UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA.

Seroprevalencia de Brucella sp. En bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de parinacochas, Ayacucho.

TESIS Para optar el título profesional de MEDICO VETERINARIO

AUTOR:
Lesmes Helbert Valdivia Pabón

LIMA – PERÚ 2002

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)

Facultad de Medicina Veterinaria

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral:

Nº . 054-EAPMV/FMV-2002.

PRESIDENTE : .....

DR. LUIS CORONADO SEMINARIO

MIEMBROS : .....

DRA. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO

: .....

DR. VÍCTOR BAZÁN RODRÍGUEZ

: .....

DR. ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

San Borja, 25 de Julio de 2002

Vº B.

DR. JOSÉ A. BUSTAMANTE LAVALLE
Director de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS E.A.P.M.V. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DIRECTOR

ggv.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADEMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Jueves 25 de Julio de 2002**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **Nº054-EAPMV/FMV-2002**, integrado por los siguientes profesores:

DR. LUIS CORONADO SEMINARIO,	Presidente del Jurado
DRA. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO,	Director de la Tesis
DR. VÍCTOR BAZÁN RODRÍGUEZ,	Miembro del Jurado
DR. ALBERTO MANCHEGO SAYÁN,	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **VALDIVIA PABÓN, LESMES HELBERT**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"SEROPREVALENCIA DE *Brucella sp.* EN BOVINOS CRIOLLOS DE CRIANZA EXTENSIVA DE LA PROVINCIA DE PARINACOCHAS, AYACUCHO"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Director de Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Luis Coronado Seminario MSc.; MV. Prof. Principal

Hermelinda Rivera Gerónimo Bach.; MV.; Prof. Principal

Víctor Bazán Rodríguez Bach.; MV.; Prof. Auxiliar

Alberto Manchego Sayán Bach.; MV.; Prof. Auxiliar

GGV

Un Agradecimiento especial a:

La Dra. Hermelinda Rivera,
Al Dr. Francisco Suarez,
Al Dr. José Camacho
Al Dr. Jaime Villavicencio
La Sra. Nelly Espinoza.

A mis padres, Fredy y Esther.
A mis hermanos

A Lorena y Javier Alejandro.

A mis amigos.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO ii

LISTA DE ABREVIATURAS iv

RESUMEN v

ABSTRACT vi

LISTA DE CUADROS vii

LISTA DE APENDICE viii

LISTA DE MAPA ix

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 Agente 3
2.2 Estructura 4
2.3 Epidemiología 6
2.4 Patogenia 8
2.5 Aspectos inmunológicos 12
2.6 Diagnóstico 13
2.6.1 Aislamiento bacteriológico 13
2.6.2 Pruebas serológicas 13
2.6.1.1 Prueba del anillo en leche (MRT) 13
2.6.1.2 Prueba de aglutinación en placa (SPAT) 14
2.6.1.3 Prueba de fijación de complemento (CFT) 14
2.6.1.4 Prueba de Rosa de Bengala (RBPT) 15
2.6.1.5 Prueba indirecta de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (i-ELISA) 15
2.7 Control y erradicación de la brucelosis bovina 16

III MATERIALES Y MÉTODOS 20

3.1 Lugar de estudio 20
3.2 Materiales 21
3.2.1 Animales 21
3.2.2 Material biológico 22
3.2.3 Materiales 22
3.3 Metodología 22
3.3.1 Tamaño muestral 22

3.3.2 Obtención de muestras 23
3.3.3 Detección de anticuerpos contra *Brucella sp.* 24
3.3.4 Análisis de datos 25
3.3.4.1 Prevalencia aparente (Pa) 25

IV. RESULTADOS 26

V. DISCUSIÓN 27

VI. CONCLUSIONES 30

VII. RECOMENDACIONES 31

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la seroprevalencia de *Brucella sp.* en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, Departamento de Ayacucho. Con esta finalidad se obtuvieron muestras de suero de bovinos, entre vacas y vaquillonas de 24 rebaños (n=469), procedentes de 4 distritos con mayor población bovina: Chumpi, Coracora, Puyusca y Pullo, criados en forma extensiva, para la detección de anticuerpos contra *Brucella sp.* mediante la prueba de aglutinación Rosa de Bengala. No se encontraron animales seroreactores a *Brucella sp.*, lo que sugiere la ausencia de la infección por *Brucella sp.* o en caso de existir tendría una prevalencia menor al 4.87% en la población de bovinos estudiados. La ausencia o baja prevalencia de la brucelosis en el área muestreada puede ser debido a la efectiva vigilancia de las autoridades sanitarias en el movimiento interno de los animales, así como el clima, el tipo de crianza, que podrían ser factores adversos para la difusión de la infección por *Brucella sp.* entre los animales de los distritos muestreados.

Palabras clave: Bovinos criollos, *Brucella sp.*, seroprevalencia, anticuerpos, Rosa de Bengala.

ABSTRACT

The objetive of the present study was to determine the seroprevalence of *Brucella sp.* in pastured creole cattle of the province of Parinacochas, Department of Ayacucho. To this end bovine serum samples were obtained, amog cows and heifers from 24 herds (n=385), from the 4 districts with the largest bovine population: Chumpi, Coracora, Puyusca and Pullo, to detection of antibodies against *Brucella sp.* by Rose Bengal agglutination test. *Brucella sp.*-seroreactor animals were not found, which suggests absents of *Brucella sp.*-infection or if it ocurred, it would have a prevalence less than 4.87% in the bovine population studied. The absent or low prevalence of Brucelosis in the area sampled may be due to the effective surveillance made by the sanitary authorities on internal movement of animals, as well as the weather, kind of breeding, which may be adverse factors for *Brucella sp.*-infection to spread among the animals from the districts sampled.

Key words: Creole cattle, *Brucella sp.*, seroprevalence, antibodies, Rose Bengal.

LISTA DE ABREVIATURAS

B.	:	*Brucella*
S	:	Lisa
R	:	Rugosa
LPS	:	Lipopolisacárido
S-LPS	:	Complejo lipopolisacárido liso
Cu/Zn-SOD:		Anión superóxido dismutasa Cobre/Zinc
Mn-SOD:		Anión superóxido dismutasa Manganeso
RER	:	Retículo endoplasmático rugoso
ACTH	:	Hormona adrenocorticotrópica
PGF2alfa:		Prostaglandina F2alfa
OMP	:	Proteína externa de membrana
CMH-II:		Complejo de Histocompatibilidad Mayor de tipo II
LT	:	Linfocito T
LB	:	Linfocito B
CD	:	Grupo de diferenciación de linfocitos
IL-10	:	Interleuquina 10
IFNg	:	Interferón gamma
IgG	:	Inmunoglobulina G
MRT	:	Prueba de anillo en leche
SPAT	:	Prueba de aglutinación en placa
CFT	:	Prueba de fijación de complemento
RBPT	:	Prueba de Rosa de Bengala
i-ELISA:		Prueba indirecta de inmunoabsorvancia ligada a enzimas
RB51	:	Cepa vacunal rugosa atenuada
CFU	:	Unidad formadora de colonia

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Población total, hembras bovinas y estratificación de las muestras según la procedencia de los animales en la provincia de Parinacochas 21

Cuadro 2: Rebaños y categoría de las hembras bovinas, según los distritos muestreados de la provincia de Parinacochas 21

LISTA DE APENDICE

Apéndice N° 1. Población bovina de los distritos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho..... 40

LISTA DE MAPA

Mapa N° 1. Área de Investigación. Provincia de Parinacochas..... 41

I. INTRODUCCIÓN

El departamento de Ayacucho concentra una población bovina de 302,859 animales. El año 1972 poseía 345,475 cabezas de ganado, lo que significa que disminuyó en 12,4% (INEI, 1995). Probablemente la problemática social vivida en las décadas 80 y 90 haya sido uno de los factores más importantes para esta disminución; sin embargo, las enfermedades infecciosas bacterianas, virales y parasitarias han podido ser los factores limitantes del desarrollo ganadero en esta área. Entre las enfermedades infecciosas de mayor importancia para la salud animal y salud pública está la brucelosis, que es una enfermedad de distribución mundial y de gran impacto económico (FAO/OMS, 1986).

La brucelosis es causada por bacterias del género *Brucella*. Este género comprende 7 sub-especies conocidas como: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. maris*. Las subespecies *abortus*, *melitensis*, *suis* y *canis* adquieren mayor importancia por su implicancia en la brucelosis humana, ellos pueden afectar a cualquiera de los animales, pero usualmente la *B. abortus* afecta al bovino, *la B. melitensis* al caprino, la *B. suis* al cerdo, *B. ovis* al ovino y *B. canis* al canino. La *B.*

neotomae afecta a los roedores, la *B. maris* a especies marinas como lobos de mar (Fox et al, 1998).

La brucelosis es prevalente a nivel mundial, pero en especial en los países en desarrollo (Gómez, 1993). En América Latina la brucelosis ocasiona pérdidas económicas estimadas en 600 millones de dólares anuales, no sólo por las fallas reproductivas, sino también, por constituir una barrera para el comercio internacional de animales (FAO/OMS, 1986).

En nuestro país existe escasa información sobre la prevalencia de brucelosis en la región andina, habiéndose reportado en el Valle del Mantaro una prevalencia de 0.28% (Cruz, 1996); pero no se dispone de datos de prevalencia de la brucelosis de otras áreas de la región andina, como Parinacochas, un área ganadera con más de 32,000 cabezas de ganado bovino, por lo que, el objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de la *Brucella sp.* en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, empleando la prueba de aglutinación de Rosa de Bengala.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agente

Las bacterias del género *Brucella* son microorganismos aerobios cocoides, Gram negativas, inmóviles y sin cápsula. Las colonias son de dos tipos: lisas (S) y rugosas (R) y relativamente pequeñas, húmedas y brillantes (Corbel, 1991; Jacques 1986).

Las *Brucellas* son susceptibles al calor, luz solar y desinfectantes usuales (ácidos, álcalis, yodóforos y fenoles), pero a temperatura de refrigeración la bacteria puede sobrevivir por semanas.

La brucelosis es causada por bacterias del género *Brucella*. Este género comprende 7 sub-especies conocidas como: *Brucella abortus, B. melitensis, B. Suis, B. ovis, B. canis, B. neotomae y B. maris*. Las subespecies *abortus, melitensis, suis y canis* tienen mayor importancia por su implicancia en la salud pública, ellos pueden afectar a cualquiera de los animales, pero usualmente la *B. abortus* afecta al bovino, *la B. melitensis* al caprino, la *B. suis* al cerdo, *B. ovis* al ovino y *B. canis* al canino, la *B. neotomae* a roedores y *B. maris* a mamíferos marinos como lobos de mar (Fox et al, 1998).

A la fecha se han detectado 4 biotipos de la *Brucella abortus* (biovares 1, 2, 3 y 4), sin embargo, la mayoría de infecciones por *Brucella abortus* se relacionan con el biotipo 1 (Bricker y Halling, 1994).

2.2 Estructura

La estructura bacteriana de mayor importancia es la pared celular, conformada por polisacáridos, lípidos y proteínas. El principal antígeno presente en la pared externa de las cepas lisas de *Brucella*, detectado mediante pruebas serológicas como la aglutinación, fijación de complemento y ELISA, es el complejo lipopolisacárido liso (S-LPS), constituido por la cadena O-lipopolisacárido (LPS), la región del núcleo y lípido A. Las cepas rugosas no contienen la cadena O-lipopolisacárido. La LPS, constituida por glucosa, manosa y quinovosamina, contiene los epítopes inmunodominantes que inducen la formación de los anticuerpos detectados por las pruebas serológicas. El determinante antigénico A esta presente en mayor cantidad en la *Brucella abortus* y el determinante antigénico M en la *Brucella melitensis* (FAO/OMS, 1986).

La comparación de las propiedades del LPS de la *Brucella* con las LPS de otras bacterias Gram negativas ha demostrado que muchas de las actividades biológicas inducidas por el LPS de la *Brucella* son cualitativamente y cuantitativamente diferente de las endotoxinas de las enterobacterias. La actividad biológica distinta del LPS de la *Brucella* está relacionado a la estructura única del LPS y podría ser un factor que contribuye a la sobrevivencia de la *Brucella* en células fagocíticas (Sangari y Agüero, 1996).

Los potenciales mecanismos de adhesión de la *Brucella sp.* con los macrófagos determinan la existencia de una familia de proteínas transmembrana, las integrinas, que median la adherencia con diferentes ligandos, de distintos tipos celulares. Estas integrinas interactúan con superficies celulares que expresan una determinada secuencia de aminoácidos, cuya presencia se ha comprobado en la proteína de membrana exterior de *Brucella sp.* (Abbas et al, 1991; Tizard, 1995).

La presencia de estas integrinas en las células de Langerhans haría posible el ingreso de *Brucella abortus* a través de las mucosas y de la piel intacta, estimuladas por su ligando, los adhieren y migran por las vías linfáticas, arribando al ganglio linfático de drenaje regional para ubicarse en la paracorteza donde se comportan como potentes presentadores de antígenos (Steinman, 1991). La *Brucella sp.* libre o asociada a las células del sistema de Langerhans accedería a los ganglios donde luego se unirían a las integrinas y a otros receptores de los macrófagos siendo fagocitados. Otra proteína identificada en los macrófagos y placenta de bovinos es el receptor de manosa, a la que las unidades repetidas de manosa de la cadena O del LPS de *Brucella abortus* se adhiere. Una vez adherida, los complejos integrina-ligando son internalizados en vesículas para formar el endosoma.

Durante la adherencia, la *Brucella abortus* libera enzimas antioxidantes que actúan sobre el anión superóxido (Cu/Zn-SOD y Mn-SOD) y el peróxido de hidrógeno (catalasa), radicales básicos liberados durante la activación del estallido respiratorio de los macrófagos, además de jugar un importante papel en la sobrevivencia y patogenicidad de *Brucella abortus* in vivo, al interferir en el metabolismo oxidativo de los macrófagos. Dentro de los macrófagos la *Brucella sp.* genera condiciones de stress al alterar la maquinaria metabólica celular e induce la síntesis de proteínas nuevas que utiliza para su crecimiento intracelular (Rafie-Kolpin et al, 1996).

Los mecanismos descritos facilitarían la proliferación de *Brucella abortus*, que podría asociarse con la utilización del hierro depositado en el macrófago, que lo captura secretando sideróforos. El secuestro del hierro interfiere a su vez en el metabolismo oxidativo de los macrófagos, en los que normalmente cataliza la generación de radicales hidroxilo del peróxido de hidrógeno, responsable de la muerte de *Brucella abortus* luego de su endocitosis opsónica o no (Jiang y Baldwin, 1993). Finalmente los macrófagos mueren como resultado de la expansión física de la masa de microorganismos que persisten y proliferan en él, llevándolo a la rotura celular (Pennimpede et al, 1996).

En el caso de cepas virulentas de *Brucella abortus*, la iniciación de los procesos bactericidas intracelulares puede prevenirse mediante la liberación de factores de virulencia bacterianos. Uno de éstos, ha sido identificado como un componente de la

pared celular de alto peso molecular, probablemente un lipopolisacárido, que puede prevenir la degranulación de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Otro se ha identificado como un nucleótido cíclico. Este previene también la degranulación de los neutrófilos y la activación del sistema mieloperoxidasa (Pennimpede et. al., 1996).

Se sabe que *Brucella sp.* como patógeno intracelular facultativo, al entrar a la célula también coloniza el retículo endoplasmático rugoso (RER) de los trofoblastos de la placenta y de otras células epiteliales no fagocíticas y, debido a sus características fisiológicas y morfológicas inherentes, muestra funciones semejantes a la mitocondria y es tomada como tal, logrando una infección latente en los animales, en los que puede producir enfermedad aguda bajo condiciones de disminución de la resistencia del hospedador (Ramírez-Romero, 1998).

2.3 Epidemiología

El reservorio más importante de la *Brucella abortus* es el ganado vacuno, que también es la fuente más frecuente de infección de rebaños limpios a través de la compra de un animal infectado, gestante o bien, después de un parto o aborto reciente (Corbel, 1991).

Aún cuando la infección se registra en bisonte, antílope, ciervo, coyote, zarigüeya, mapache, alce, camello y otros rumiantes domésticos y silvestres, no hay pruebas concretas de estas especies sean fuentes de infección. Si bien no suele considerarse a los perros de las granjas reservorio de *Brucella abortus*, el microorganismo fue hallado en perros de una granja en la que había bovinos positivos, situación que se debe tener en cuenta en un programa de erradicación (Forbes y Tessaro, 1996; Gall et al, 2001; Szulowski, 1999).

La *B. melitensis* es altamente contagiosa para el ovino y caprino, y en áreas donde esta *Brucella* es enzoótica, es la principal causa de aborto en estas especies. El bovino y el perro, también pueden infectarse con la *B. melitensis*.

B. suis infecta al bovino causando cuadros similares a la *B. abortus*. La transmisión venérea es una ruta importante de contagio. Afecta también las

articulaciones. Los biovars de *B. suis* 1, 2 y 3 pueden afectar también al equino, bovino y perro.

La *B. ovis* infecta al ovino causando epididimitis y orquitis, con reducción de la calidad del semen y hasta infertilidad en el macho. Los abortos son ocasionales.

La *B. canis* afecta a los perros ocasionando el aborto, principalmente en los criaderos de perros; en el macho puede producir epididimitis, prostatitis y atrofia de los testículos (Bercovich, 1998).

Los ovinos usualmente no se infectan con *B. abortus*, pero si adquieren la infección pueden convertirse en portadores y eliminar la *Brucella* hasta por más de 40 meses, mientras que las cabras al parecer no son relevantes como reservorios.

La vía más frecuente de infección es el tracto gastrointestinal, por ingestión de pastos, forrajes y agua contaminados. El pastoreo en áreas de pastos y aguas contaminadas con secreciones y membranas fetales de vacas infectadas, y el contacto con fetos abortados y neonatos infectados se consideran las formas más frecuentes de propagación. Otra forma de transmisión es por monta natural, inseminación artificial y la técnica de transferencia de embriones a partir de donantes infectadas durante la superovulación (Bercovich, 1998).

Otros factores como la densidad de población, los sistemas de manejo, la introducción de nuevo ganado comprado de otro rebaño, la utilización de vacunas y antibióticos, las prácticas higiénicas y la tasa de infección, probablemente juegan roles más importantes a la hora de determinar la difusión de la brucelosis en el rebaño. La edad de los animales, el libre pastoreo y el tamaño del hato (>31) fueron asociados con alta prevalencia, en 3 distritos de Kenya de condiciones geográficas distintas como: un área árida de pastoreo, una sabana tropical y un área tropical de la costa (Kadohira et al, 1997).

2.4 Patogenia

La infección del animal se inicia con ingreso de la *Brucella sp.* por las mucosas de la orofaringe, aparato respiratorio superior, conjuntiva, inoculación intramamaria,

tracto genital, por la piel intacta o lesionada y por el linfoepitelio de las placas de Peyer (Ackermann et al., 1988). No se conoce con exactitud como la bacteria logra ingresar a través de las barreras naturales, pero una vez que llegan a estos tejidos, los microorganismos acceden, libres o asociados a células fagocíticas, a los ganglios linfáticos regionales, en los que producen una linfadenitis aguda (Eaglesome y García, 1992; Ewalt, 1989). En la zona medular y paracortical de estos ganglios linfáticos hay gran acumulación de macrófagos y monocitos, además de una marcada proliferación de las *Brucellas* (Cheville et al. 1992).

Luego de multiplicarse, las bacterias inician una bacteremia intermitente y de duración variable que puede persistir meses. Las *Brucellas* son llevadas por linfa y sangre hacia otros tejidos, como el bazo, glándulas mamarias, nódulos linfáticos mamarios, y útero gestante de la hembra, y tejidos linfoides, testículos y glándulas accesorias en el macho. Ocasionalmente puede localizarse en estructuras sinoviales y producir tendovaginitis, artritis o bursitis, cuando preexisten cambios inflamatorios (Kennedy y Miller, 1993). Durante la diseminación hematógena, las *Brucellas* extracelulares están expuestas a los mecanismos normales de defensa antibacteriana del hospedador y probablemente muchos quedan atrapadas y mueren en los órganos del sistema reticuloendotelial. La acción bactericida tiene lugar en dos fases: antes y después de la fagocitosis. La fase prefagocítica implica la exposición a factores séricos, que incluyen tanto anticuerpos específicos como proteínas no inmunoglobulinas encontradas en el suero bovino normal. En el animal inmunizado, los anticuerpos pueden eliminar a la *Brucella* de la circulación, provocando su fagocitosis; con la consecuente recuperación del animal (Kennedy y Miller, 1993).

Cuando se introduce la brucelosis en un rebaño "limpio" de animales susceptibles, la enfermedad puede seguir un curso agudo, abortando un 50% o más de los animales. El porcentaje de animales que abortan depende en parte del número de gestaciones y del estadio de gestación en el momento de la infección. Los animales no gestantes pueden también adquirir la infección y en estos casos, el microorganismo tiende a localizarse en los ganglios linfáticos, entre ellos el supramamario. Si estas vacas son preñadas, hay una bacteriemia periódica que puede conducir a la infección de la placenta y el útero. En estos casos, por lo tanto, hay un intervalo más largo entre el momento de la infección y el aborto subsiguiente (Bercovich, 1998).

La mayoría de los casos de abortos en vacas son causados por la *Brucella abortus*; las *B. melitensis* y *B. suis*, infectan y se difunden en los hatos pero raras veces ocasionan abortos (Norton y Thomas, 1994). La mayoría de veces las vacas abortan una vez, aunque algunas pueden abortar dos e incluso tres veces, siendo esto último excepcional. Se excretan grandes cantidades de microorganismos en la placenta y secreciones vaginales después del aborto, y la excreción puede continuar durante varias semanas, aunque la cantidad se reduce mucho en ese momento.

Frecuentemente, después del aborto hay una retención placentaria que puede conducir a una infección bacteriana secundaria. Puede haber endometritis catarral o purulenta, posiblemente acompañada por lesiones extensas en el útero y las trompas de Falopio, y formación de adherencias esterilizantes. En caso de retención de placenta o no, posterior al aborto hay una secreción desde el útero de un material mucopurulento, marrón-amarillento, durante 1 ó 2 semanas (Corbel, 1991; Jubb et al, 1993).

Algunos animales parecen recuperarse de la enfermedad, como parece indicar la incapacidad para recuperar el microorganismo bien de la leche o de secreciones vaginales en el momento del parto. Es, por tanto, imposible predecir qué animales se recuperarán y cuánto tardarán en hacerlo, como también es imposible garantizar que tales animales no sufrirán un recrudecimiento subsiguiente de la infección (Corbel, 1991).

Finalmente la *Brucella sp.* llega al útero grávido vía hematógena, antes que se produzca la invasión del útero, aparecen repetidas fases de bacteriemia por la producción de endotoxinas estimulando la producción de interleuquina 1, y como consecuencia inducen los efectos clínicos de malestar general, letargia, y cambios de temperatura en el animal (Tizard, 1995). Los daños en el útero producen placentitis necrosante y endometritis ulcerativa grave, caracterizada por una infiltración leucocitaria marcada, con linfocitos y células plasmáticas, congestión y proliferación celular que conduce a una necrosis, sumados a la endotoxemia que causa coagulación intravascular a ese nivel, interfiriéndose así el balance de nutrientes de la madre al feto (Kennedy y Miller, 1993).

Al establecerse *Brucella sp.* en la placenta, ocasiona diversos cuadros patológicos, que dependen de la virulencia de la cepa involucrada. Si es de baja

virulencia, sólo causará una ligera inflamación de la placenta, seguido de retención de placenta; si la bacteria tiene una virulencia intermedia, la inflamación de la placenta puede ser moderada, con focos de placentitis severa que irán extendiéndose lentamente; este avance progresivo interfiere con el funcionamiento normal de la placenta, causando estrés en el feto, sin llegar a matarlo, como resultado de este estrés, la hipófisis fetal libera ACTH (Hormona adrenocorticotrópica), la cual inicia la cascada de eventos que conducen al parto, como consecuencia se produce el aborto de un feto recién muerto.

Si la *Brucella* es de virulencia alta, puede matar el feto muy rápidamente debido a la endotoxemia que induce la síntesis de PG F2alfa, causando coagulación intravascular e interfiriendo la circulación sanguínea a nivel de la placenta, ya sea por los daños causados a la placenta o al feto mismo (hipoxia y acidosis en el feto, que estimula su respiración, provocando inhalación de líquido amniótico, resultando en una neumonía fetal), sin dar tiempo a ser expulsado en el parto pudiendo comportarse como feto macerado, expulsándose varios días después de la muerte. El aborto se produce principalmente, en los últimos 3 meses de gestación, siendo el periodo de incubación inversamente proporcional al estadio de desarrollo del feto en el momento de la infección. (Kennedy y Miller, 1993; Zarco, 1988).

La predilección especial de la *Brucella abortus* por el útero gestante y la placenta se atribuye a la presencia en ellos del i-eritritol, que se ha demostrado que estimula el crecimiento de *Brucella* tanto *in vivo* como *in vitro*; el i-eritritol es utilizado principalmente por *Brucella abortus* como fuente de energía. La administración parenteral de i-eritritol a cobayos y terneras también aumenta la gravedad de la infección; el i-eritritol también está presente tanto en las placentas normales como infectadas de ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos, así como en las vesículas seminales y testículos de machos de estas especies (Corbel, 1991).

En fetos infectados se desarrolla hiperplasia linfoide en múltiples ganglios linfáticos y múltiples focos inflamatorios diseminados. Probablemente la neumonía fetal se deba a la localización de focos perivasculares en los septos interlobulares del pulmón, lo que es un indicio de la diseminación hematógena de la *Brucella* en el feto (Pérez et. al, 1998).

En vacas vacías no hay una susceptibilidad particular a *Brucella abortus*, pudiendo desarrollar infecciones inmunizantes autolimitantes o convertirse en portadoras latentes. La infección frecuentemente permanece en la glándula mamaria y en los ganglios linfáticos supramamarios con excreción constante o intermitente de *Brucella* en la leche durante lactancias posteriores (FAO/OMS, 1986).

La patogenia de la enfermedad en los toros es similar a la de las hembras, estando implicados los testículos y las vesículas seminales. Debido a que alcanzan la madurez sexual antes que las novillas, los toros jóvenes parecen ser más susceptibles a la infección.

Si se administra a los toros jóvenes una vacuna con cepa 19, ésta puede persistir y producir lesiones, tanto en los testículos como en las vesículas seminales. Es, por lo tanto, poco aconsejable utilizar esta vacuna en toros (Corbel, 1991; Jubb et al. 1993).

Las lesiones en el toro están limitadas en gran medida a los órganos genitales. Las vesículas seminales y los epidídimos pueden estar engrosados con áreas de inflamación intersticial crónica y necrosis del epitelio tubular de las vesículas. Los epidídimos contienen granulomas múltiples con infiltración de células linfoides. plasmáticas y epitelioides que rodean a células gigantes; algunos granulomas pueden estar calcificados. En los primeros estadios de la enfermedad los testículos pueden estar aumentados de tamaño pero más tarde se hacen más pequeños de lo normal debido a la contracción originada por el tejido fibroso (Corbel, 1991; Jubb et al. 1993).

2.5 Aspectos inmunológicos

La infección con *Brucella* o la inmunización con vacunas generalmente da lugar al desarrollo tanto de anticuerpos como de respuestas inmunitarias mediadas por células frente a los antígenos del microorganismo.

La respuesta celular inmune del hospedador es una parte crítica de la defensa del hospedador contra la infección intracelular de *Brucella sp.* La inmunidad depende de las células T mediadoras que son activadas por los macrófagos contra los antígenos específicos de *Brucella sp.* (Oliveira et al. 1998). Los epítopes conformacionales de las

OMP y LPS de la *Brucella abortus*, son procesados por los macrófagos que los expresan en su superficie como antígenos de clase I y II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (Pennimpede et al, 1996), los que luego son reconocidos por los receptores específicos de los linfocitos T CD8 (LT CD8, supresores y citotóxicos) y los LT CD4 (inductores, colaboradores). A este fenómeno sigue la proliferación y diferenciación de los linfocitos específicos generando inmunidad mediada por células hacia *Brucella abortus* (Baldwin et al, 1993). Los linfocitos T CD8 lisan células que expresan epítopes específicos asociados a los antígenos de clase I del CMH (Eaglesome y García, 1992). El lipopolisacárido liso S-LPS de *Brucella sp.* es un potente inductor de IL-10 (Kariminia et al, 2002). Los LT CD4, liberan las interleuquinas (IL): IL-2, IL-4, IL-6, e IL-10, interferón gamma (IFNg) y factor de necrosis tumoral beta (linfotoxina), con lo que activan su respuesta, esencial frente a la defensa adquirida contra *Brucella abortus* (Jiang y Baldwin, 1993).

Los epítopes conformacionales de los OMP y LPS, sin previa degradación en macrófagos, son reconocidos por receptores específicos de los linfocitos B (LB) e inducen respuesta inmune mediada por anticuerpos. El LPS es un activador policlonal de linfocitos B, que dispara la secreción de anticuerpos contra los epítopes de la cadena de LPS (Forestier et al, 1999). Así, luego de la exposición del ganado vacuno a un inóculo fuerte de una cepa de campo virulento o a la vacunación parenteral con una cepa atenuada lisa como *Brucella abortus* cepa 19, se producen anticuerpos del isotipo IgM. Normalmente pueden detectarse en la primera o segunda semana post-exposición. A continuación aparecen rápidamente los anticuerpos IgG_1. La producción de anticuerpos IgG_2 aparece luego de infección o vacunación repetidas. Los anticuerpos IgA se producen normalmente a bajas concentraciones. En el caso de infecciones persistentes producidas por cepas virulentas, la respuesta de IgG se mantiene y persiste en un nivel alto, frecuentemente durante años. Puede mantenerse también alguna producción de IgM, pero se halla cubierta en gran parte por la respuesta de IgG.

2.6 Diagnóstico

El aislamiento y la identificación de la *Brucella abortus* mediante métodos bacteriológicos es el único método seguro de diagnóstico, no obstante su uso es poco frecuente y, en general, se recurre a las pruebas serológicas (Acha y Szyfres, 1989).

2.6.1 Aislamiento bacteriológico

La bacteria puede ser aislada a partir de contenido estomacal fetal, pulmones, hígado, bazo y cerebro; trozos de cotiledones fetales, secreciones vaginales, calostro, leche (estéril), semen, tejido mamario, ganglios linfáticos supramamarios, ilíacos y retrofaríngeos. La muestra debe estar limpia y debe homogenizarse bien. El aislamiento y la identificación de la *Brucella abortus* es el único método seguro de diagnóstico, pero requiere tiempo y personal experimentado (Kirkbride, 1990).

2.6.2 Pruebas serológicas

2.6.2.1 Prueba del anillo en leche (MRT)

Esta prueba es usada para la vigilancia y detección de rebaños lecheros infectados, la cual utiliza microorganismos teñidos con hematoxilina o trifeniltetrazolio que al ser expuestos con leche y luego de la incubación reconocen anticuerpos aglutinantes tipo IgM, IgA e IgG, realizándose posteriormente el seguimiento hacia el rebaño positivo para ser examinados individualmente mediante pruebas confirmatorias (FAO/OMS. 1986; Tizard, 1995). La especificidad de esta prueba es de 99.9% y su sensibilidad de 56% (Kerkhofs et al, 1990).

2.6.2.2 Prueba de aglutinación en placa (SPAT)

Esta prueba posee una especificidad y sensibilidad igual que la prueba en tubo, se basa en la aglutinación rápida del suero problema frente a la exposición con el antígeno de *Brucella abortus* sobre una placa de vidrio. La prueba identifica IgM, IgG_2

e IgG_1. Es sencilla y más rápida que la prueba de aglutinación en tubo, aunque en ciertas ocasiones puede encontrarse aglutinación en las diluciones más altas, pero no en las más bajas. Esto es el llamado **fenómeno de zona** cuya explicación aún no se conoce (Cepanzo, 1970; Corbel, 1991; Tizard, 1995). Esta prueba tiene una especificidad del 99.3% y una sensibilidad del 73.1% (Corbel, 1991).

2.6.2.3 Prueba de fijación de complemento (CFT)

Esta prueba mide los anticuerpos IgG_1 y es capaz de medir niveles bastante bajos del anticuerpo, resultantes de la vacunación o de reacciones cruzadas por otros microorganismos. Se considera aún como la más fiable en términos de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico serológico de brucelosis, es aceptado como prueba confirmatoria de mayor valor que la aglutinación sérica en estadios precoces y tardíos de la enfermedad (MacMillan, 1990). Esta prueba ayuda a la detección de animales con infecciones crónicas en llamados problemas de hato. Esta prueba posee una sensibilidad de 79% y una especificidad de 100% (Meléndez et al, 1989).

Como desventaja tenemos que es una técnica complicada, requiere de muchos reactivos, invierte mucho tiempo, es lenta, costosa, requiere de una incubación de un día para otro; además de no poder diferenciar un animal infectado de un recientemente vacunado (Díaz y Blasco, 1994; Nielsen et al, 1996; Tizard, 1995).

2.6.2.4 Prueba de Rosa de Bengala (RBPT)

Es una prueba sencilla de aglutinación en la que se emplea un antígeno brucélico coloreado y tamponado para obtener un pH bajo, por lo general de 3.65 ó 4.0. Esta prueba reconoce la IgG_1 y en menor grado la IgM, empleándose como una prueba de preselección en el diagnóstico individual de bovinos, es altamente sensible especialmente en animales vacunados, por lo tanto las muestras positivas deben ser confirmadas por otros métodos (Corbel, 1991; FAO/OMS, 1986; Tizard, 1995). La prueba posee alta especificidad que es de 100% y baja sensibilidad, de 75% (FAO/OMS, 1986; Nielsen et al, 1989).

2.6.2.5 Prueba indirecta de Inmunoabsorvancia Ligada a Enzimas (i-ELISA)

La prueba de ELISA indirecta detecta anticuerpos específicos tipo IgG_1 en suero o leche y que puede ser más útil para detectar estadios tempranos de infección (Butler, 1980; Dinter, 1989; Melendez et al 1989). Se basa en la detección de anticuerpos contra el antígeno lipopolisacárido liso (LPS) que contiene el antígeno A clásico (98%) y el antígeno M clásico (2%). Este complejo antígeno-anticuerpo es visualizado por la adición de una anti IgG_1 bovina marcado por una enzima como la peroxidasa de rábano picante, que al entrar en contacto con la solución substrato-cromógeno dará el desarrollo de una coloración. La densidad óptica del color es medido en el espectrofotómetro y es directamente proporcional a la cantidad de inmunoglobulina detectada (Nicoletti y Tanya, 1993; Nielsen et. al., 1996).

La aplicación de ELISA indirecta es muy útil para ser usada en áreas de producción bovina sin vacunación con la Cepa 19 y en regiones donde se dispone de una reducida información sobre esta enfermedad (Uzal et al, 1995). Esta prueba tiene la ventaja que se puede trabajar varias muestras y con poco volumen de la misma, es eficiente, rápida y barata. Esta prueba es usada en el Perú para el diagnóstico de *B. abortus* y posee una sensibilidad y especificidad de 96.44 ± 2.2% y 96.35 ± 3.1%, respectivamente (Informe al IAEA/FAO, 1999).

Los intentos de los investigadores por encontrar una prueba diagnóstica de *Brucella abortus* se fue perfeccionando, es así que a la fecha se dispone de una ELISA de competencia (C-ELISA). Esta técnica es fácil de realizar, se requiere menos tiempo y puede diferenciar los anticuerpos de origen vacunal de los anticuerpos producidos por la *Brucella* de campo, constituyendo una herramienta diagnóstica de gran ayuda en poblaciones de animales vacunados con Cepa 19 en forma rutinaria (Carrasco et al, 1995; Rojas y Alonso, 1995; Uzal et al, 1995).

2.7 Control y erradicación de la brucelosis bovina

El control y la erradicación de la brucelosis bovina es el objetivo final de cualquier programa que se establezca en diversos países o regiones, y se base claramente en 4 pilares:

a) Vacunación sistemática de terneras

En la actualidad, las vacunas disponibles para el control de la brucelosis son *B. abortus* cepa 19 y *B. abortus* RB51 (Schuring et al, 1991), empleadas para la vacunación de bovinos y ungulados silvestres. La vacunación es una herramienta muy importante especialmente en las fases primarias de un programa cuando la prevalencia de la enfermedad es de mediana a alta.

El empleo de la Cepa 19 de *Brucella abortus*, se realiza en terneras de entre 3 y 12 meses, según los programas de cada país. Esta cepa otorga una protección de aproximadamente el 70% de acuerdo a distintos autores, pero tiene el inconveniente, de inducir títulos serológicos que son indistinguibles de los producidos por cepas de campo (Samartino et al, 2000).

Actualmente varios países vienen aplicando la nueva vacuna RB51, desarrollada en la década del 80 en EE.UU. por el Dr. G. Schuring a partir de la cepa virulenta 2308 de *Brucella abortus*. La cepa vacunal RB51 es de tipo rugoso atenuado que carece de la cadena O del LPS (Schuring et al, 1991). La ausencia de esta cadena permite vacunar una o varias veces sin inducir anticuerpos que reaccionen con las pruebas clásicas empleadas para el diagnóstico de *Brucella sp.*, las que no permiten diferenciar entre vacunación e infección (Kreeger et al, 2002; Samartino et al, 2000). Actualmente en EE.UU. se recomienda la vacunación con la cepa RB51, con dosis entre $1x10^{10}$ y $3.4x10^{10}$ CFU, en terneras entre 4 y 12 meses (Olsen et al, 1999). La vacunación de toros maduros y vaquillonas preñadas, con cepa RB51, no produce colonización en ganglios ni órganos sexuales, por lo que puede utilizarse esta vacuna para controlar la enfermedad en áreas de alta prevalencia, vacunando toda la población bovina (Edmonds et al, 1999).

Actualmente debido a la baja prevalencia de la brucelosis bovina en las principales cuencas del país, se ha dejado de vacunar, procedimiento recomendado por la OIE en áreas donde la prevalencia es menor al 2%. Por ello se ha iniciado el Programa de Erradicación de la brucelosis bovina en el país. La restricción económica nacional, ha obligado a reducir las acciones que deben desarrollarse paralelamente para la declaración de establecimientos, áreas o el país libre de brucelosis y tuberculosis bovina, como es la ampliación de la cobertura del programa en las áreas en ejecución, la eliminación de animales positivos, el estudio de la prevalencia en explotaciones de producción de carne y mixta, evaluación de otras especies susceptibles, medidas de vigilancia en centros de beneficio, control del tránsito de animales, productos y subproductos de origen animal (MINAG, 2002). Así, la declaración de áreas libres de brucelosis y tuberculosis bovina se encuentra en etapa de inicio, priorizado en las cuencas lecheras de Arequipa, Tacna y Moquegua, tanto por prevalencia baja (0,06%), como por el nivel de organización de los productores y la cantidad de animales existente, logrando la Declaración de Establecimiento Libre de Brucelosis Bovina de 560 hatos. Para lograr la certificación estos hatos, que han dejado de vacunar por más de 5 años, deben ser negativos por 3 veces consecutivas, cada 3 meses a la prueba de anillo en leche, más una prueba serológica de toda la población hembra mayor de 18 meses (MINAG, 2000).

b) Identificación y control del movimiento de animales

El movimiento de los animales debe restringirse y la identificación de los mismos es imprescindible en la fase de erradicación de la enfermedad. Se pueden determinar áreas o regiones de lucha obligatoria y de este modo puede permitirse el movimiento entre animales que circulen en zonas prevalentes pero de ninguna manera se debe permitir la entrada de animales en territorios saneados o libres de la enfermedad (Samartino, 2001). En Parinacochas el movimiento de ganado es frecuente porque los propietarios tienen pequeñas parcelas en distintas localidades de los distritos, a pesar de este constante movimiento los animales de los distintos hatos no tienen contacto entre sí. El ingreso de animales procedentes cuencas lecheras desarrolladas como Arequipa, Lima, etc., es mínimo, y cuando se da es por la compra de sementales. La saca de toros

para engorde y venta en Lima, se da durante todo el año, y constituye una fuente de ingreso importante para las familias campesinas.

c) Detección de los animales infectados

En la práctica el diagnóstico de la brucelosis se realiza por la demostración de la respuesta inmune humoral del hospedador por métodos serológicos. Todos los países utilizan una batería de técnicas basadas en pruebas tamiz o screening, confirmatorias o definitorias. Como prueba tamiz, el Rosa de Bengala y el BPA son las de elección por su alta sensibilidad, obteniendo un resultado cualitativo, positivo o negativo, que debe ser confirmado con las pruebas complementarias. Las pruebas confirmatorias más difundidas son el 2-mercaptoetanol (2ME) y el rivanol, y una reacción positiva indica la presencia de IgG en el suero estudiado, por lo tanto considera al animal como reactor. La técnica de mayor eficacia es la Fijación de Complemento, que se emplea como definitoria por su sensibilidad y gran especificidad. Nuevas técnicas que vienen siendo desarrolladas como la ELISA de competición, que además de su gran sensibilidad y especificidad, diferencia animales infectados de los vacunados, por lo que uso como prueba definitiva se está incrementando (Samartino, 2001).

d) Remoción de los animales positivos del hato

Cuando la enfermedad tiene una incidencia muy elevada la prueba y sacrifico puede no ser una opción viable para controlar la enfermedad a primera instancia. A ello la necesidad de una vacunación previa e intensa a fin de reducir la incidencia de la enfermedad; luego que ha disminuido la enfermedad puede introducirse la política de prueba y sacrificio (Corbel, 1991).

Hasta 1999 en Holanda, el Programa de Monitoreo de Hatos libres de *Brucella abortus*, se basaba en periódicas pruebas de hatos lecheros con el test de anillo en leche (MRT) y las pruebas serológicas de todos los animales menores de un año de hatos no lecheros usando la prueba de microaglutinación (MAT) como prueba tamiz, la misma que se utilizaba para evaluar muestras de vacas que abortaron. El alto número de

reactores falso positivos en ambas pruebas y en las pruebas de seroaglutinación (SAT) y Fijación de Complemento (CFT) usados como pruebas confirmatorias, motivaron el cambio a ELISA de competición como prueba confirmatoria para evitar la reacción cruzada contra anticuerpos contra *Campilobacter fetus, Salmonella urbana, Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* (Emmerzaal et al. 2002; Mariño et al. 1991).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

La provincia de Parinacochas se ubica al sur del departamento de Ayacucho, a una altitud promedio de 3,000 m.s.n.m.; comprende 8 distritos: Chumpi, Coracora, (capital de provincia), Coronel Castañeda, Pacapausa, Puyusca, Pullo, San Francisco de Rivacayco y Upahuacho. De los 8 distritos mencionados sólo se consideraron 4 (Chumpi, Coracora, Puyusca y Pullo), los demás fueron excluidos por ser en su mayoría zonas alpaqueras, donde los medios de producción están en manos de las Comunidades Campesinas, y que además sólo concentran el 22.24% de la población bovina total, que es criada de forma extensiva (INEI, 1995).

3.2 MATERIALES

3.2.1 Animales

Según el último Censo Agropecuario, la población bovina de los distritos muestreados fue de 25,502, de los cuales 14,534 son hembras (INEI, 1995. Cuadro 1). El estudio se realizó con hembras bovinas mayores de 18 meses (MINAG, 1985).

CUADRO 1: Población total, hembras bovinas y estratificación de las muestras según la procedencia de los animales en la Provincia de Parinacochas.

Distrito	Población bovina	Vientres bovinos	Muestra estratificada
Coracora	7,635	4,351	115
Chumpi	4,195	2,391	63
Pullo	6,008	3,424	91
Puyusca	7,664	4,368	116
Total	**25,502**	**14,534**	**385**

CUADRO 2: Rebaños y categoría de las hembras bovinas, según los distritos muestreados de la provincia de Parinacochas.

Distrito	N° de rebaños	Vaquillonas muestreadas	Vacas muestreadas	Total de hembras muestreadas
Coracora	8	12	103	115
Chumpi	4	6	57	63
Pullo	6	9	82	91
Puyusca	6	15	101	116
Total	**24**	**42**	**343**	**385**

3.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Suero bovino, antígeno de *Brucella abortus*.

3.2.3 MATERIALES

- Tubos al vacío Vacutainer x 10 ml, agujas Vacutainer x 1x1/2", micropipetas (30 *u*L), tips o puntas, viales de 2 ml, placa de vidrio, alcohol, algodón.

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Tamaño muestral

Para determinar el tamaño muestral se utilizó la fórmula para estimar una proporción (Daniel, 1996). Al no existir estudios anteriores en la zona, se empleó la proporción 0.5 con la cual se obtiene el mayor tamaño muestral mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{d^2}$$

En donde:

n = Tamaño muestral

Z = 1.96 (95% nivel de confianza)

p = 0.5 (proporción asumida)

d = 0.05 (precisión o error máximo permisible)

n = 385

El tamaño de la muestra (n=385) representó el número mínimo de animales a muestrearse (Cuadros 1 y 2). Como el lugar de estudio comprende varios distritos, para una mejor estimación de la prevalencia, el tamaño de la muestra se estratificó de acuerdo a la población de vientres bovinos de los 4 distritos muestreados de la provincia de Parinacochas. La estratificación se realizó utilizando la siguientes fórmula:

$$n_d = \frac{N_k \cdot n}{N}$$

En donde:

n_d = Tamaño de muestra del estrato

N_k = Población del estrato

N = Población total

n = Tamaño muestral

3.3.2 Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas entre Noviembre y Diciembre del 2000. Se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena Yugular, con agujas descartables #20G x 11/2", recolectadas con tubos al vacío Vacutainer x 10 ml. Posteriormente el suero es separado del coágulo mediante centrifugación, trasvasado a un vial y almacenado a –20 °C hasta el momento del procesamiento serológico en el laboratorio.

3.3.3 Detección de anticuerpos contra *Brucella sp.*

La prueba de Rosa de Bengala, fue llevada a cabo según el Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 1992), y del 6to informe del Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis (FAO/OMS, 1986).

A medida que se recolectaban las muestras, en los distritos trabajados, había que retornar a Coracora, para centrifugarlas en el laboratorio del Hospital de apoyo. Luego se separó el suero del coágulo, colectándolo en viales, que rotulados, fueron congelados. Finalizada la recolección, en el laboratorio del Hospital se desarolló la prueba, que consistió en:

- Se colocó 0.08 ml de suero, sobre la placa de vidrio, con ayuda de una micropipeta.
- Se adicionó al suero una gota (0.03 ml) del antígeno *Brucella abortus*-Rosa de Bengala.
- Con un palito de plástico, se homogenizó el suero y el antígeno, hasta observar una mezcla homogénea.
- La lectura se realizó dentro de los 3 minutos siguientes. Al cabo de este tiempo, los sueros reactores aglutinan la solución, observándose la sedimentación del complejo antígeno-anticuerpo. Los sueros negativos no muestran cambios en el color ni turbidez.

Para validar los resultados obtenidos, se volvió a ejecutar la prueba en el Laboratorio de Microbiología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la U.N.M.S.M., donde se obtuvo el mismo resultado.

Esta es una prueba cualitativa, si hay aglutinación, se interpreta como positivo.

3.3.4 Análisis de datos

3.3.4.1 Prevalencia aparente (Pa)

La determinación de la prevalencia aparente en bovinos de la zona se realizó con la siguiente fórmula:

$$Pa = \frac{Casos.positivos}{Total...de...muestras} x100$$

IV. RESULTADOS

Los 385 sueros trabajados no presentaron anticuerpos aglutinantes mediante la prueba de Rosa de Bengala.

V. DISCUSIÓN

En el país existen estudios sobre la brucelosis bovina en las principales cuencas lecheras de Cajamarca, Lima, Arequipa, el valle del Mantaro, en algunas zonas tropicales como Pucallpa, el Alto Mayo, Tarapoto en San Martín, entre otras, con prevalencias que varían de 0 a menos del 1% (Informe IAEA/FAO, 1999), en las que predomina el ganado mejorado; pero existe escasa información sobre la prevalencia de la brucelosis en bovinos criollos andinos a pesar de que estos animales constituyen el 86% (3.8 millones) del total de la población bovina del país (INEI, 1995). Una de las razones de la ausencia de datos sobre el aspecto zoosanitario de los bovinos criollos de la región andina como Parinacochas, podría ser la poca introducción de animales al área y el tipo de crianza, por lo que el objetivo del presente estudio fue conocer la prevalencia de la *Brucella sp.* en las hembras bovinas, criollas en su mayoría, de 4 distritos de la provincia de Parinacochas en Ayacucho.

El total de los bovinos estudiados resultaron negativos a anticuerpos contra la *Brucella sp.*, indicando que éstos animales no tuvieron experiencia con la *Brucella abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*. La ausencia de la brucelosis así como de la tuberculosis (Sánchez, D., 2002) en estos animales representan magníficas ventajas frente a otras áreas ganaderas donde ambas infecciones están presentes y constituyen permanentes amenazas para la salud animal y la salud pública.

Debe tenerse presente que la mayoría de la población bovina de los distritos muestreados son rebaños pequeños, de tipo criollo, criados en forma extensiva sin o con poca tecnología, con excepción del distrito de Coracora, donde existen varios hatos lecheros mejorados de crianza semi-extensiva. En la sierra, la crianza es de tipo extensiva y mixta, permitiendo que los animales de diferentes dueños compartan praderas y se junten en abrevaderos; por otro lado, las ferias donde se realizan la compra-venta de bovinos y otras especies constituyen medios favorables para la difusión de enfermedades como la brucelosis. Sin embargo, la ausencia de reactores a *Brucella sp.*, en los animales muestreados podría deberse a que esta enfermedad no ha ingresado a la provincia por ser restrictiva para el movimiento nacional de bovinos por estar sujeta al Programa Nacional de Control de la Brucelosis, supervisada por las autoridades sanitarias del SENASA, Ministerio de Agricultura.

Si bien los animales son vendidos y comprados libremente dentro de la provincia de Parinacochas, al parecer no es frecuente el ingreso de animales al área, significando también escasa oportunidad para que un animal infectado ingrese, aparte de la ausencia o una prevalencia menor de 1% de la brucelosis en la cuenca lechera de Arequipa (López et al. 1995) de donde podrían, por la cercanía, ingresar bovinos mejorados a Parinacochas.

Los datos proporcionados por los campesinos dueños de los animales no evidenciaron la existencia de problemas reproductivos como los abortos o retenciones de placenta, que son los signos clínicos más importantes de la brucelosis, constituyendo un argumento más que apoya la ausencia de la infección en los animales muestreados.

En países como Sri Lanka la prevalencia de la brucelosis es de 4.6%, pero, en aquellos animales criados en forma extensiva, en pequeños hatos, en áreas secas y sin tecnología, la prevalencia fue de 66%, indicando que la falta de restricción en el movimiento dentro del área es importante factor de difusión de la brucelosis (Silva et al, 2002).

El diagnóstico de la brucelosis en el país, es realizado mediante la prueba de aglutinación Rosa de Bengala o ELISA indirecta, como prueba tamiz, seguida por la prueba confirmatoria de Fijación de Complemento. La prueba Rosa de Bengala es una prueba de campo de simple realización con una especificidad de 100% y una sensibilidad de 75% (FAO/OMS, 1986), esta prueba es recomendada para estudios de seroprevalencia en lugares donde no se practica la vacunación contra la brucelosis como es el caso de Parinacochas. La existencia de muestras sospechosas o dudosas a Rosa de Bengala habría conllevado a la utilización de la prueba de Fijación de Complemento, pero ante la ausencia de reactores, no se consideró necesaria la inclusión de otras pruebas.

VI. CONCLUSIONES

La infección por *Brucella sp.* esta ausente en los bovinos muestreados de los 4 distritos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho, o de existir, tendría una prevalencia inferior a 4.87%.

VI. RECOMENDACIONES

A fin de mantener el status sanitario actual de la provincia de Parinacochas, área sin historia de vacunación contra la brucelosis, donde no existen animales reactores a Rosa de Bengala, se tendrían que ejecutar las recomendaciones de la OIE y del SENASA:

- Extender el plan del Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina, a fin de certificar oficialmente a la provincia de Parinacochas como área libre de brucelosis bovina, previa ejecución de las pruebas de anillo en leche, CFT y ELISA.

- Vigilancia epidemiológica: el ingreso de nuevos animales será con el Certificado Sanitario de Tránsito, que mediante las pruebas oficiales (MRT, CFT y/o ELISA) los certifica libres de infección.

- Educación sanitaria: dictar charlas a los productores a fin de que se organicen y trabajen en conjunto con las autoridades locales y los representantes del MINAG y SENASA, para mantener el status sanitario de sus animales.

- En las Ferias regionales, permitir sólo la exposición y venta de animales procedentes de hatos con certificación oficial.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbas, A.K; A.H. Lichtman; J.S Pober. 1991.** Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company. Philadelphia. EE.UU. Chapter nine. p.:158. 199.

2. **Acha, P.N. y B. Szyfres. 1989.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2da.ed., p. 14-34. Organización Panamericana de la Salud. Washington.

3. **Ackermann, M.R.; N.F. Cheville y B.L. Deyoe. 1988.** Bovine ileal Do-me lymphoepithelial cells: endocytosis and transport or *Brucella abortus* Strain 19. Vet Pathol. 25: 28-35.

4. **Baldwin, C.L.; X. Jiang; D.M. Fernandes. 1993.** Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of citokynes and iron. Trends Microbiol. 1:99-104.

5. **Bercovich, Z. 1998.** Maintenance of Brucella abortus-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. Vet Quart. 20:81-8.

6. **Bricker B.J. y S.M. Halling. 1994.** Differentiation of *Brucella abortus bv.* 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis bv.* 1 by PCR. J Clin Microbiol. 32(11):2660-2666.

7. **Butler, J.D. 1980.** Aplication of the amplified ELISA: Comparative quantitation of bovine serum IgG1, IgG2, IgA and IgM antibodies. Am J Vet Res. 41:1601-1603.

8. **Carrasco E.A.; F.A. Uzal; K. Nielsen. 1995.** Comparación de cuatro técnicas de ELISA en la evaluación de la respuesta serológica de terneros vacunados con *Brucella abortus*, Cepa 19. Arch Med Vet. XXVII. No. Extraord: 51-57.

9. **Centro Panamericano de Zoonosis, CEPANZO. 1970.** Brucelosis, Técnicas de seroaglutinación. Nota técnica N° 2 OPS/OMS. Buenos Aires, Argentina. p:10.

10. **Cheville, N.F; A.E. Jensen; S.M. Halling. 1992.** Bacterial survival, lymph node changes, and inmunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. Am J Vet Res. 53:1881-1888.

11. **Corbel, M.J. 1991.** Brucelosis. En: Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria. Laing, J.A., Brinley Morgan, W.J., Wagner, W.C. 4ta. Ed., p.201-236. Interamericana. España.

12. **Cruz, O.J. 1996.** Prevalencia de la Brucelosis Bovina en la Cuenca Lechera del Valle del Mantaro (tesis para optar el título de Médico Veterinario). Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p. 28.

13. **Daniel, W.M. 1996.** Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. p. 202-208. Uthea. Noriega Editores. México.

14. **Díaz, R. y J. Blasco. 1994.** Diagnóstico inmunológico de la brucelosis bovina. Bovis 57:59-77.

15. **Dinter, Z. 1989.** Diagnostic Virology. A review of methods at the National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden. Moreno-López, J. Ed. Coordinated Research Programe on Animal desease Diagnostics. FAO/OMA/SIDA /Swedish International Development Authorithy). p:125.

16. **Eaglesome, M.D. y M.M. Garcia. 1992.** Microbial Agents with Bovine Genital Tract Infections and Semen. Part I. *Brucella abortus*, Leptospira, Campylobacter fetus and Tritricomas foetus. Vet Bull. 62:746-775.

17. **Edmonds, M.D.; G.G. Schuring; L.E. Samartino; P.G. Hoyt; J.V. Walker; S.D. Hagius; P.H. Elzer. 1999.** Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and pregnant heifers. Am J Vet Res 60:6 722-5.

18. **Emmerzaal, A.; J.J. de Wit; T. Bakker; F.G. van Zijderveld. 2002.** The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. Vet Quart. 24(1):40-6.

19. **Ewalt, D.R. 1989.** Comparison of three culture techniques for the isolation of *Brucella abortus* from bovine supramammary lymph nodes. J Vet Diagn Invest. 1:227-230.

20. FAO/OMS. 1986. Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Sexto informe. Serie de Informes Técnicos 740. 149 p. OMS, Ginebra.

21. Forbes, L.B; S.V. Tessaro. 1996. Infeciton of cattle with *Brucella abortus* biovar 1 isolated from bison in Wood Buffalo National Park. Can Vet J. 37:415-419.

22. Forestier, C.; E. Moreno; S. Méresse; A. Phalipon; D. Olive; P. Sansonetti; J.P. Gorvel. 1999. Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. Infect Immunol. 67:8 4048-54.

23. Fox, K.F; M. Nagpal; P. Steinberg y K. Heroux. 1998. Identificacion of *Brucella* by ribosomal-spacer region PCR and differentiation of *B. canis* from other *Brucella sp.* J Clin Microbiol. 36(11):3217-3222.

24. Gall, D.; K. Nielsen; L. Forbes; W. Cook; D. Leclair; S. Balsevicius; L. Kelly; P. Smith and M. Mallory. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. J Wildl Dis. 37(1):110-118.

25. Gómez, M.J. 1993. La brucelosis bovina. el enemigo de todos. El Cebú. 269:8-13.

26. Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. 1995. III Censo Nacional Agropecuario: Resultados Definitivos, departamento de Ayacucho. Tomo II. Lima-Perú. 152-203 pp.

27. Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. 2000. Conociendo Ayacucho. Lima – Perú. 107 pp.

28. Informe reportado a la Agencia Internacionals de Energía Atómica (IAEA/FAO). 1999. 27 p.

29. Jacques, N. 1986. Compendio de Bacteriología Médica. 2ed. Ed. México. Acribia. P:82-89.

30. Jiang, X. y C.L. Baldwin. 1993. Effects of citokynes on intracellular growth of *Brucella abortus*. Infect Immunol. 61: 124-134.

31. Jubb, K.V.F.; P.C. Kennedy y N.P. Palmer. 1993. Pathology of Domectic Animals. 4th. Ed. Vol. I. p. 378, 396-399, 500-502, 521-522. Academic press, Inc.

32. Kadohira, M.; J.J. Mcdermott; M.M. Shoukri; M.N. Kyule. 1997. Variations in the prevalence of antibody to brucella infection in cattle by farm, area and district in Kenya. Epidemiol Infect. 118:1 35-41.

33. **Kariminia A.; G. Kavoossy; S. Khatami; E. Zowghi; S.K. Ardestani. 2002.** Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response to lipopolysaccharides extracted from two different Brucella strains. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 25(2):85-93.

34. **Kennedy P.C. y R.B. Miller. 1993.** The female genital system. In: Pathology of domestic animals, ed. Jubb K.V.F.; N. Palmer. 4th ed., pp. 396-402. Academic Press, San Diego, CA.

35. **Kerkhofs, P.; Y. Botton; P. Thiange, P. Dekeyser, J.N. Limet. 1990.** Diagnosis of bovine brucellosis by enzime immunoassay of milk. Vet Microbiol. 24(1):73-80.

36. **Kirkbride, C. 1990.** Laboratory diagnosis of livestock abortion. 3rd Edition. Iowa State University Press/AMES. USA. P:22-26.

37. **Kreeger T.J.; W.E. Cook; W.H. Edwars; P.H. Elzer; S.C. Olsen. 2002.** *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in elk. II. Failure of high dosage to prevent abortion. J Wildl Dis. 38(1):27-31.

38. **López, E.P.; L. Olivera; R. Perales; R. Rosadio. 1995.** Vigilancia epidemiológica de la brucelosis bovina en la Cuenca Lechera de Arequipa. Rev Inv Pec IVITA (PERU) 7(2):127-132.

39. **MacMillan, A. 1990.** Conventional serological test. Chapter 8. p. 153-198. In: Animal brucellosis. Ed. Nielsen, K. Y R. Duncan. CRC Press.

40. **Mariño, J.O.C.; M.M.I. Gallego; L.S. de Deleon; M.J. Almansa. 1991.** Comparación de técnicas serológicas en la evaluación de bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. En: J.F. Frank (ed.). Networking in brucellosis research. The United Nations university, pp. 120-130.

41. **Meléndez, L.V.; G.G. Schuring; A. Shudel; J.E. Devery y L.M. Dellers.** 1989. Manual de diagnóstico rápido de enfermedades virales de los animales utilizando métodos inmunoenzimáticos. Serie de publicaciones misceláneas, IICA-OEA: 34. San José, Costa Rica.

42. **Ministerio de Agricultura (MINAG) 1985.** Dirección General de Sanidad Agraria SENASA. Decreto Supremo N°121-85-AG. Reglamento para el Control y Erradicación de la Brucelosis bovina.

43. **Ministerio de Agricultura (MINAG) 1995.** Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA. Dirección de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Informativo.

44. **Ministerio de Agricultura (MINAG) 2000.** Dirección General de Sanidad Agraria SENASA. Decreto Supremo N°033-2000-AG. Reglamento para el Control y Erradicación de la Brucelosis bovina.

45. **Ministerio de Agricultura (MINAG) 2002.** Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA. Dirección de Programas Zoosanitarios. Control y erradicación de brucelosis y tuberculosis bovina. Memoria Anual. pp 45.

46. **Nicoletti, P. y V. Tanya. 1993.** Comparison of enzime-labeled immunoabsorbent assay partide concentration fluorescence immunoassay with standard serologic methods and bacteriologic culture for selection of *Brucella* sp. infected cows in herds with brucellosis. JAVMA, 202:1975-1977.

47. **Nielsen, K.; J.W. Cherwonogrodski; J.R. Duncan y D.R. Bundle. 1989.** Enzyme linked inmunosorbent assay for differentiation of antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinate with strain 19. Am J Vet Res. 50: 5-9.

48. **Nielsen, K.H.; D.E. Gall; W.A. Kelly; A.M. Vigliocco; M.D. Henning y M.M. García. 1996.** Aplicación de los inmunoensayos en la serología de la Brucelosis. En: Desarrollo del Inmunoensayo – Aplicaciones del inmunoensayo para el diagnóstico de la Brucelosis. Animal Diseases Research, Institute Agriculture and Agri-food Canada, Fallowfield Rood. Nepean,Ontario, Canada y Comisión Nacional de Energía Atómica. Buenos Aires, Argentina.

49. **Norton, J.H. y A.D.Thomas: 1994.** Brucella suis infection in pregnant cattle. Aust Vet J. 55:525-527.

50. **Oficina Internacional de Epizootias (OIE). 1992.** Suplemento al Manual de normas para las pruebas de diagnóstico y las vacunas para las enfermedades de las listas A y B de los mamíferos, pájaros y abejas. 2da ed. Francia. pp85.

51. **Oliveira, S.C.; J.S. Harms; E.L. Rech; R.S. Rodarte; A.L. Bocca; A.M. Goes; G.A. Splitter. 1998.** The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. Braz J Med Biol Res. 31:1 77-84.

52. **Olsen, S.C.; B. Bricker, M.V. Palmer; A.E. Jensen; N.F. Cheville. 1999.** Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. Res Vet Sci. 66:2 101-5.

53. **Pennimpede, E.F.F.; Trebucq, R.A.; Di Lorenzo, C.L.; Bernagozzi, J.A. 1996.** *Brucella abortus*: consideraciones sobre su inmunopatogenia en el bovino. Analecta Veterinaria. 26:34-40.

54. **Pérez, J.; M. Quesada; J. López; O. Casquet; M.A. Sierra; J. Martín de las Mulas. 1998.** Immunohistochemical detection of Brucella abortus antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. J Vet Diagn Invest. 10:1 17-21.

55. **Rafie-Kolpin, M.; R.C. Essenberg; J.H. 3rd Wyckoff. 1996.** Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in Brucella aboruts. Infect Immunol. 64:12 5274-83.

56. **Ramírez-Romero, R. 1998.** Is *Brucella abortus* a facultative intracellular pathogen with mitochondria-like activity?. Med Hypotheses. 51:1 41-5.

57. **Rojas, X. y T.M. Alónso. 1995.** ELISAS for the diagnosis and epidemiology of *Brucella abortus* infection in cattle in Chile. Arch Med Vet. XXVII, No Extraord: 45-50.

58. **Samartino, L.E.; M. Fort; R. Gregoret; G.G. Schuring. 2000.** Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. Prev Vet Med. 45:193-199.

59. **Samartino, L.E. 2001.** Brucelosis en Latinoamérica: Situación actual y perspectivas de control. Rev Inv Vet Perú; Suplemento 1:1-5.

60. **Sánchez, D.E. 2002.** Prevalencia de la tuberculosis bovina en la provincia de Parinacochas. Ayacucho. (Tesis para optar el título de Médico Veterinario). Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p. 41.

61. **Sangari, F.S. y J. Agüero. 1996.** Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. Microbiologia 12:207-218.

62. **Schuring, G.G.; R.M. Roop; T. Bagchi; S. Boyle; D. Buhrman; N. Sriranganathan. 1991.** Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet Microbiol. 28:171-188.

63. **Silva, I; A. Dangolla; K. Kulachelvy. 2000.** Seroepidemiology of *Brucella abortus* infection in bovids in Sri Lanka. Prev Vet Med. 46:51-59.

64. **Steinman, R.M. 1991.** The Dentritic Cell System and its Role in Inmunogenicity. Ann Rev Immunol. 9:271-296.

65. **Szulowski, K. 1999.** Diagnosis of *Brucella suis* infection in pigs and hares by ELISA. Polish J Vet Sci. 2(2):65-70

66. **Tizard, I. 1995.** Inmunología Veterinaria. .Interamericana. México. 4ta Ed. p:245-247, 429.

67. **Uzal, F.A; P. Abalos; P.F. Padilla; X. Rojas; A. Dajer; M. Silva; K.H. Nielsen; P.F. Wright. 1995.** Evaluación de un kit de ELISA indirecto para el diagnóstico de la Brucelosis bovina en Latinoamérica. Arch. Med. Vet. XXVII, N Extraord.:59-63.

68. **Zarco, L. 1988.** Abortos. In: Galina, C.; Saltiel, A.; Valencia, J. et al. Eds. Reproducción de Animales Domésticos. México. Limusa. p:211-253.

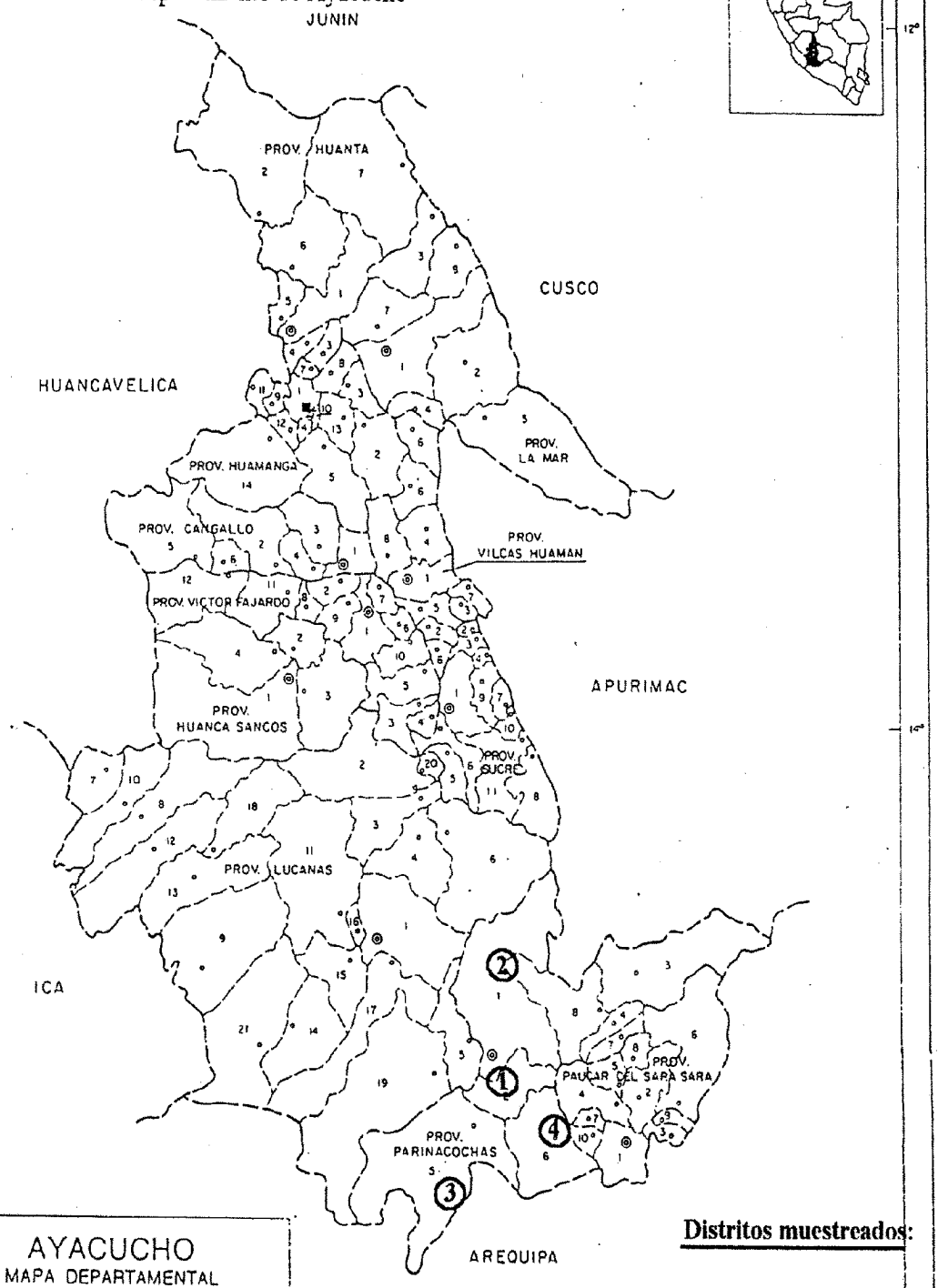
IX APÉNDICE

Apéndice N° 1. **Población bovina de los distritos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho.**

Distrito	N° de Unidades Agropecuarias	Población Bovina	Vientres Bovinos
Chumpi	1224	4,195	2,391
Coracora	624	7,635	4,351
Coronel Castañeda	168	1,577	899
Pacapauza	160	1,546	881
Pullo	537	6,008	3,424
Puyusca	719	7,664	4,368
San Francisco de Rivacayco	163	1,278	728
Upahuacho	410	2,893	1,649
Total	**4,005**	**32,796**	**18,691**

Fuente: INEI. 1995.

1. Area de Investigación. Provincia de Parinacochas, departamento de Ayacucho.



Distritos muestreados:

1) **Chumpi**
2) **Coracora**
3) **Pullo**
4) **Puyusca**

41