la prevalencia de los hatos; registro de veterinarios acreditados luego de haber aprobado un curso para el control de brucelosis; acreditación de laboratorios privados con el objetivo de validar los resultados para las certificaciones de hatos libres de brucelosis; implementación de una red nacional de laboratorios acreditados donde se realizan exclusivamente las

pruebas oficiales para el diagnóstico de brucelosis; identificación obligatoria de todos los animales; vacunación obligatoria de las terneras de 3 – 8 meses de edad con la vacuna cepa 19; categorización de los establos como “hatos bajo control” donde los animales son analizados independientemente de los resultados obtenidos, “hatos controlados” donde luego de analizados los animales no se han hallado reactores y se espera una prueba oficial confirmatoria, y “hatos libres de brucelosis” donde los establos tienen un certificado de estar libres de la enfermedad; las granjas lecheras deben pasar por cuatro pruebas de anillo en la leche al año; el movimiento de los animales está restringido a aquellos animales que puedan demostrar ser originarios de hatos libres de brucelosis y que tienen un certificado de vacunación (Samartino, 2002).

En Chile, las medidas de control se delinearán en función a la epidemiología de la enfermedad. La estrategia técnica aplicada en la erradicación y control de la brucelosis bovina se basa fundamentalmente en la detección de los rebaños infectados, mediante vigilancia epidemiológica, el saneamiento de los rebaños infectados, con el objetivo de eliminar el foco de infección, e impedir la diseminación de la brucelosis, aplicando medidas preventivas para aumentar la inmunidad colectiva (vacunación) y medidas de control (limitación del movimiento de bovinos positivos, establecimiento de cuarentenas, realización de chequeos en ferias y exposiciones ganaderas) (Ramírez *et al.*, 2002; Rosenfeld *et al.*, 2007).

En Centroamérica las pruebas de aglutinación en placa y Rosa de Bengala son utilizadas comúnmente como pruebas tamiz y frecuentemente son las únicas disponibles en las áreas rurales. Las pruebas de rivanol y 2-mercaptoetanol son utilizadas como pruebas confirmatorias. Debido a su relativa complejidad, la prueba de fijación de complemento es esporádicamente utilizada. Debido a su poca tecnificación, los países de Centroamérica están iniciando programas de control de brucelosis bovina con ayuda de agencias internacionales, sin embargo, a pesar de haber instaurado la vacunación en terneras con la vacuna RB51, programas de vigilancia, cuarentena y

eliminación de reactores, la falta de fondos para estos programas ha tenido consecuencias desafortunadas sin disminución alguna de la prevalencia de brucelosis bovina (Moreno, 2002).

En los países europeos se han realizados diversas estrategias para el control y erradicación de la brucelosis bovina. Austria y Gran Bretaña han beneficiado a los animales positivos. En Bélgica, debido a la baja prevalencia de la enfermedad, se aplica la despoblación de los establos infectados (Godfroid y Käsbohrer, 2002).

En la India, el gobierno ha hecho obligatorio analizar regularmente para brucelosis a todos los toros criados para inseminación artificial y utilizar toros libres de brucelosis para la producción de semen. Frecuentemente, los casos de fracaso reproductivo y abortos son analizados para detectar brucelosis por la prueba Rosa de Bengala y la aglutinación sérica en tubo. También se ha desarrollado una prueba de ELISA en suero y leche con gran aceptación, sin embargo, estas actividades no ha contribuido a algún enfoque tangible hacia el control de la enfermedad (Renukaradhya *et al.*, 2002).

La mayoría de países del medio oriente, en especial Egipto, ya han intentado controlar la brucelosis en bovinos utilizando variadas estrategias, con la vacunación como la principal medida de control. Igualmente, otra medida de control en la región es la vigilancia serológica, seguida por el sacrificio de los animales positivos y la vacunación de vaquillas con dosis completa o reducida con la vacuna *B. abortus* cepa 19. Los animales adultos pueden ser vacunados con la cepa 45/20. También se han establecido estrictas medidas de cuarentena y todos los animales de un hato sospechoso son analizados periódicamente cada 21 días. La cuarentena es liberada si los animales son negativos a 3 pruebas consecutivas (Refai, 2002).

En China, el Programa de Control de Brucelosis está basado en cuatro fases distintivas: la vigilancia del área de interés con el objetivo de identificar la situación epidemiológica, recolectar y analizar datos sobre la brucelosis; campañas de vacunación; establecimiento de las medidas de prevención y

control de brucelosis y edición de los estándares de evaluación del programa; eliminación de los animales infectados y vigilancia epidemiológica de las áreas controladas. Entre las principales medidas de control establecidas en China tenemos: cuarentena, separación y eliminación de los animales infectados con brucelosis, y la vacunación contra la brucelosis con la cepa 19 (Deqiu *et al.*, 2002).

2.12.2. Principales medidas de control de brucelosis a nivel nacional

En la cuenca lechera de Arequipa se ha desarrollado el Programa de Control de Brucelosis. Desde 1987 se realiza un monitoreo con una frecuencia de 3 veces por año practicando la prueba de anillo en leche. En caso de que hubieran animales reactivos, se toma muestras de sangre de todo el hato y se realizan las pruebas de aglutinación en placa, fijación de complemento y Rosa de Bengala (Olivera, 2001).

La baja prevalencia de brucelosis bovina en Arequipa (0.18%) permitió recomendar que para acelerar el programa de control, la vigilancia debería extenderse hacia el ganado no-lechero, a los que se sacrifican en camales, y fundamentalmente establecer un estricto control en el ingreso de animales procedentes de áreas no libres de brucelosis. Estas medidas podrán permitir en corto plazo la erradicación de esta enfermedad en la región del sur del país (López *et al.*, 1994).

En la cuenca lechera de Cajamarca se realizan los Programas de Control y Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis Bovina, por lo que la incidencia de estas dos enfermedades es sumamente baja. Además se ha creado un Fondo para la Reposición de Animales Positivos (Escorra, 2001).

En el año 2002 se han incorporado al programa tres nuevos departamentos o Direcciones de SENASA: Chota y Madre de Dios en el primer semestre y San Martín en el segundo semestre (SENASA, 2008).

2.12.3. Legislación sobre brucelosis bovina

En la mayoría de países, la brucelosis bovina es una enfermedad de declaración obligatoria (Radostits *et al.*, 2002; Acha y Szyfres, 2003). Los programas de control de cada región deben recibir la atención merecida y cualquier plan o planes deben adaptarse a dicha región. Asimismo, es fundamental la cooperación de todos los organismos oficiales, desde el gobierno local hasta el nacional. De más está mencionar que la eliminación de los animales infectados pueden suponer un problema económico serio para el ganadero y se deben considerar las posibilidades de pagar compensaciones económicas. Otro punto importante es el control de los movimientos de animales de una zona a otra ya que un estricto programa de control se puede ver anulado por las negligencias de una zona contigua (Radostits *et al.*, 2002).

A nivel mundial, la Organización Panamericana de Salud (OPS/OMS/BID, 1986) ha establecido ciertos estatutos para el mejor control de la brucelosis a nivel internacional:

- Para la importación de bovinos de cría y recría es necesario un certificado zoosanitario internacional que indique que los bovinos exportados no presentaron ningún signo clínico de brucelosis el día del embarque y que proceden de un hato en el que no ha habido ningún caso de brucelosis desde seis meses atrás. Los bovinos deben proceder de un país o de una zona libre de brucelosis bovina y deben ser sometidos en los 30 días anteriores al embarque a pruebas de seroaglutinación y fijación de complemento con resultados negativos. Si los bovinos proceden de una zona que no es libre de brucelosis, deben ser aislados y sometidos a dos pruebas serológicas con resultados negativos efectuadas con un intervalo de 30 días, con la segunda prueba realizada 15 días antes del embarque. En las hembras preñadas se debe hacer la segunda prueba serológica dos semanas después del parto.

- Para la importación de bovinos para consumo es necesaria la presentación de un certificado zoosanitario internacional que los bovinos no están eliminados dentro del marco de un programa de erradicación de brucelosis, proceden de un país o una zona libre de brucelosis bovina, proceden de un hato oficialmente libre de brucelosis bovina o fueron sometidos a una prueba serológica 30 días antes del embarque con resultados negativos.
- Para la importación de semen es necesaria la exhibición de un certificado zoosanitario internacional que indique que los animales que proporcionan el semen proceden de un hato oficialmente libre de brucelosis, que la prueba de seroaglutinación efectuada en los 30 días antes de la emisión del semen fue negativa, que el semen no contiene aglutininas anti-brucela y que los animales que proporcionaron el semen permanecieron los 60 días anteriores a la emisión del semen en un centro de inseminación artificial cuyo ganado está libre oficialmente de brucelosis bovina .
- Para la importación de embriones el certificado necesario debe indicar que las hembras donantes proceden de un país o de una zona libre de brucelosis bovina o de un hato oficialmente libre de brucelosis. Que las hembras donantes fueron sometidas a una prueba serológica de aglutinación o fijación de complemento en los 30 días anteriores a su salida hacia el lugar de recolección y presentaron resultados negativos a brucelosis.

En nuestro país, se aprobó recién en el año 2000 el Decreto supremo N° 033-2000-AG que señala las directrices del Reglamento para el Control y

Erradicación de la Brucelosis Bovina (SENASA, 2008). Este reglamento consta de 16 Capítulos y se muestra en su totalidad en la sección Apéndices (Apéndice 1).

2.12.4. Pruebas obligatorias

Los métodos sugeridos por la OIE (Organización Mundial de la Salud Animal) para el estudio de brucelosis en la especie bovina son: BPA, Rosa de Bengala, fijación de complemento, ELISA-I, ELISA-C y FPA (Castro *et al.*, 2005).

En los países del Mercosur, se utilizan como pruebas tamiz, la prueba Rosa de Bengala, la prueba del anillo en leche, la prueba de Huddleson y la prueba de antígeno tamponado en placa (BPA). Para confirmar los resultados del tamiz, los países emplean principalmente la FC, el Rivanol, el 2-ME y las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA), utilizadas en Argentina y Chile. En Brasil, las pruebas oficiales del Programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y de la Tuberculosis (PNCEBT) son Rosa de Bengala, el 2-ME y la FC. En Argentina, son ejecutadas las mismas pruebas, aunque Rosa de Bengala es sustituida por BPA. En Uruguay, el 2-ME no es utilizado. Existen varias pruebas utilizando antígeno acidificado tamponado, como BPA y RB. En todos los países se usa siempre una batería de técnicas, sin embargo, no siempre son las mismas (Samartino *et al.*, 2007).

En Gran Bretaña es utilizada la serología utilizando una combinación de pruebas usadas en serie con el objetivo de maximizar los costos. Todas las muestras son analizadas utilizando la prueba ELISA-I. Las muestras positivas a ELISA-I son analizadas consiguientemente utilizando la prueba de Fijación de Complemento y la Prueba de Aglutinación Sérica. Las muestras que son inadecuadas para las anteriores pruebas debido a actividad anticomplementaria o hemólisis, son analizadas utilizando la prueba ELISA-C (McGiven *et al.*, 2008).

2.12.5. Control del movimiento animal

El intercambio y tránsito de animales de estado sanitario desconocido contribuyen a mantener la infección en forma activa (Acha y Szyfres, 2003). La propagación de la enfermedad de un rebaño a otro y de una región a otra casi siempre se debe al traslado de un animal desde un rebaño infectado a otro no infectado. El traslado incontrolado de bovinos desde rebaños o zonas infectadas hasta rebaños o zonas libres de brucelosis es una de las principales causas del fracaso de los programas de erradicación de brucelosis (Radostits *et al.*, 2002; Corbel, 2006).

El uso de la información del movimiento animal en la epidemiología veterinaria tiene un inmenso potencial como herramienta epidemiológica y de control. Por medio de programas especializados, los datos de movimientos son trazados automáticamente, permitiendo discernir el probable impacto de estos movimientos sobre la diseminación de la enfermedad (Stringer *et al.*, 2008).

2.12.6. Programas de control progresivo

En la India se ha instaurado un nuevo enfoque para el control de la brucelosis llamado Programa de Control Progresivo de la Brucelosis Bovina. Este es un programa enfocado en las villas para detectar la infección a través de la evaluación de la leche acopiada en el lugar. Es simple, factible y tiene un alto beneficio económico. Este programa tiene algunas características propias como no reconocer animales infectados individuales sino villas infectadas; involucra completamente a las cooperativas lácteas de la villa en el diagnóstico y control a través de la vacunación de las terneras de 6 a 8 meses de edad en las villas infectadas; las cooperativas lácteas son preparadas para pagar por la vacunación y el análisis de ELISA en leche; tiene un tiempo de aplicación de 5 años para el control intensivo; los toros infectados son castrados; en las villas no infectadas se hace un monitoreo dos veces al año por ELISA en leche para detectar nuevas infecciones. Debido a estas medidas tomadas se está

logrando establecer villas y hatos libres de brucelosis, y se está reduciendo la infección humana originada de bovinos (Renukaradhya *et al.*, 2002).

2.12.7. Redes de laboratorios para el control progresivo

En la Unión Europea (UE), ha sido designado un Laboratorio de Referencia de la Comunidad para coordinar los reportes de enfermedades zoonóticas de los laboratorios de referencia dentro de los estados miembros (Godfroid y Käsbohrer, 2002).

En la India han sido desarrolladas instalaciones de investigación a nivel estatal y regional. El laboratorio de diagnóstico estatal tiene una instalación central de referencia con laboratorios periféricos limitados a nivel distrital. Además, las facultades de medicina veterinaria y algunas instituciones afines también proporcionan servicios de diagnóstico en especial para realizar las pruebas de ELISA (Renukaradhya *et al.*, 2002).

2.12.8. Vigilancia epidemiológica de la brucelosis

Un sistema de vigilancia es esencial para controlar la eficacia de las medidas de control y para identificar brotes en una etapa temprana. Claramente, el control de la brucelosis requiere significativos esfuerzos en términos de recursos humanos, financieros y tiempo. La demostración de que las medidas de control son financieramente asequibles es un pre-requisito esencial para ganar la aceptación y sostenibilidad de tales esfuerzos (Smits y Cutler, 2004).

El objetivo principal de la vigilancia epidemiológica de la brucelosis bovina es ubicar hatos infectados y mantener la supervisión sobre los hatos libres de la enfermedad. Para el ganado lechero se utiliza generalmente la prueba del anillo en leche que permite en poco tiempo analizar un gran número de

muestras. Las muestras se recogen en los centros acopiadores de leche o en el propio establo. Al hallar una prueba positiva se realiza el examen serológico individual a los animales de donde procede la leche (Acha y Szyfres, 2003).

La notificación del aborto es un método adicional de vigilancia para detectar brucelosis. Actualmente, hay un requerimiento de que los abortos múltiples en bovinos lecheros sean investigados sólo si ocurren a intervalos de 30 días uno de otro, o si ocurren en un hato con prueba sospechosa. Después del reporte de aborto, el material abortado es cultivado y son tomadas muestras sanguíneas (England *et al.*, 2004).

En la India, para la vigilancia epidemiológica, se utiliza una alternativa a la recolección de muestras individuales séricas debido a las dificultades para la recolección individual. La recolección de muestras de una mezcla de leche de todos los animales a nivel de villas de las sociedades cooperativas lácteas fue iniciada como parte del Programa de Control Progresivo de Brucelosis Bovina, considerando a la villa como la unidad epidemiológica para propósitos de vigilancia, identificando las villas como infectadas o no infectadas sin referencia a animales o predios individuales (Renukaradhya *et al.*, 2002).

En la actualidad Japón no tiene brucelosis bovina, sin embargo realiza pruebas serológicas a los bovinos como parte de su sistema nacional de vigilancia. Todas las vacas lecheras y toros reproductores son analizados al menos una vez cada 5 años. Este sistema de vigilancia es obligatorio para todos los bovinos así que es asumido que la tasa de ejecución de este tipo de vigilancia es del 100%. Adicionalmente, se realiza una vigilancia de leche en tanque con intervalos de 6, 12 y 24 meses dependiendo de la zona (Yamamoto *et al.*, 2008).

Un tipo parecido de vigilancia epidemiológica es realizado en Irlanda del Norte, pero con el análisis mensual de leche en tanque por medio de la prueba de ELISA. Además, los propietarios están obligados a reportar los abortos en bovinos a la Oficina Veterinaria local para las investigaciones (Stringer *et al.*, 2008).

2.12.9. Estrategias de erradicación

En zonas o países con una baja prevalencia se puede proceder a un programa de erradicación que consiste principalmente en aplicar al hato repetidas pruebas serológicas de diagnóstico y eliminar los animales reactivos hasta la desaparición completa de los focos de infección. Este procedimiento se puede utilizar solo o en combinación con la vacunación de terneras. En estos programas es muy importante el control del tránsito de animales y la vigilancia epidemiológica. Los países o zonas cercanos a la erradicación pueden suspender la vacunación con cualquiera de las cepas utilizadas (Acha y Szyfres, 2003).

La decisión de beneficiar animales positivos a las pruebas diagnósticas de brucelosis es hecha después que son considerados los factores reguladores, económicos y de prevalencia. En la mayoría de los casos, el diagnóstico y beneficio de los animales positivos sólo es exitoso para reducir la incidencia si la prevalencia del hato es muy baja (usualmente menos del 2%). También es improbable que el método de diagnóstico y beneficio de los animales positivos sea exitoso si los animales restantes no son vacunados, especialmente en poblaciones grandes. Son necesarias las pruebas diagnósticas repetidas para reducir la incidencia de brucelosis y para confirmar la erradicación (Radostits *et al.*, 2002; Corbel, 2006).

2.12.10. Estudios realizados sobre el control y erradicación de la brucelosis bovina

Sólo se han realizado pocos estudios con relación a la evaluación y control de programas de erradicación de la brucelosis bovina. Entre ellos tenemos el trabajo de Rentería *et al.* (2003), que diseñaron un programa para el control de la brucelosis, el cual se implementó en 54 establos lecheros en Tijuana. Comenzaron recolectando muestras sanguíneas de los animales mayores de seis meses de edad desde los años 1998 hasta el 2001. El primer año se

determinó una prevalencia de 2.6%. Luego de determinada la prevalencia de inicio, se hicieron recomendaciones a los ganaderos con hatos negativos tales como realizar un muestreo serológico de sus animales cada seis meses; realizar un buen manejo en el momento de comprar animales nuevos; mantener en lo posible el hato cerrado y en el caso de hacer una compra de animales, exigir un certificado de hato libre y cuarentenar a los animales nuevos; realizar un buen manejo de las placentas utilizando recipientes con cal; desinfección con hipoclorito de sodio; control de otros animales, en especial de perros; vacunación de las terneras de 3 a 6 meses de edad con la vacuna RB51; vacunación de las vacas adultas con una dosis reducida de la vacuna RB51 y revacunación anual de las vacas utilizando la vacuna RB51.

Rosenfeld *et al.* (2007) caracterizaron las variables de los hatos que intervenían en un estudio sobre erradicación de brucelosis bovina en la Décima región de Chile. Se estudiaron las variables que caracterizaban el comportamiento de los rebaños participantes en el programa, así como otras que permitieran estudiar la dinámica poblacional tales como: período de permanencia en el programa (días); número de análisis realizados; porcentaje del período de permanencia con animales negativos; número de rebaños que pierden el estatus negativo durante el estudio; porcentaje de animales que ingresan en los rebaños; ingreso de animales nuevos en el rebaño y porcentaje medio de reposición externa; ingreso de nuevos animales positivos en el rebaño; sistema de reposición; prevalencia inicial de brucelosis bovina de los rebaños obtenida en el primer análisis completo; presencia de animales positivos no eliminados en el rebaño; determinación de animales que seroconvirtieron positivamente con respecto al análisis anterior; y tipo de explotación según la aptitud de los animales.

2.13. Posibles estrategias de control y erradicación de brucelosis bovina en el Perú

Para llevar a cabo las estrategias de control y erradicación de la brucelosis en el país, es necesario aplicar nuestros conocimientos sobre la enfermedad, tener en cuenta las pruebas diagnósticas de que disponemos, las formas de prevención y decidir el destino de los animales positivos. El primer paso para implementar estas estrategias es conocer la prevalencia de la enfermedad a nivel regional, local o de hato, dependiendo del nivel al que se va a trabajar. También hay que tener en cuenta que en nuestro país no existe un fondo de compensación para los ganaderos que tienen animales infectados.

Asimismo, hay que destacar que el SENASA ha establecido un “Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina” de carácter obligatorio en todas las zonas donde se ha venido realizando dicho programa y que las pruebas diagnósticas de campo son la prueba del anillo en leche y la prueba Rosa de Bengala, ejecutadas sólo por el médico veterinario designado por el programa. Las pruebas de confirmación del diagnóstico presuntivo son la fijación de complemento y ELISA.

En este contexto y para definir mejor los tipos de estrategias que podríamos utilizar para el control y erradicación de la brucelosis bovina, a continuación se van a esquematizar diversos escenarios hallados en los hatos lecheros. Estos ejemplos podrían hallarse en cualquier parte del país.

2.13.1. Estrategias de control durante un brote de brucelosis

Durante un brote de brucelosis se deben tomar las siguientes medidas:

- Ejecución de la prueba Rosa de Bengala por un médico veterinario calificado designado por SENASA sobre la población total del hato. Dos primeras pruebas con 60 días de diferencia a la totalidad del hato.

- Separación de todos los animales reactivos positivos. Traslado de estos animales a corrales aislados del resto de ganado, de preferencia a un corral distante de los animales negativos para su posterior eliminación.
- Administración diaria de ciprofloxacina de manera preventiva a todos los terneros recién nacidos.
- Aplicar rigurosas medidas de bioseguridad en el establecimiento, como la desinfección del personal y vehículos, tanto al ingreso y salida del establo. Todo material utilizado con animales seropositivos debe de ser incinerado después de su uso. Debe realizarse una limpieza y desinfección (de ser posible) de todas las instalaciones incluyendo corrales, comederos, bebederos, sala de ordeño y zona del tanque de leche. El personal debe llevar una indumentaria apropiada para el trabajo con los animales y que permita reducir el riesgo de diseminación de las bacterias.
- Las placentas de las vacas deben ser incineradas o enterradas y cubiertas con cal viva. Asimismo debe intentarse tener maternidades independientes para los animales, de ser posible una por vaca, las cuales también deben desinfectarse una vez que el animal las haya desocupado.
- Es importante mencionar que la continua capacitación del personal del establo sobre la forma de transmisión y consecuencias de la brucelosis sobre el establo minimizará el impacto de esta sobre el hato.

La vacunación de los animales debería ser de carácter obligatorio, con la cepa RB51 o cepa 19, y en el supuesto que un gran porcentaje del hato fuera seropositivo, se podrían separar los animales intentando el establecimiento del manejo en “hatos paralelos o sistema Bang” es decir, los animales seropositivos y los animales seronegativos criados en el mismo establecimiento pero en diferentes ambientes para que no haya un contacto directo con las posibles fuentes de infección. Posteriormente, pueden irse eliminando paulatinamente los animales del “grupo seropositivo” hasta la desaparición del

mismo o de ser posible y necesario, eliminar al grupo seropositivo inmediatamente.

Para que este tipo de estrategia funcione realmente, no debe descuidarse la higiene del establecimiento de crianza, las normas básicas de bioseguridad y el análisis serológico frecuente de los animales. Igualmente deben aplicarse las pruebas confirmatorias, como la prueba de Fijación de Complemento la que casi nunca ofrece resultados inesperados y es útil para diferenciar títulos debidos a la vacunación a no ser que se opte por el uso de la vacuna RB51.

2.13.2. Estrategias de control en zonas endémicas

Para el control de la brucelosis bovina en áreas endémicas con alta prevalencia de la enfermedad y pocos abortos, se puede recomendar la vacunación obligatoria de todas las terneras entre 3 y 8 meses de edad, y la eliminación paulatina de los animales seropositivos. Las pruebas periódicas de anillo en leche, preferentemente con intervalos de 2 meses, realizadas a animales individuales se podrían complementar con pruebas como fijación de complemento y cultivos microbiológicos. Luego deben establecerse medidas de control de movimiento animal para impedir la propagación de la enfermedad desde este foco.

En el caso de ser un establo cercano a un foco de la infección se deben redoblar las medidas de bioseguridad, restringir el ingreso del personal, vehículos, etc. Luego de establecidas estas medidas se deben establecer las pruebas diagnósticas de rutina y la vacunación debido al alto riesgo de contagio por vecindad. En este caso las pruebas deben realizarse 3 veces consecutivas con un intervalo de 2 meses, y en todas ellas debe salir un 100% de animales negativos, sólo deben analizarse las vacas porque las terneras serán sometidas a la vacunación. Si se trabaja con RB51 se pueden vacunar terneras, vaquillas y vaquillonas. Por otro lado, si se decide vacunar con la cepa 19, sólo se vacunaría a las terneras menores de 8 meses y el resto de

animales sería sometido a serología. Cuando se obtiene la certificación de libre de brucelosis, las pruebas se realizan una vez por año y sólo a las vacas.

Por otra parte, el gobierno ha incluido un sistema de bonificación correspondiente al 1% del precio base por cada kilogramo de leche que recepcionen las plantas procesadoras en los establos libres de brucelosis, con lo que el ganadero está más predispuesto a cooperar con el programa de control y erradicación de esta enfermedad.

2.13.3. Estrategias de control y erradicación en hatos levemente infectados

Estos hatos pueden representar un problema especial dependiendo de la zona en la que se encuentren establecidos. Si se encuentran situados en una zona donde es probable que se propague la infección, se debe vacunar a todas las terneras, se debe tener un estricto control del movimiento animal y realizar pruebas diagnósticas con el fin de eliminar la mayor cantidad de animales reactivos y disminuir lo más que se pueda la prevalencia. Cuando la prevalencia llega a ser bastante baja (menos del 2%) podría intentarse la erradicación. Sin embargo esto implica el inconveniente de la falta de un fondo de compensación por parte del estado.

Si los hatos con prevalencia baja están situados en una zona donde es poco probable que se propague la infección, debería intentarse la erradicación inmediata, además de aplicar estrictas medidas de control de movimiento animal y vigilancia epidemiológica. Realmente, estos son los hatos que pueden y deben ir erradicando porque si no frenan rápidamente la infección esta se puede propagar dentro del hato. Deben hacer las pruebas necesarias para ir detectando y sacando a los animales positivos rápidamente.

2.13.4. Estrategias de control en hatos libres de brucelosis

Cuando se declara un hato libre de brucelosis en base a pruebas de aglutinación sérica, se puede mantener en ese estado sólo si se introducen en el hato animales seronegativos procedentes de rebaños libres de brucelosis. En este tipo de escenario se puede emprender el control de la enfermedad aplicando pruebas serológicas en esquemas anuales o bianuales, ya sea pruebas sanguíneas o en leche y eliminando obligatoriamente a los eventuales reactivos. En las zonas donde predominan las vacas lecheras, las pruebas en leche se pueden sustituir por pruebas sanguíneas. El procedimiento de sacrificio de animales reactivos se podría utilizar solo o en combinación con la vacunación de terneras si se está pensando exportar animales. Asimismo, hay que destacar que en este caso es muy importante el control del movimiento de animales y la vigilancia epidemiológica.

III. CONCLUSIONES

- Brucelosis es una zoonosis que no ha podido ser erradicada aún en la gran mayoría de los países a pesar de la aplicación de agresivos programas de vacunación con vacunas basadas en bacterias vivas atenuadas.
- Existe una marcada diversidad en las medidas de control y erradicación de la brucelosis bovina por *B. abortus* en las distintas regiones a nivel mundial. Por consiguiente, algunos países permanecen endémicos mientras que otros han logrado la erradicación total de sus territorios.
- En el país existe muy poca información sobre la prevalencia nacional y las medidas de control de brucelosis bovina. Lima, el departamento más tecnificado en cuanto a ganadería lechera, continúa siendo un foco de brotes de brucelosis bovina.
- Debido al potencial zoonótico y epidémico de *Brucella abortus* y la eficiencia de la infección por diversas rutas de infección, este patógeno es considerado un potencial riesgo para la salud pública.

IV. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Abdoel T, Travassos I, Cardoso R, Smits HL. 2008.** Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock. *Veterinary Microbiology* 130: 312-319.
2. **Acha P, Szyfres B. 2003.** Brucelosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I Bacteriosis y Micosis, 3ra ed. Publicación Científica y Técnica No. 580. Organización Panamericana de la Salud. Washington, EUA. p 28-53.
3. **Adone R, Ciuchini F, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M. 2001.** Use of polymerase chain reaction to identify *Brucella abortus* strain RB51 among *Brucella* field isolates from cattle in Italy. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 48: 107-113.
4. **Adone R, Ciuchini F, Pistoia C, Pasquali P. 2002.** Combined S99/RB51 antigen for complement fixation test for serological diagnosis of brucellosis in cattle and sheep. *Journal of Applied Microbiology* 93: 872-876.
5. **Agasthya AS, Isloor S, Prabhudas K. 2007.** Brucellosis in high risk group individuals. *Indian Journal of Medical Microbiology* 25 (1): 28-31.
6. **Aréstegui MB, Gualtieri C, Domínguez J, Scharovsky G. 2001.** El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Veterinaria México* 32 (2): 131-139.
7. **Baumgarten D. 2002.** Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Veterinary Microbiology* 90: 63-69.

8. **Bercovich Z, Muskens JAM. 1999.** The efficacy of the skin delayed-type hypersensitivity using a brucellin prepared from a mucoid strain of *Brucella abortus* to detect brucellosis. *The Veterinary Journal* 157: 61-67.
9. **Bernard F, Vincent C, Matthieu L, David R, James D. 2005.** Tuberculosis and brucellosis prevalence survey on dairy cattle in Mbarara milk basin (Uganda). *Preventive Veterinary Medicine* 67: 267-281.
10. **Bernués A, Manrique E, Maza MT. 1997.** Economic evaluation of bovine brucellosis and tuberculosis eradication programmes in a mountain area of Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 30: 137-149.
11. **Bustamante J, Salazar FI, Díaz E, Manzano C, Pérez R, Hernández L. 2000.** Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. *Técnica Pecuaria México* 38 (1): 35-42.
12. **Carvalho AV, Stynen APR, Paixão TA, Miranda KL, Silva FL, Roux CM, Tsolis RM, Everts RE, Lewin HA, Adams LG, Carvalho AF, Lage AP, Santos RL. 2008.** Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infection and Immunity* 76 (5): 1897-1907.
13. **Castro HA, González SR, Prat MI. 2005.** Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39 (2): 203-216.
14. **Corbel MJ. 2006.** Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7. FAO, OIE, WHO eds, Suiza. 102 p.
15. **Costa GM, Abreu VLV, Lobato FCF, Silva JA, Martins NE. 1999.** Avaliação do teste de imunodifusão mediante emprego do polissacarídeo "O" no diagnóstico da brucelose bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 51 (4): 317-322.
16. **Daffner J, Abalos P, Pinochet L, Scortti M, Urcelay S. 1999.** Diagnostic efficiency of *Brucella* soluble antigens in immunodiffusion tests and ability to differentiate *Brucella abortus* strain 19 vaccinated cattle. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 36 (3): 116-120.
17. **Dajer A, Luna-Martínez E, Zapata D, Villegas S, Gutiérrez E, Peña G, Gurría F, Nielsen K, Gall D. 1999.** Evaluation of a fluorescence-polarization

- assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. Preventive Veterinary Medicine 40: 67-73.
18. **Dellamea AB. 2006.** Nueva vacuna contra la brucelosis. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 40 (1): 83-88.
 19. **Deqiu S, Donglou X, Jiming Y. 2002.** Epidemiology and control of brucellosis in China. Veterinary Microbiology 90: 165-182.
 20. **Dragui G. 2002.** Una enfermedad infecto-contagiosa: Brucelosis. IDIA XXI, 2: 105-108.
 21. **England T, Kelly L, Jones RD, MacMillan A, Wooldridge M. 2004.** A simulation model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. Preventive Veterinary Medicine 63: 63-73.
 22. **Erdenebaatar J, Sugar S, Yondondorj A, Nagabayashi T, Syuto B, Watarai M, Makino S, Shirahata T. 2002.** Serological differentiation of *Brucella*-vaccinated and –infected domesticated animals by agar gel immunodiffusion test using *Brucella* polysaccharide in Mongolia. Journal of Veterinary Medical Science 64 (9): 839-841.
 23. **Escurra E. 2001.** Situación de la ganadería lechera en Cajamarca. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 12 (2): 21-26.
 24. **Estein SM. 2006.** Brucelosis: inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. [Internet], [27 Noviembre 2008] Disponible online en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506.html>.
 25. **[FAO/AGAL] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Livestock Information, Sector Analysis and Policy Branch. 2005.** Livestock Sector Brief – Perú. FAO, Roma, p 21.
 26. **Gamarra M. 2001.** Situación actual y perspectivas de la ganadería lechera en la cuenca de Lima. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 12 (2): 1-13.
 27. **Garrido MRF, Garrido A. 2002.** Género *Brucella*. En: Vadillo S, Píriz S, Mateos E, eds. Manual de Microbiología Veterinaria. España: McGraw-Hill Interamericana. p 275-292.

28. **Godfroid J, Käsbohrer A. 2002.** Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology* 90: 135-145.
29. **Gómez C, Fernández M, Salazar I, Saldaña I, Heredia H. 2007.** Improvement of small dairy producers in the central coast of Peru. *Trop Anim Health Prod* 39: 611-618.
30. **Gómez C, Vargas J, Turín C. 2003.** Comparativo técnico económico entre sistemas intensivo y extensivo de producción lechera en el Perú. II Congreso Nacional de Producción Lechera Perulactea. Lima - Perú.
31. **Hamdy MER, Amin AS. 2002.** Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *The Veterinary Journal* 163: 299-305.
32. **Huguet C, Delgado A, Calle S, González A. 2005.** Cuantificación de *Brucella sp.* en bovinos de la provincia de Canta, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 16 (2): 158-162.
33. **Jacobo RA, Anderson L, Storani CA, Stamatti GM, Cipolini MF. 2002.** Diagnóstico serológico de brucelosis bovina: variaciones de resultados post-vacunales. *Revista Veterinaria* 12/13 (1-2): 19-21.
34. **Jardim GC, Pires PP, Mathias LA, Ribeiro OC, Kuchembuck MR. 2006.** Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. *Pesq Vet Bras* 26 (3): 177-182.
35. **Jiwa SFH, Kazwala RR, Tungaraza R, Kimera SI, Kalaye WJ. 1996.** Bovine brucellosis serum agglutination test prevalence and breed disposition according to prevalent management systems in the Lake Victoria zone of Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine* 26: 341-346.
36. **Kunkle RA, Steadham EM, Cheville NF. 1995.** Morphometric analysis of CD4⁺, CD8⁺, and γ/δ ⁺ T-lymphocytes in lymph nodes of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strains RB51 y 19. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49: 271-279.
37. **Langoni H, Ichihara SM, Silva AV, Pardo RB, Tonin FB, Mendonça LJ, Machado JA. 2000.** Isolation of *Brucella spp.* from milk of brucellosis

- positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 37 (6): 444-448.
38. **Leite RM, Thompson JA, Gonçalves VSP, Lite RC, Bandeira DA, Lage AP. 2003.** A random sample survey of bovine brucellosis in the state of Paraíba, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 40 (supl 3): 170-174.
39. **López EP, Olivera L, Perales R, Rosadio R. 1994.** Vigilancia epidemiológica de la brucelosis bovina en la cuenca lechera de Arequipa. *Revista de Investigaciones Pecuarias* 7 (2): 127-132.
40. **Mathias LA, Chaves LF, Chen AA, Girio RJS, Neto WV. 2001.** Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B 19. *Pesq vet Bras* 21 (4): 139-142.
41. **Mathias LA, Meirelles RB, Buchala FG. 2007.** Estabilidade do antígeno de célula total de *Brucella abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose bovina pela reação de fixação de complemento. *Pesq Vet Bras* 27 (1): 18-22.
42. **McGiven J, Hendry L, Brown D, Stack J, Perrett L, Mawhinney I. 2008.** The improved specificity of bovine brucellosis testing in Great Britain. *Research in Veterinary Science* 84: 38-40.
43. **Megid J, Ribeiro MG, Agottani JVB, Marcos Jr G. 1999.** Imunodifusão em gel de ágar com polissacarídeos de membrana de *Brucella abortus* 1119-3 no diagnóstico da brucelose bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 51 (5): 433-437.
44. **[MINAG] Ministerio de Agricultura. 2007.** Dirección general de información agraria. Dirección de estadística. [Internet], [30 Noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe>.
45. **Monteiro LA, Pellegrin AO, Ishikawa MM, Osório AL. 2006.** Investigaçãõ epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras* 26 (4): 217-222.

46. **Moreno E. 2002.** Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology* 90: 31-38.
47. **Muma JB, Samui KL, Oloya J, Munyeme M, Skjerve E. 2007.** Risk factors for brucellosis in indigenous cattle reared in livestock-wildlife interface areas of Zambia. *Preventive Veterinary Medicine* 80: 306-317.
48. **Nielsen K, Gall D, Lin M, Massangill C, Samartino L, Pérez B, Coats M, Hennager S, Dajer A, Nicoletti P, Thomas F. 1998.** Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66: 321-329.
49. **Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Balsevicius S, Bosse J, Nicoletti P, Kelly W. 1996.** Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine* 26: 17-32.
50. **Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. 1995.** Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 46: 285-291.
51. **Nielsen K, Smith P, Yu WL, Elmgren C, Halbert G, Nicoletti P, Pérez B, Conde S, Samartino L, Nicola A, Bermudez R, Rentería T. 2008.** Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 125: 246-250.
52. **O' Leary S, Sheahan M, Sweeney T. 2006.** *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science* 81: 170-176.
53. **Olivera L. 2001.** Sanidad del ganado lechero de la cuenca del sur. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 12 (2): 78-86.
54. **Olsen SC. 2000.** Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Research in Veterinary Science* 69: 135-140.
55. **Olsen SC, Bricker B, Palmer MV, Jensen AE. 1999.** Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Research in Veterinary Science* 66: 101-105.

56. **[OPS/OMS/BID] Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Banco Interamericano de Desarrollo. 1986.** Cuarentena Animal. Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina. Vol. 1, Enfermedades cuarentenables. Washington: OPS. p. 138-141.
57. **Otte MJ, Ravenborg T, Hüttner K. 1995.** A pilot study of elevated abortion and stillbirth ratios in cattle in the foothills of the Eastern plains of Colombia. *Preventive Veterinary Medicine* 22: 103-113.
58. **Piskulich R. 2001.** Mercado peruano de lácteos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 12 (2): 29-32.
59. **Poester FP, Gonçalves VSP, Pereira A. 2002.** Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology* 90: 55-62.
60. **Poester FP, Ramos ET, Gomes MJP, Chiminazzo C, Shurig G. 2000.** The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 37 (1): 61-64.
61. **Portanti O, Tittarelli M, Di Febo T, Luciani M, Mercante MT, Conte A, Lelli R. 2006.** Development and validation of a comparative ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 53: 494-498.
62. **Pouillot R, Lescoat Ph, Garin-Bastuji B, Repiquet D, Terrier P, Gerbier G, Bénet JJ, Sanaa M. 1998.** Risk factors for false-positive serological reactions for bovine brucellosis in Saône-et-Loire (France). *Preventive Veterinary Medicine* 35: 165-179.
63. **Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002.** *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Zaragoza: Editorial Acribia SA. p 197-203.
64. **Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002.** *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana. p 1025-1042.

65. **Ramalho TR, Pinheiro JW, Alves de Moura P, de Assis VL, Ramos N, Honorio LE, Aparecido R. 2008.** Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the Microregion of Araguaína, Tocantins. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 12 (2): 133-138.
66. **Ramírez M, Ernst S, Elvinger F, Rivera A, Rosenfeld C. 2002.** Serologic response and time to eradication in herds with brucellosis vaccinated with strain 19 or strain RB-51; 10th Region, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria 34 (2): 213-220.
67. **Refai M. 2002.** Incidence and control of brucellosis in the Near East Region. Veterinary Microbiology 90: 81-110.
68. **Rentería TB, Nielsen K, Licea AF, Montaña MF, Moreno JF. 2003.** Evaluación de un programa de control de la brucelosis bovina en hatos lecheros de Baja California. Técnica Pecuaria México 41 (3): 275-282.
69. **Renukaradhya GJ, Isloor S, Rajasekhar M. 2002.** Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. Veterinary Microbiology 90: 183-195.
70. **Ribeiro ARP, Lobato FCF, Abreu VLV, Faria ES, Silva JA. 2003.** Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 55 (1): 120-122.
71. **Rivera H. 2001.** Causas frecuentes de aborto bovino. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 12 (2): 117-122.
72. **Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. 2006.** *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. Archivos de Medicina Veterinaria 38 (1): 7-18.
73. **Rodríguez M, Solera J, Sánchez L, Álvarez-Mon M. 1998.** Brucelosis. Aspectos patogénicos. Clínica, diagnóstico y tratamiento. Formas específicas de enfermedad. Medicine 7 (79): 3651-3658.
74. **Rojas N, Zamora O, Cascante J, Garita D, Moreno E. 2001.** Comparison of the antibody response in adult cattle against different epitopes of *Brucella abortus* lipopolysaccharide. Journal of Veterinary Medicine Series B 48: 623-629.

75. **Rosenfeld C, de Blas I, Ernst S, Ramírez C, Rivera A, Silva E, Rojas H. 2007.** Dinámica poblacional en rebaños que participan en el programa de erradicación de la brucelosis bovina en la Décima Región de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 39 (1): 27-34.
76. **Saldarriaga OA, Ossa JE, Rugeles MT. 2002.** Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella spp.* *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15 (2): 180-187.
77. **Samartino LE. 2002.** Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology* 90: 71-80.
78. **Samartino LE, Fort M, Gregoret R, Schurig GG. 2000.** Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 45: 193-199.
79. **Samartino L, Schust M, Piazza E, Salustio E, Conde S. 2007.** Diagnóstico de la brucelosis animal: implementación de nuevas tecnologías. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 15 (Supl. 1): 20-23.
80. **Saravi MA, Wright PF, Gregoret RJ, Gall DEJ. 1995.** Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 47: 93-99.
81. **Schelling E, Diguimbaye C, Daoud S, Nicolet J, Boerlin P, Tanner M, Zinsstag J. 2003.** Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Preventive Veterinary Medicine* 61: 279-293.
82. **Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. 2008.** *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Veterinary Microbiology* 129: 1-14.
83. **SENASA. 2008.** Programa de control y erradicación de tuberculosis y brucelosis bovina. [Internet], [20 de Octubre 2008] Disponible en <http://www.senasa.gob.pe>
84. **Shareef JM. 2006.** A review of serological investigations of brucellosis among farm animals and human in Northern Provinces of Iraq. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 53: 38-40.

85. **Silva FF, Megid J, Nozaki CN, Pinto JPAN. 2007.** Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59 (2): 295-300.
86. **Silva I, Dangolla A, Kulachelvy K. 2000.** Seroepidemiology of *Brucella abortus* infection in bovids in Sri Lanka. *Preventive Veterinary Medicine* 46: 51-59.
87. **Smits HL, Cutler SJ. 2004.** Contributions of biotechnology to the control and prevention of brucellosis in Africa. *African Journal of Biotechnology* 3 (12): 631-636.
88. **Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. 1995.** Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44: 223-235.
89. **Stringer LA, Guitian FJ, Abernethy DA, Honhold NH, Menzies FD. 2008.** Risk associated with animals moved from herds infected with brucellosis in Northern Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 84: 72-84.
90. **Swai ES, Schoonman L. 2008.** Human brucellosis: seroprevalence and risk factors related to high risk occupational groups in Tanga Municipality, Tanzania. *Zoonoses and Public Health* 1-5.
91. **Syrjälä P, Anttila M, Dillard K, Fossi M, Collin K, Nylund M, Autio T. 2007.** Causes of bovine abortion, stillbirth and neonatal death in Finland 1999-2006. *Acta Veterinaria Escandinavica* 49 (Suppl 1): S3.
92. **Tittarelli M, Bonfini B, De Massis F, Giovannini A, Di Ventura M, Nannini D, Caporale V. 2008.** *Brucella abortus* strain RB51 vaccine: immune response after calfhooed vaccination and field investigation in Italian cattle population. *Clinical and Developmental Immunology*. [Internet], [20 de Noviembre 2008] Disponible online en: <http://www.hindawi.com/journals/cdi/volumen-2008/regular.1.html>
93. **Valdivia L, Rivera H. 2003.** Seroprevalencia de *Brucella sp.* en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 14 (2): 174-177.

94. **Valsson O, Alenius S, Nielsen K, Nyberg O, Salmela P. 2001.** Surveillance of ruminant diseases in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Escandinavica Suppl.* 94: 27-28.
95. **Vanzini VR, Aguirre N, Lugaresi CI, de Echaide ST, de Canavesio VG, Guglielmone AA, Marchesino MD, Nielsen K. 1998.** Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 36: 211-217.
96. **Vargas FJ. 2002.** Brucellosis in Venezuela. *Veterinary Microbiology* 90: 39-44.
97. **Velasco ME, Yamasaki A. 2002.** Bacterias de interés veterinario. *Medicina Veterinaria* 19 (1): 1-11.
98. **Vinodh R, Raj GD, Govindarajan R, Thiagarajan V. 2008.** Detection of leptospira and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. *Trop Anim Health Prod* 40: 323-329.
99. **Yamamoto T, Tsutsui T, Nishiguchi A, Kobayashi S. 2008.** Evaluation of surveillance strategies for bovine brucellosis in Japan using a simulation model. *Preventive Veterinary Medicine* 86: 57-74.
100. **Young EJ. 2005.** *Brucella spp.* En: Gillespie SH y Hawkey PM eds. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* 2da Ed. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, Inglaterra. p 265-271.
101. **Zinsstag J, Roth F, Orkhon D, Chimed-Ochir G, Nansalma M, Kolar J, Vounatsou P. 2005.** A model of animal-human brucellosis transmission in Mongolia. *Preventive Veterinary Medicine* 69: 77-95.