

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Determinación de la presencia de *Brucella spp.* En bovinos de la provincia de Canta - Lima

TESIS para optar el Título profesional de: MÉDICO VETERINARIO

AUTOR

Carmen Consuelo Huguet Tapia

LIMA – PERÚ 2004

A mis padres: Andrés y Rosa por todo
el cariño, confianza y valores que me
han inculcado en todos estos años.

A mis hermanos: José Carlos y Rodolfo
gracias por el ejemplo que me han sabido mostrar.

Y a toda mi familia por sus consejos que
contribuyeron a mi formación como
persona y profesional.
Gracias tío Vidal.

A mi director: Dr. Alfredo Delgado
por su ayuda y paciencia.

A mis asesores: Dra. Sonia Calle y Dr. Gonzáles
por toda la ayuda brindada.

Al Dr. Roberto Evaristo por su ayuda
en los inicios del presente trabajo.

Al Blgo. Christian Baldeviano y
Dr. Alejandro Llamoga
del INS por toda su ayuda.

A la Dra. Imelda Cardozo,
Dra. Marlene Cárdenas del SENASA
por su apoyo para la realización del
presente trabajo.

A mis amigos Flor, Ferni y Mariano por
su contribución en la realización de la tesis.

Y finalmente a todos mis amigos de la
Promoción LXV por los momentos compartidos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN.....	vii
SUMARY.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. BIOLOGÍA DEL GÉNERO BRUCELLAE	3
2.2. COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA Y FACTOR DE VIRULENCIA.....	5
2.3. TRANSMISIÓN.....	7
2.4. PATOGENIA.....	8
2.4.1. Mecanismos de ingreso y supervivencia intracelular.....	9
2.4.2. Diseminación e invasión a otros tejidos.....	11
2.5. MECANISMOS INMUNITARIOS.....	13
2.6. DIAGNÓSTICO.....	16
2.6.1. Diagnóstico Bacteriológico	16
2.6.2. Diagnóstico Serológico.....	17
2.6.2.1. Prueba de Aglutinación lenta en Tubo.....	17
2.6.2.2. Prueba de Rosa de Bengala.....	17
2.6.2.3. Prueba de Anillo de Leche.....	18
2.6.2.4. Prueba de Fijación de Complemento.....	19
2.6.2.5. Prueba de ELISA indirecto.....	20
2.6.2.6. Prueba de ELISA competitiva.....	20
2.6.2.7. Otras Pruebas.....	20
2.7. MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1.LUGAR DE ESTUDIO.....	26
3.2.ANIMALES.....	27
3.3.MUESTRAS Y CONSERVACIÓN.....	27
3.4.EQUIPOS Y MATERIALES.....	27
3.5. REACTIVOS.....	27
3.6. METODOLOGÍA.....	28
3.6.1. Prueba de Rosa de Bengala.....	28
3.6.2. Prueba de Fijación de Complemento.....	29

3.7. ANÁLISIS DE DATOS.....	30
3.7.1. Tamaño muestral.....	30
3.7.2. Intervalo de Confianza.....	31
IV. RESULTADOS.....	32
V. DISCUSIÓN.....	36
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. RECOMENDACIONES.....	41
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	42
APÉNDICE.....	51
APÉNDICE 1.....	51
APÉNDICE 2.....	51
APÉNDICE 3.....	52

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de *Brucella spp.* en el ganado bovino de la provincia de Canta-Lima, mediante la detección de anticuerpos para *Brucella spp.* en sangre a través de la prueba de Rosa de Bengala y Fijación de Complemento como prueba confirmatoria. Con esta finalidad se obtuvieron 486 muestras de suero en toda la provincia. El 0.21% (1/486) con IC mínimo 0.09 y máximo 0.60% de los animales muestreados, resultó un animal positivo a *Brucella spp.* perteneciente al distrito de Santa Rosa de Quives. Los resultados obtenidos del presente estudio indican la presencia de *Brucella spp.* muy baja en la provincia de Canta, lo que nos permitirá implantar un programa de erradicación de brucelosis bovina en dicha provincia.

Palabras claves: Brucelosis bovina, rosa de Bengala, Fijación de Complemento, anticuerpos Bovinos.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the presence of *Brucella* spp. in cattle in Canta Province, Lima Department. In order to get this goal, 486 serum samples from different animals were obtained in the entire province. Detection of antibodies in blood against *Brucella* spp was done using Rose Bengal Test. Additionally complement fixation test was used to confirm positive sera. Our results indicate that 0.21% (1/486), with a minimum IC 0.09 and a maximum 0.60%, of the sampled animals was positive to *Brucella* spp. The positive sample came from an animal in Santa Rosa de Quives City. The accomplished results in this study evidence that the presence of *Brucella* spp. in the Province of Canta is very low. This finding will allow us to implement a program of eradication for bovine brucellosis in this province.

Key words: bovine brucellosis, rose of bengal test, Complement Fixation test, bovine antibodies

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Población estratificada en cada distrito de la provincia de Canta-Lima.....	31
Cuadro 2. Distribución de muestras de sueros de vacunos hembras según distrito y diagnóstico serológico mediante la prueba de rosa de Bengala, provincia de Canta-Lima. 2003.....	33
Cuadro 3. Distribución de muestras de sueros de vacunos hembras según distrito y diagnóstico serológico mediante la prueba de rosa de Bengala y confirmados con Fijación de Complemento, Provincia de Canta. 2003.....	34
Cuadro 4. Prevalencia de vacas en edad reproductiva con Brucelosis bovina en la provincia de Canta-Lima. 2003.....	35

I. INTRODUCCIÓN

En nuestro país los hatos lecheros están ubicados principalmente en la zona de la costa, irrigaciones de altura media y valles interandinos de la sierra, bajo un sistema de crianza intensiva, semi-intensiva y extensiva, con razas de ganado tipo lechero Holstein, Brown Swiss y mejorado (criollo), constituyendo una actividad socio-económica muy importante, como fuente de abastecimiento de productos lácteos para el autoconsumo, así como para la provisión a las plantas acopiadoras y procesadoras de leche, etc. (SENASA, 2000).

Sin embargo, estas explotaciones no tienen un programa sanitario estricto y adecuado, sobre todo en las zonas alejadas de la capital, de allí la necesidad de priorizar el aspecto sanitario del hato a fin de detectar la presencia de enfermedades infectocontagiosas de importancia en la Salud Pública como es la brucelosis bovina, constituyendo una barrera para el comercio de animales y de subproductos de origen animal. (Aréstegui, 2001)

Son muy importantes las pérdidas en la producción animal debidas a la brucelosis, principalmente por la reducción de leche en vacas que abortan. Se estima que la infección ocasiona una pérdida de 20 a 25% en la producción de leche, por la reducción del periodo de lactancia debido al aborto y a la concepción retrasada. (Acha y Szyfres, 1989). Una secuela frecuente es la esterilidad temporal que alarga el periodo entre lactancias: en un rebaño infectado, el periodo medio entre dos lactancias

puede prolongarse en varios meses. Además, la pérdida de terneros interfiere con el avance genético. Esto es muy importante en los rebaños de carne, donde los terneros representan la única fuente de ingresos. Una incidencia elevada de esterilidad temporal y permanente provoca la eliminación de vacas valiosas y se producen algunas muertes por metritis tras una retención de la placenta. (Radostits *et al.*, 2002)

Además de lo mencionado, la brucelosis está considerada como una zoonosis importante, causante de la fiebre de Malta en el ser humano. Se la adquiere principalmente por el consumo de leche, queso fresco y otros derivados elaborados con leche cruda proveniente de animales infectados. La bacteria se aísla en muchos órganos además del útero y las ubres; la manipulación de la canal de un animal infectado puede suponer una grave exposición. La importancia de la enfermedad en las personas es una justificación suficiente para su erradicación.. El tratamiento más habitual en humanos es la administración de antibióticos de amplio espectro durante largos periodos.(Radostits *et al.*, 2002)

La brucelosis bovina, en nuestro país, se encuentra difundida especialmente en las cuencas lecheras de Arequipa, Trujillo, Cajamarca y Lima, en donde el sistema de explotación es intensivo, estabulado o semiestabulado. Los últimos reportes realizados por el SENASA en el año 2000 denotan una prevalencia menor al 1%, en los departamentos de Lima, Arequipa y Cajamarca, aunque no se precisa que dentro de este número de animales se encuentren los de la provincia de Canta. Es por ello que no se tiene ninguna información del estado sanitario con respecto a la brucelosis bovina en dicha provincia.

En tal sentido, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la presencia de la brucelosis bovina en la Provincia de Canta en sus diferentes distritos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOLOGÍA DEL GÉNERO BRUCELLAE

Estas bacterias miden 0,5 a 0,7 micras de ancho y 0,6 a 1,5 micras de longitud; no presentan cápsula ni esporas y carecen de flagelos; son aeróbicas e inmóviles; su metabolismo es respiratorio y tienen un sistema citocromo oxidasa basado en el transporte de electrones, con oxígeno o nitrógeno como aceptor terminal. Producen nitrato reductasa (Krieg *et al.*, 1984; García-Carrillo y Lucero, 1993). *B. abortus* es oxidasa y catalasa positiva, utilizando glucosa, pero preferentemente oxidan el eritritol como fuente de energía, y éste es responsable de la localización y crecimiento prolífico de manera parcial de la bacteria (Brook, 1999)

Las brucelas ven favorecido su crecimiento intracelular en los trofoblastos por la presencia del eritritol, un alcohol de 4 carbonos, que es un componente normal de los fluidos fetales bovinos. Otros azúcares simples como la glucosa, manosa, galactosa, fructosa, y N-acetil glucosamina no estimulan el desarrollo de estas bacterias en los tejidos fetales (Samartino, 2003) .

Hay cepas que requieren CO₂ suplementario para su crecimiento. La temperatura óptima para esta actividad es de 37°C; la mayoría de las cepas pierde su viabilidad a los 56°C; su esterilización se produce a una temperatura mayor a los 80°C. Para su crecimiento requiere un pH de 6,6 a 7,4, las destruye un pH menor a 3,5 (Krieg *et al.*, 1984; García-Carrillo y Lucero, 1993)

A pesar de las exigencias de crecimiento *in vitro*, la bacteria puede sobrevivir en determinados productos animales y en el ambiente durante periodos prolongados, bajo condiciones favorables como zonas húmedas y con temperaturas frías. Por ejemplo, *B. abortus* sobrevive en el estiércol a 12° C durante 250 días, al igual que en la placenta y tejidos fetales, leche infectada refrigerada y en otros productos lácteos sin pasteurizar, así como en el agua fría, puede mantener una infecciosidad prolongada. (William, 1999)

En el género *Brucella* se reconocen actualmente seis especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*. Recientemente, microorganismos con las características de *Brucella* se han aislado también en varias especies de mamíferos marinos y aunque una nueva especie ha sido propuesta, *B. maris*, esta proposición todavía no ha sido aceptada. (Blasco, 2001; Samartino, 2003)

Se han descrito también dos nuevas especies del género *Brucella*: *B. cetaceae* y *B. pinnipediae* teniendo como hospederos mamíferos marinos a los cetáceos, como los delfines y lobos marinos, respectivamente. La infección de mamíferos marinos tiene amplia distribución geográfica, siendo reportada también en cetáceos de las costas peruanas (Van Bressen *et al.*, 2001; Moreno, 2002). Estas dos especies nuevas pueden ser consideradas como riesgo zoonótico. Hasta ahora se ha descrito un solo caso humano, cuya historia clínica indica que fue contraída por manipulación de una cepa de estas especies (Brew, *et al.*, 1999). La denominación de estas dos nuevas especies no está tampoco considerada oficialmente aunque es la más aceptada. (Foster, 2002)

Las tres primeras especies (denominadas como “brucelas clásicas”) se han subdividido, a su vez, en biovares. De esta manera, *B. melitensis* se subdivide en tres biovares (1-3), *B. abortus* en siete (1-9), ya que se suprimieron los biovares 7 y 8, y *B. suis* en cinco (1-5). (Brook, 1999; Acha y Szyfres, 2003)

El patógeno principal en el ganado bovino es *B. abortus*. El biovar 1 es universal y el predominante de los siete que ocurren en el mundo. La distribución de los diferentes biovares presenta variaciones geográficas. En América Latina se han comprobado los biovares 1, 2, 3, 4 y 6 y más de 80% de las cepas correspondían al biotipo 1. Asimismo, los bovinos también pueden infectarse por *B. suis* y *B. melitensis*,

cuando comparten el pastoreo o las instalaciones con cerdos, cabras u ovejas infectados. La infección en bovinos por estas especies de *Brucella* suele ser más transitoria que por *B. abortus*, pero acarrea un grave peligro para la salud pública, ya que las hembras pueden excretar por la leche las bacterias que son más patógenas para el hombre. La infección por *B. suis* es poco frecuente, pero se han reportado en algunos países tales como Cuba, demostrando la presencia de *B. suis* en vacas. Por otro lado, en varios países se han observado con mayor frecuencia infecciones por *B. melitensis* en ganado bovino que se localizan en las proximidades de rebaños de ovinos y caprinos, sufriendo brotes importantes de infección por *B. melitensis*, cursando con signos semejantes a los causados por *B. abortus*. (Vera *et al.*, 1999; Blasco, 2001)

2.2. COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA Y FACTORES DE VIRULENCIA

La mayoría de los antígenos brucelares son comunes a todas las cepas. Una excepción a esto son los lipopolisacáridos somáticos (LPS) que difieren entre las cepas lisas (S) y rugosas (R) y en las proteínas de la membrana externa que muestran algunas diferencias entre los grupos de especies. Siendo estas dos estructuras los principales antígenos de éste género.

La envoltura celular es la estructura más característica de las bacterias Gram negativas, formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS). La envoltura celular del género *Brucella spp.* difiere de los Gram negativo por su membrana externa, por dos razones. En primer lugar, es relativamente permeable a agentes hidrofóbicos como colorantes, detergentes y sales biliares. En segundo lugar, es resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisozima, lactoferrina, defensinas, etc). (Moriyon *et al.*, 2002)

El LPS consta de una parte glucolípídica (lípidos A), inserta en la membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo, más interno y la cadena O (polisacárido O). Hay especies de brucelas (*B. ovis* y *B. canis*) que de forma natural

siempre carecen de cadena O (especies rugosas) y otras que característicamente la poseen como son las especies lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*). (Forestier *et al.*, 1999)

El LPS ha demostrado ser el antígeno diferencial entre cepas, pero además es un factor de activación policlonal para producir anticuerpos por linfocitos B, es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica y, por tanto, es prácticamente una de las principales moléculas reconocidas por el sistema inmune de los animales infectados (Gómez *et al.* 1991; Frorero *et al.* 1991). Por esto, el general de las pruebas serológicas detecta anticuerpos frente al lipopolisacárido tipo liso, (LPS-S). (Moriyón *et al.*, 2002).

La cadena O contiene los epítomos relevantes en el diagnóstico serológico realizado con las pruebas que detectan anticuerpos frente al LPS-S (todas aquellas pruebas que emplean suspensiones celulares o extractos que contengan LPS-S). Se presenta tres tipos básicos de epítomos, según estudios de anticuerpos monoclonales: el M o melitensis, el A o abortus y el C o común. Por tanto, el esquema clásico, según el cual hay sólo los epítomos A y M en diferentes proporciones en *B. abortus* (A>M) y *B. melitensis* (A<M) se sustituye por otro. Por ejemplo, *B. abortus* y *B. melitensis* del biotipo 1 serían AC y MC, respectivamente. Aunque estos datos son útiles para entender los diferentes serotipos, en el diagnóstico serológico es irrelevante el origen (abortus o melitensis) del antígeno (suspensión celular o LPS-S) y no es posible distinguir el serotipo (AC, MC o AMC) infectante. (Moriyón *et al.*, 2002)

Además de la cadena O del LPS, la *Brucella* en fase lisa (S) contiene un segundo polisacárido llamado hapteno nativo (NH) que es casi químicamente idéntico a la cadena O, que contribuiría a dar la superficie característica de las Brucelas de tipo S (Moriyón *et al.*, 2002)

Las proteínas de la membrana externa son divididas en tres grupos: grupo 1 (de mayor peso molecular 88-94kda) y posiblemente relacionado con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura. Grupo 2: (de peso 36-38kda) son equivalentes a las porinas de otras Gram negativas. Grupo 3: de peso 25-31kda cuyo papel es desconocido

(Oñate, 1995; Cloeckert, et al., 2002). Las proteínas del grupo 2 son muy estudiadas ya que éstas participan primordialmente en la inducción de respuesta inmune. (Forero *et al.*, 1991)

Existen varias lipoproteínas de bajo peso molecular en la envoltura de *Brucella* y se conocen los genes de tres de ellas y parece ser que inducen una respuesta serológica significativamente menos intensa que el LPS-S. (Moriyon *et al.*, 2002)

La composición periplasmática de la *Brucella* es casi desconocida. Son excepciones la enzima superóxido dismutasa-CuZn (SDO-CuZn), la enzima catalasa y ciertos glucanos circulares de función aún desconocida. En tanto las proteínas del citosol inducen anticuerpos y también hipersensibilidad retardada, a diferencia del LPS que no participa en esta reacción de hipersensibilidad. (Moriyon *et al.*, 2002)

2.3. TRANSMISIÓN

La concentración máxima de la bacteria se encuentra en el útero gestante, el feto y las membranas fetales, por lo que todos deben considerarse como fuentes principales de infección. Sin embargo, el número de bacterias disminuye a lo largo de los cultivos que se realizan en partos secuenciales y un elevado número de muestras uterinas procedentes de vacas infectadas presenta cultivos negativos tras el segundo y tercer parto. (Crawford *et al.*, 1990)

Las secreciones vaginales son la fuente principal de contagio que se produce desde aproximadamente 15 días antes del aborto o parto hasta 4 semanas siguientes al mismo. (Samartino, 2003).

Existen pruebas de una transmisión horizontal de la infección de bóvido a perro, y perro a bóvido. La forma mas probable y eficaz de transmisión, bóvido a perro, es por exposición a fetos abortados o a membranas placentarias infectadas, ya que los perros suelen ingerir los restos del parto. (Radostits *et al.*, 2002). Los perros infectados con *B. abortus* podrían jugar un importante rol en la epidemiología de la brucelosis del ganado vacuno. La relación entre perros infectados y focos de brucelosis en vacunos no

solamente ha sido informada sino también demostrada. Se ha observado que solamente los perros pueden transportar trozos de placenta o fetos abortados de un lugar a otro, generando la exposición directa al microorganismo. (Forbes, 1990). En el caso de la infección congénita se puede producir en terneros nacidos de vacas infectadas, pero su frecuencia es baja. Sin embargo, son raras las infecciones latentes en terneros nacidos de vacas infectadas. (Radostits *et al.*, 2002)

Los toros no suelen transmitir la infección de forma mecánica de vacas infectadas a las no infectadas. 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). El semen de un toro infectado puede contener grandes cantidades de brucelas pero no contagia a la vaca debido a que la acidez de la vagina contribuye a la destrucción de las brucelas, aunque en temporada de celo este pH asciende ligeramente, convirtiéndose en un medio adecuado para la sobrevivencia de la bacteria. En cambio, cuando se usan toros infectados para inseminación artificial, al depositar el semen con brucelas directamente en el útero (pH favorable) el contagio es probable. (Samartino, 2003).

La forma indirecta de transmisión, por medio de vectores mecánicos, en los cuales la sobrevivencia de las brucelas es muy corta, se ha demostrado la presencia de la bacteria en ciertos insectos como las moscas, mosquitos, garrapatas pero aún no queda claro el rol que cumplen en la transmisión. (Godoy *et al.*, 1985; Cheville *et al.*, 1989)

2.4. PATOGENIA

La bacteria logra ingresar a través de las mucosas de la cavidad oral, de la cavidad nasal, de la conjuntiva, o a través de la piel agrietada. Puesto que la ingestión es la vía de infección principal, se cree que la faringe es el sitio de entrada primario. (William, 1999)

Una vez que se dio el ingreso, las bacterias se dirigen a los ganglios linfáticos regionales. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el interior de las células del sistema retículoendotelial. Los ganglios linfáticos

responden a la agresión por medio de una hiperplasia retículoendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses.

2.4.1. MECANISMO DE INGRESO Y SUPERVIVENCIA INTRACELULAR

Los patógenos intracelulares han evolucionado hacia el desarrollo de mecanismos efectivos para sobrevivir en este medio, evitando así su eliminación por la acción de las células fagocíticas. Una vez que la bacteria ha ingresado a nivel intracelular empieza a desarrollar estrategias para su supervivencia, como la interferencia del tránsito intracelular (Aréstegui *et al.*, 2001).

Cuando las brucelas invaden los tejidos, son fagocitadas por los polimorfonucleares y macrófagos. Estas bacterias tienen al menos dos componentes que realizan una función inhibitoria para ser destruidos dentro de las células: un lipopolisacárido y un material nucleotídico. (Harmon *et al.*, 1988; Frenchick *et al.*, 1985)

Por su estructura química, el LPS es capaz de disminuir la susceptibilidad de la bacteria a la acción de péptidos catiónicos bactericidas (Oñate y Folch, 1989). El LPS brucelar en fase lisa (LPS-S) presenta en su extremo terminal moléculas de manosa que favorecen a la adherencia a los macrófagos del hospedero a través de los receptores de manosa. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa y, junto con el tropismo por el eritritol, se explica la avidez de la *Brucella* por el útero grávido. (Oñate y Folch, 1989; Aréstegui *et al.*, 2001)

Lípidos, como los que contienen ornitina, la presencia de fosfatidilcolina en la membrana externa y los ácidos grasos de cadena larga del lípido A contribuyen a la resistencia contra sustancias bactericidas. Las proteínas externas de membrana exponen una región hidrofílica que es utilizada por la bacteria como mecanismo de entrada a la célula hospedera a través de los receptores de integrina, que se encuentran en las células dendríticas de la piel y mucosas (Campbell *et al.*, 1994). Las integrinas participan en la interacción intercelular y con la matriz extracelular, y están involucradas en la

fagocitosis (Bullido, 1996). Este hecho puede explicar la penetración de *Brucella* a través de la piel intacta.

Estudios realizados apoyan la hipótesis de que las fracciones lipopolisacáridas y polisacáridas de la superficie celular de *Brucella abortus* (LPS-S y F5) podrían favorecer la sobrevivencia intracelular de la bacteria en los polimorfonucleares, contribuyendo en alguna medida a su virulencia (Soto, 1991) (Folch y Oñate, 1995)

Por otra parte, se han realizado estudios que indican que uno de los mecanismos por el cual *B. abortus* puede escapar de la muerte en el interior de los PMN (polimorfonucleares) sería a través de la producción de un componente de bajo peso molecular, semejante a un nucleótido, que inhibe el sistema antibacteriano de la mieloperoxidasa, impidiendo la degranulación. Estos antecedentes señalarían que habría más de un componente influyendo en la sobrevivencia de *B. abortus* en el interior de los PMN. (Soto, 1991; Parent, 2002; Liautard *et al.*, 1996)

Los antígenos solubles participan fundamentalmente en la supervivencia intracelular y en la multiplicación bacteriana. Los nucleótidos cíclicos GMPC y AMPC, liberados por *Brucella*, inhiben la desgranulación y la liberación de la enzima mieloperoxidasa de las células fagocíticas. Todas las proteínas inducidas específicamente dentro de la célula son consideradas como factores de virulencia; dentro de las cuales se encuentran las enzimas superoxidodismutasa (SDO-CuZn) y catalasa, las cuales detoxifican O_2^- y H_2O_2 , respectivamente. La expresión de estas enzimas es controlada por reguladores que detectan las concentraciones de O_2^- y H_2O_2 intracelulares. (Aréstegui *et al.*, 2001)

Existen además moléculas sideróforos (moléculas quelantes del hierro que son producidas por las bacterias en microambientes deficientes en hierro) de bajo peso molecular denominadas ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA). Se plantea la hipótesis que el DHBA es vital para la virulencia de la bacteria, impidiendo la generación de radicales hidroxilos, radical que evitaría la supervivencia de la bacteria dentro de la célula. (Parent *et al.*, 2002)

Las proteínas de choque térmico también juegan un papel importante en la colonización del macrófago. La acumulación de este tipo de proteínas permite la adaptación de la bacteria al aumento de la temperatura, al pH bajo y a otros factores de estrés microambiental, e incluso conserva las funciones de la célula bacteriana siendo esencial para su multiplicación. Se ha identificado una proteína de 70kda como el chaperón molecular, que es requerido para el crecimiento de la bacteria en las células del hospedero y está involucrado en la virulencia de esta bacteria (Köler *et al.*, 1996). La producción de proteínas de choque térmico ha sido descrita en *B. abortus* y *B. suis* en respuesta al estrés oxidativo y al pH ácido *in vitro*. (Aréstegui *et al.*, 2001)

Las bacterias una vez ingresadas a la célula fagocitaria son capaces, mediante factores específicos, de inhibir la formación de radicales de oxígeno y nitrógeno, interfieren con la fusión del fagosoma con el lisosoma, con la producción de citocinas como INF γ (interferón gama), IL-12(interleucina 12) y TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), además de interferir en la disminución de la disposición del hierro y la disminución del pH del fagosoma. (Aréstegui *et al.*, 2001)

La bacteria, además de interferir y evadir con los mecanismos de protección, es capaz de utilizar el citoesqueleto para su movilización o su diseminación intracelular (Aréstegui *et al.*, 2001; Ramírez-Romero, 1998)

2.4.2. DISEMINACIÓN E INVASIÓN A OTROS TEJIDOS

La diseminación septicémica de *B. abortus* es ayudada por la circulación de macrófagos, permitiendo así la colonización del bazo, útero, placenta, glándula mamaria, ganglios linfáticos y de otros órganos como el testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias en los machos. (Blasco, 2001; William, 1999; Adams, 2002)

La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal condiciona que la principal manifestación clínica de la infección en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de animales prematuros poco viables, con el consiguiente aumento de la mortalidad

perinatal (Samartino y Enright, 1996). El mecanismo desencadenante del aborto no se conoce con precisión; sin embargo, existen evidencias de que las endotoxinas bacterianas no son desencadenantes del aborto y lo más probable es que se produzca como consecuencia de las lesiones inflamatorias en la placenta y de las consiguientes alteraciones de la circulación sanguínea materno-fetal. En los machos, las principales manifestaciones clínicas son las alteraciones y la disminución de la fertilidad. (Blasco, 2001; William, 1999)

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. La bacteria tiene una especial predilección por la placenta de los rumiantes. En las infecciones agudas de vacas preñadas, hasta el 85% de las bacterias se localizan en los cotiledones, las membranas placentarias y el líquido alantoideo. (Radostits *et al.*, 2002).

La proliferación de brucela en el útero, provoca la necrosis y destrucción de las membranas placentarias maternas y fetales resultando en la muerte y posterior expulsión del feto. Los cambios patológicos a nivel de las carúnculas y cotiledones impiden la normal separación y expulsión de la placenta (Jubb y Kennedy, 1963). Si bien la placentitis es la principal causa que limita el normal funcionamiento de la placenta, las endotoxinas generadas por la brucela pueden también jugar un rol importante en la inducción del aborto (Anderson *et al.*, 1986). La *B. abortus* puede inducir la producción elevada de cortisol que, a su vez, deprime la producción de progesterona e incrementa la producción de estrógenos. El descenso de los niveles de progesterona, acompañado por aumento de los niveles de estrógeno, induce a un parto prematuro (Enright *et al.*, 1984).

Las vacas suelen ser portadoras de por vida y, por consiguiente, eliminarán la bacteria en la leche y en las secreciones del tracto reproductor al momento del parto. (William, 1999)

El aborto por *B. abortus* en las vacas infectadas es raro durante las gestaciones subsiguientes, se estima que sólo abortan por segunda vez entre 10 y 25% de las vacas, (Acha y Szyfres, 2003), la placenta puede resultar infectada durante la preñez y las

vacas portadoras pueden contaminar el ambiente durante el parto y por medio de sus secreciones durante periodos de tiempo variables después del parto. (William, 1999)

2.5. MECANISMOS INMUNITARIOS

La *Brucella spp.* es conocida como una bacteria residente de las células fagocíticas como también de las no fagocíticas como los trofoblastos; es decir, es un patógeno intracelular y, como tal, la inmunidad mediada por células desempeña un papel fundamental en la inducción de protección, mediante la estimulación de linfocitos T (linfocitos CD4 y CD8), por antígenos externos generalmente de naturaleza proteica (Tizard, 1995; Frorero *et al.*, 1991; Baldwin, 2002a). Una vez que la bacteria penetra al organismo por las diferentes vías, se producen en el huésped dos tipos de respuestas: una celular y otra humoral.

Los linfocitos T CD4, más conocidos como linfocitos colaboradores o helper (Th) se subclasifican en dos, basados en la especificidad de su secreción en respuesta a la estimulación por parte del antígeno patógeno. Unos, los linfocitos Th1 conocidos como células T inflamatorias, que son capaces de secretar interleucinas IL-2, interferon- γ (IFN- γ), factor de necrosis- β (TNF- β), pero no secretan interleucina IL-4. En contraste, los linfocitos Th2 llamados también células colaboradoras en la respuesta humoral, secretan IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, pero no IFN- γ . Todas estas citoquinas van a intervenir en la regulación de la proliferación de los linfocitos ya sea Th1 o Th2. (Wyckoff III, 2002)

Es conocido que el interferón- γ (IFN- γ) es un elemento importante para la respuesta celular, que a su vez activa la acción bactericida de los macrófagos. (Baldwin, 2002a; Schurig *et al.*, 1991)

Los linfocitos CD8 son células efectoras y son conocidos como linfocitos citotóxicos (Tc) debido a que por medio de las citoquinas que secretan eliminan los macrófagos infectados con *Brucella spp.* o haciéndolos exponer a otras células fagocíticas. (Baldwin *et al.*, 1993)

Baldwin (2002) indica que la inmunidad contra *B. abortus* en ratas se debe a los efectos combinados de los anticuerpos y la inmunidad mediada por células, realizada ésta por las células T de la clase CD4 y CD8. Además, se considera que los linfocitos T citotóxicos (CD8+) pueden mediar en la destrucción de las células infectadas por medio de la interacción con moléculas de la Clase I (CHM-I) asociadas con antígenos brucelares. Forestier *et al.* (1999) indica que el CHM-I junto con la IL-1 podrían participar en la presentación de los antígenos brucélicos a los linfocitos T bovinos. Mientras que los linfocitos CD4 (Th1) se relacionan con CHM-II, siendo responsables de la eliminación de las brucelas. (Aréstegui *et al.*, 2001; Schurig *et al.*, 1991)

El lipopolisacárido (LPS) es portador de los antígenos inmunodominantes de *Brucella spp.*, por lo que se considera responsable de la activación de los linfocitos B y de la inducción de la respuesta inmune humoral. En muchos casos es causante de los síntomas de shock séptico por la actividad endotóxica de la brucela. La capacidad del LPS para inducir dicho shock depende del Lípido A y se origina por la unión a las “proteínas de unión al LPS” (LBP) y al receptor CD14 de las células fagocitarias, estimulando en estas células la producción del TNF $-\alpha$, interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), que son los mediadores de la mayoría de los síntomas del choque séptico. (Oñate y Folch, 1989)

Se ha reportado que el mecanismo de señalización de las células mononucleares fagocíticas (generalmente macrófagos) normales es activado por el LPS bacterial a través de la kinasa PKC y MAP independiente de calcio y que la respuesta parece estar iniciada por una señal a través del receptor de superficie CD14, específico de macrófagos (Liu *et al.*, 1994).

Las proteínas, por el contrario, son portadoras de los antígenos responsables de la inmunidad protectora, que se traduce en una respuesta inmune mediada por células, motivo por el cual se considera que las proteínas periplasmáticas y de superficie en *Brucella abortus* tienen un alto valor como inmunógenos potenciales para su uso en la elaboración de vacunas o como reactivos de diagnóstico que ayuden en la prevención y diagnóstico de la brucelosis bovina (Oñate y Folch, 1989)

Investigaciones en esta línea han probado que diferentes fracciones proteicas de *Brucella spp.* inducen en linfocitos provenientes de animales sensibilizados, producen diferentes niveles de INF- γ e IL-2, que se correlacionan positivamente con los índices de linfoproliferación, indicando probablemente que los distintos componentes de *Brucella spp.* son capaces de inducir diferentes perfiles de citoquinas (Zhan *et al.*, 1993)

Oñate (1995) indica que la proteína SDO Cu/Zn (superoxidodismutasa) es capaz de inducir una respuesta celular de tipo Th1(CD4), ya puede inducir la producción de INF- γ e IL-2 pero no IL-4, lo que hace pensar que esta proteína podría ser un inmunógeno promisorio para la obtención en el futuro de vacunas recombinantes.

Esta inmunidad, mediada por células (IMC), puede ser usada como método de diagnóstico, como medida de la estimulación de linfocitos e hipersensibilidad retardada para animales que han sido expuestos a los antígenos.

En cuanto a la respuesta humoral, se define que los anticuerpos contribuyen a la protección contra la *Brucella spp.*; sin embargo, no son lo suficientemente efectivos como la respuesta celular. Es por ello que las vacunas vivas son más efectivas frente a las vacunas muertas, ya que inducen la respuesta de células tipo 2 o linfocitos T colaboradores tipo 2, Th2. (Zhan *et al.*, 1995). Varias investigaciones afirman que prácticamente el 95% de la respuesta humoral va dirigida contra LPS liso. (Gómez *et al.*, 1991)

Los bovinos infectados con brucelas de fase lisa, presentan en el suero inmunoglobulinas contra los antígenos bacterianos LPS-S, al hapteno natural (NH) y al polisacárido B. Lo primero en detectarse es Ig M, Ig G1 y G2. (Stevens *et al.*, 1994)

En bovinos serológicamente positivos, la mayor cantidad de anticuerpos presentes son de tipo Ig G1, a diferencia de los bovinos vacunados. Sólo pequeñas cantidades de Ig M y de Ig G2 están presentes en el suero de animales serológicamente positivos, siendo la mayor cantidad de Ig G2 en animales vacunados. (Navarro, 1995)

Es importante definir la naturaleza protectora de la respuesta inmune ya que esto contribuirá a la formación de nuevas vacunas, métodos para evaluación protectora de las vacunas, innovación de tratamientos para animales infectados y personas. (Baldwin, 2002)

2.6. DIAGNÓSTICO

2.6.1. Diagnóstico Bacteriológico

La brucelosis animal puede diagnosticarse presuntamente mediante el examen microscópico de frotis de hisopados vaginales, de placenta, de fetos abortados o de semen, coloreados por los procedimientos de Gram, Köster o Stamp, debiendo confirmarlo mediante el aislamiento bacteriológico que es la prueba de diagnóstico más específica. La muestra más recomendable es la tomada directamente de la vagina de los animales abortados. Además, la leche es una muestra recomendable, ya que más del 80% de los animales infectados excretan brucela por la leche.

El cultivo en agar sangre en una atmósfera conteniendo un 10% de CO₂ (salvo para el caso de *B. canis*) es el método más simple y utilizado de los procedimientos bacteriológicos. Sin embargo, en veterinaria, se hace indispensable la utilización de medios selectivos, ya que las muestras proceden de lugares que normalmente presentan una rica flora bacteriana (vagina, leche, fetos abortados, etc). Para el aislamiento de *B. abortus* se usa el medio selectivo de Farell. Las colonias de *Brucella spp.* en aislamiento primario no suelen ser visibles hasta los 3-5 días de incubación. (Carter, 1985)

Es preciso tener en cuenta que estas bacterias son consideradas como zoonóticas, hablando en términos de capacidad de transmitir a la especie humana. Por lo tanto, todos los trabajos de manipulación de muestras, siembras, deben realizarse adoptando las máximas precauciones. (Blasco, 2001)

2.6.2. Diagnóstico Serológico

Las pruebas mayormente utilizadas en diversos países, incluyendo el nuestro, son: aglutinación en tubo, rosa de bengala, aglutinación en placa, la prueba del anillo, fijación de complemento y ELISA indirecto. Las muestras empleadas son sangre y leche. Las pruebas ponen en evidencia el nivel de anticuerpos presentes en la enfermedad. Dependiendo del tiempo evolutivo de ésta, los anticuerpos detectables son IgG1, IgG2 y IgM en proporciones diferentes. (Nielsen, 2002)

2.6.2.1. Prueba de Aglutinación lenta en Tubo

Precursora de las pruebas serológicas actuales, todavía se sigue empleando en algunos países como prueba base, asociada a una prueba complementaria. Esta prueba pone en evidencia a los anticuerpos IgG2 y IgM, aunque es más eficiente en aglutinar los anticuerpos IgM que los IgG. (Tizard, 1995).

Tiene varias desventajas, la principal es la dificultad de detectar eficazmente la infección crónica o titulaciones bajas y difíciles de interpretar. Por tal razón la OIE no la recomienda como una prueba diagnóstica. (OIE, 2000)

2.6.2.2. Prueba de Rosa de Bengala

La prueba de rosa de Bengala puede utilizar dos tipos de cepas *B. abortus* S99 o S1119.3 teñidas con rosa de Bengala con un pH de 3.65. El bajo pH previene algunas aglutinaciones por IgM y favorece la aglutinación por IgG1; de este modo reduce las reacciones no específicas (Nielsen, 2002; Carter, 1985; Alton *et al.*, 1979, Davies, 1971). Es una prueba cualitativa muy sensible que detecta IgG1 y su positividad persiste por mucho tiempo, con la ventaja de realizarse en el suero sin diluir, además de presentar escasísimos fenómenos de prozona, por lo que su negatividad descarta prácticamente la enfermedad brucelar. (Casas, 1976)

La prueba de rosa de Bengala es altamente sensible, siendo uno de los valores de sensibilidad de 96.2% y, además, presenta un valor predictivo negativo muy bueno

(probabilidad de que un individuo o población no esté infectado cuando el resultado de la prueba da negativo) además de una especificidad de 95.8% (Davies, 1971). Samartino et al. (1999) determinaron la sensibilidad de rosa de Bengala en 96.1% y especificidad en 97.8% mientras que Rojas y Alonso (1995) determinaron la sensibilidad de 94.2% y una especificidad de 100%. Ese mismo año Navarro (1995) determinó la sensibilidad de la prueba en 94.2% y especificidad de 92%.

La prueba de rosa de Bengala presenta, además, cualidades tales como su simplicidad al ejecutar la prueba (permite la realización de la prueba a campo, reduciendo la necesidad del envío de un número de muestras hacia un laboratorio especializado), el tiempo dedicado a la ejecución es mínimo y, por ello, es considerada como prueba tamiz o base para el diagnóstico en programas que se encuentren en término de erradicar la brucelosis. (Moyer *et al.*, 1987; Megid *et al.*, 2000; Casas, 1976)

La prueba rosa de Bengala al ser altamente sensible, sobre todo en poblaciones que presentan animales vacunados con cepas lisas como la vacuna *B. abortus* cepa 19, da como resultado mayor número de falsos positivos, por tanto es recomendado utilizarla como prueba tamiz en poblaciones donde no se procede a la vacunación, como también en poblaciones que presenten prevalencia baja. (Samartino *et al.*, 1999)

Los resultados de falsos negativos en la prueba rosa de Bengala podrían atribuirse al tiempo de incubación de la infección. Es decir, se procede a la toma de muestra en el animal cuando se encuentra en una incubación temprana de la enfermedad donde los anticuerpos predominantes son los IgM y no los IgG (anticuerpo detectable para la prueba). (Erasmus, 1987)

2.6.2.3. Prueba de Anillo de Leche

Una adaptación de la prueba de aglutinación utilizando el antígeno teñido con hematoxilina detecta los anticuerpos existentes en la leche, ya sea procedentes de la sangre por filtración (IgM) o bien producidas localmente en la glándula mamaria (IgA). Por su baja sensibilidad puede causar interpretaciones erróneas causadas por

condiciones de mastitis, calostro y leche de la etapa final de lactación. (Nielsen, 2002; Fensterbank, 1989; William, 1999; López *et al.*, 1998)

2.6.2.4. Prueba de Fijación de Complemento

Se utiliza como prueba complementaria en casi todos los países. Detecta los anticuerpos de los tipos IgG1 y IgM (aunque la IgM en gran parte es destruida por el calor durante la inactivación del complemento del suero mientras que la IgG2 no fija complemento). Se le considera la prueba más sensible y precisa. Presenta el inconveniente de ser delicada y larga de efectuar (Fensterbank, 1989). Las técnicas de ejecución de la prueba difieren de un laboratorio a otro; las principales son: Fijación en frío y fijación en caliente, la macrotécnica en tubos y la microtécnica en placa.

El 50% de hemolisis se clasifica positivo en bovinos con títulos de 1:10 o superiores y sospechosos a los títulos de 1:5. Es una prueba laboriosa y complicada, pero valiosa por su alta especificidad (cerca del 99%); sin embargo, es de uso limitado debido al tiempo que se invierte en su estandarización, así como por su complejidad técnica que requiere de personal calificado (Dájer-Abimerhi *et al.*, 1995). Navarro (1995) determina valor de sensibilidad que va de 96 a 98.8% y con respecto a su especificidad los valores fluctúan entre 99.4 hasta el 100%. Se considera determinante en el diagnóstico confirmatorio de los sueros positivos a la prueba de rosa de Bengala. (García-Carrillo, 1981)

Se basa en la activación del complemento por la vía clásica, en donde es necesaria la presencia de una unión antígeno-anticuerpo para iniciar la reacción (fase invisible). Cuando existen anticuerpos contra *Brucella spp.*, se da la reacción antígeno anticuerpo y el complemento se une a esta reacción (Ag-Ac-C'), siendo incapaz de unirse al sistema hemolítico, que es un segundo sistema antígeno anticuerpo (fase visible), observándose una sedimentación de los glóbulos rojos con anticuerpos o hemolisina. En ausencia de anticuerpos contra *Brucella spp.* en el primer sistema durante la fase invisible, el complemento queda libre, uniéndose al segundo sistema antígeno-anticuerpo o sistema hemolítico, observándose una hemólisis (Alton *et al.* 1988).

Por tanto, si el suero presenta anticuerpos contra *Brucella spp.*, el complemento no va a estar disponible y, por tanto, no se va a producir la lisis de los eritrocitos sedimentándose y, por consiguiente, se formará en el fondo del tubo un botón de eritrocitos, dando la prueba como positiva. Ésta se realiza en varias diluciones para determinar la cantidad de anticuerpos. (Nielsen, 2002; Blasco, 2001)

2.6.2.5. Prueba de ELISA indirecta

La prueba es sencilla, puede detectar anticuerpos tipo IgG1, IgG2 e IgA; principalmente detecta IgG1 en suero bovino. La prueba de ELISA indirecta puede ser usada también en muestras de leche. Esta prueba es altamente sensible en la leche pudiendo detectar anticuerpos en bajas diluciones. (Nielsen, 2002; López *et al.*, 1998)

2.6.2.6. Prueba de ELISA competitiva

Debido a que varias pruebas no son capaces de diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos producidos por la infección, se desarrolló la prueba de ELISA competitiva, utilizando como antígeno SPL-S proveniente de *B. Abortus*, teniendo una alta sensibilidad y especificidad. De este modo, esta prueba es capaz de diferenciar anticuerpos vacunales de los anticuerpos de campo, utilizándose como prueba de confirmación. (Nielsen, 2002; Blasco, 2001; Dájer *et al.*, 2003)

2.6.2.7. Otras Pruebas

Existen otras pruebas diagnósticas alternativas, como la de reacción de hipersensibilidad retardada que detecta hasta un 70% de animales infectados, utilizando como alérgeno proteínas citosólicas que son obtenidas de cepas rugosas como la *B. abortus* RB51 (Moriyon *et al.*, 2002)

Otra prueba para detección de *Brucella spp.* es la Prueba de Reacción por Cadena de la Polimerasa (PCR), que se podría utilizar tanto en muestras de sangre y leche. Medina *et al* (2003) demostraron que el PCR con muestras de leche es superior al aislamiento bacteriano y puede ser útil en la confirmación rápida de *Brucella spp.* Se

pueden utilizar también pruebas con bacteriófagos específicos tales como bacteriófagos Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb) y Berkeley (Bk), entre otros. (Bricker, 2002b; Leal *et al.*, 1995; Krieg *et al.*, 1984)

El manual estándar de pruebas diagnósticas y vacunas de la OIE reconoce como pruebas base (tamiz) o “*screening test*” a las pruebas: rosa de Bengala, aglutinación en placa y ELISA indirecta y, además, que las muestras positivas serán confrontadas con una segunda prueba confirmatoria como es la prueba de Fijación de complemento o ELISA competitivo, si es que se tratara de ganado vacunado con la cepa 19. (OIE, 2000)

2.7. MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA

El control de brucelosis depende de cuan seguro es el método de identificación de *Brucella spp.* en ganado, animales silvestres y humanos. (Bricker, 2002a)

El primer componente es la implementación de una prueba tamiz inicial que sea de bajo costo, de fácil y rápida aplicación, con alta sensibilidad y considerable especificidad. La mayoría de las pruebas están basados en antígenos de aglutinación por la presencia de anticuerpos específicos en el suero de animales infectados. (Bricker, 2002a)

La sensibilidad es importante para la prueba inicial o tamiz, debido a su alta sensibilidad, ocasionando falsos positivos que serán confrontados en una segunda prueba de confirmación. Usualmente es más cara y más complicada, pero es altamente específica (Bricker, 2002a ; Stemshorn, 1985)

El control de la brucelosis bovina depende principalmente de la prevención a la exposición del ganado ante el microorganismo y, en general, del aumento de la resistencia mediante vacunación, por lo que se han usado dos vacunas principalmente, *B. abortus* cepa 19, aún en uso, y la vacuna *B. abortus* cepa RB51.

La vacuna *B. abortus* cepa 19, que consta de una cepa atenuada lisa obtenida en los años 30, ha tenido y tiene una relevancia importante en el control de la brucelosis en muchos países. Se aplica a terneras entre los tres y nueve meses de edad, la cual induce un aumento en los títulos de anticuerpos específicamente contra una fracción del lipopolisacárido (cadena O, propia de las cepas lisas), títulos que persisten post-vacunación y dificultan el diagnóstico. (Forero, 1991; Angus y Barton, 1984; Halling, 2002; Gómez *et al.* 1995; Carter, 1985; Schurig, *et al.*, 2002)

Los animales infectados de forma natural y los adultos vacunados con la cepa 19 mantienen títulos positivos en suero y en otras pruebas de aglutinación durante largo tiempo. La mayoría de los animales vacunados entre los 4 y los 8 meses de edad vuelven a ser seronegativos al año. (Radostits *et al.*, 2002).

Aristizabal (2000) sostiene que, a los 6 meses post vacunación con cepa 19, más del 90% de las terneras no presentan título a IgG. Otra investigación sostiene que la respuesta de anticuerpos desaparece entre los 5 y 12 meses post vacunación en las terneras vacunadas entre los 4 a 8 meses, pero persistirá mayor tiempo si la vacunación sobrepasa los 9 meses de edad. (Pluma, *et al.*, 2000)

Por tanto, la persistencia de los anticuerpos dependerá de la edad, de la dosis y de la vía de vacunación. Por este motivo, se probó otra vía para la utilización de la cepa 19: por vía conjuntival.

La vacunación conjuntival con B19 (una inoculación de 5×10^9) produce inmunidad adecuada en el ganado bovino frente a *B. abortus*, induciendo tan sólo una respuesta serológica débil y transitoria. Este procedimiento confiere también protección en bovino frente a *B. melitensis*. La repetición de esta vacuna, entre 3 y 12 meses después de la primera vacunación, brinda una eficacia protectora de una forma equivalente e incluso superior a la conferida por la vacunación subcutánea, sin inducir una respuesta serológica persistente. Esta limitada respuesta serológica hace que el procedimiento conjuntival sea una herramienta ideal para la revacunación de las terneras que fueron vacunadas subcutáneamente y quedaron mal protegidas, como también para la vacunación de vacas adultas en rebaños infectados o con riesgo, y que

resulta perfectamente compatible con un programa de erradicación por sacrificio. (Blasco, 2001)

En cuanto a la dosis de la vacuna cepa 19, Zambrano *et al.* (1991) trabajaron con dosis reducidas en hatos de vacunos infectados con brucelosis y concluyeron que la aplicación de una dosis reducida es igualmente efectiva para controlar la enfermedad, a pesar de que no se eliminan los animales reaccionantes.

La Cepa 19 que normalmente no es capaz de crecer en presencia de eritritol y por tanto con baja virulencia para los bovinos, es capaz de ocasionar abortos en 1 a 2.5% cuando se vacuna vacas preñadas. Además, tras una inoculación accidental, esta cepa vacunal puede provocar infección en el hombre. (Blasco, 2001; Schurig *et al.*, 2002)

Tras las desventajas que presenta esta vacuna Cepa 19, se ha logrado crear una importante corriente internacional para desaconsejar su uso, a favor de nuevas vacunas tipo rugosas (cepas en fase R carentes de LPS-S o cadena O)

La vacuna RB51 es un mutante de la *B. abortus* cepa 2308, cepa tipo rugoso resistente a la rifampicina (Schurig *et al.*, 1991). La inmunidad inducida por esta vacuna (en menos de un año después de la vacunación) es similar o mejor que la inducida por la cepa 19, no induce anticuerpos contra la cadena O-polisacárido de las cepas lisas y, por tanto, no produce confusión en las pruebas serológicas, pudiéndose diferenciar a los animales vacunados de los infectados (Vemulapalli *et al.*, 2002; Halling, 2002; Folch *et al.*, 1995). Además, Zambrano *et al.* (1995) sostienen que la vacuna no produce aborto en vacas preñadas.

La Cepa RB51 puede proteger contra las infecciones por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* (Winter *et al.*, 1996). Sin embargo, un estudio en ovejas informó que la vacunación con Cepa RB51 no protege a los carneros contra *B. ovis*. (Olsen, 1999)

La inmunidad que induce la vacuna RB51 es principalmente de tipo celular y las células que activa son preferentemente las de tipo Th1 con inducción del interferón

gamma, pero no la interleucina IL-4, incluyendo los linfocitos citotóxicos y algunos niveles de anticuerpos IgG2, pero no IgG1 (Vemulapalli *et al.*, 2000)

Aunque el uso de la vacuna RB51 no ha sido aún probado en toros, se ha probado en 20 toros adultos de 3 años de edad provenientes de zonas de alta prevalencia a brucelosis. Durante los 90 días estos animales no excretaron la bacteria y el semen observado no presentaba anormalidades en morfología. Después de los 90 días no se presentaron alteraciones patológicas de significancia y no se detectó, mediante aislamiento bacteriano, la presencia de la bacteria en los testículos, el epidídimo, nódulos iliacos o inguinales (Vargas, 2002)

La vacuna Cepa RB51 se utiliza actualmente en forma oficial en Estados Unidos, en reemplazo de la Cepa 19. Su uso también ha sido aprobado e implementado en Chile, Colombia, México y Venezuela. En Argentina se usa en forma voluntaria y tiene un permiso provisional. (Ramírez *et al.*, 2002)

Hasta ahora, el único procedimiento conocido para lograr el control y erradicación de Brucelosis animal consiste en la detección de los animales infectados mediante pruebas de diagnóstico adecuadas y su inmediata eliminación por sacrificio. Sin embargo, la aplicación de este programa de erradicación por sacrificio no siempre es posible, porque las condiciones socioeconómicas de los países afectados no lo permiten. (PANAFTOSA/OMS/OPS, 2002)

En zonas con una prevalencia baja y un elevado nivel socioeconómico, la vacunación debería estar desaconsejada, y en caso de brote será preciso aplicar un programa de profilaxis vacunal combinado con un programa de detección de los animales infectados y su sacrificio inmediato. (Blasco, 2001)

En cambio, en áreas de prevalencia alta se aconseja vacunar animales de 3-8 meses de edad, ya sea con la vacuna Cepa 19 o RB51, y además revacunar con RB51 a los animales entre los 10-18 meses de edad y a las vacas adultas. (Vargas, 2002)

Actualmente se está propulsando el desarrollo de nuevas vacunas dirigidas a provocar inmunidad de tipo celular, como es el caso de la formación de vacunas

recombinantes. Por ejemplo, algunos ensayos han logrado inducir a través de la proteína ribosomal L7/L2 (proteína purificada recombinante), indicando que podría ser un antígeno apropiado para inducir una respuesta de tipo celular (Oliveira y Splitter, 1996). Se han utilizado, además, varias vacunas recombinantes que incluyen antígenos de *Brucella spp.*, tales como GroEl, GroEs, SOD-CuZn, entre otros. Éstos inducen tanto respuesta inmune humoral como celular en ratones (Schurig, 2002; Wyckoff III, 2002)

Se ha descrito la construcción de dos vacunas recombinantes. La primera es RB51SOD/85A, es decir la cepa RB51, que tiene la capacidad de expresar SOD-CuZn y simultáneamente de expresar la proteína 85A (proteína protectora del *Mycobacterium bovis*). La otra vacuna recombinante es RB51ESAT, cepa RB51 que expresa la proteína ESAT-6, otra proteína protectora del *M. bovis*. Estas vacunas recombinantes son capaces de dar una protección tanto contra la Brucelosis como con el *Mycobacterium spp.* simultáneamente en ratones. (Vemulapalli *et al.*, 2002)

En el Perú se cuenta con un programa sanitario de control y erradicación de brucelosis bovina basado en métodos serológicos convencionales, tales como la aglutinación en placa, rosa de Bengala, prueba de anillo en leche y, como prueba confirmatoria, la prueba de fijación de complemento y ELISA, además del sacrificio de animales seroreactores. Se aplican, por parte de veterinarios y personal calificado, los dos tipos de vacuna *B. abortus cepa 19* y RB51 (comunicación personal, Dra. Marlene Cárdenas) (SENASA- <http://www.senasa.gob.pe>)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

Las comunidades campesinas de la provincia de Canta limitan: al Norte, con la provincia de Huaral, al Sur, con la provincia de Huarochirí, al Este, con el departamento de Junín (Yauli) y, al Oeste, con la provincia de Lima. El área tiene una extensión territorial de 1 646.53 km², comprende 7 distritos y 22 comunidades campesinas con sus respectivos poblados. El territorio presenta altitudes entre los 550 a 4 450 msnm, con una temperatura promedio anual entre los 5° C y 18° C y con una precipitación pluvial de 465 mm hasta 1 976 mm.(Vegas, 2003)

Su topografía es accidentada en la parte alta y plana en la parte baja, comprende los pisos ecológicos de yunga, quechua, suni y puna. La mayoría de comunidades campesinas se localiza en las laderas de los cerros. El paisaje natural de Canta es variado y se combinan zonas de climas cálidos y templados (yunga) como Yangas, Santa Rosa de Quives, la quebrada de Arahua. Le sigue la zona quechua, donde se ubican la mayor parte de las comunidades, con terrenos y clima apropiados para el sembrío de tubérculos, cereales, hortalizas y, conforme se asciende, se encuentran las zonas jalca y puna con extensos pastizales que alimentan el ganado. (Vegas, 2003; Valcárcel y Lumbreras, 1997)

3.2. ANIMALES

De acuerdo a los datos obtenidos por el III Censo Agropecuario (CENAGRO, 1994) se determinó la población pecuaria de la provincia de Canta. El número de animales llega a 13 268 cabezas de ganado bovino, cuyo sistema de producción es de tipo extensivo con pastura natural, principalmente (Apéndice 1). El tipo de ganado es cruzado o criollo, cruces con raza Holstein. Actualmente se está introduciendo la raza Brown Swiss en las zonas pertenecientes al distrito de Huamantanga. Los animales muestreados son bovinos en edad reproductiva a partir de los 18 meses (edad promedio de madurez sexual en dicha provincia). Estos animales, principalmente, son de doble propósito, es decir, para la producción de carne y leche. En cuanto a la vacunación del ganado bovino, la vacuna empleada es contra el carbunco sintomático. (INEI, <http://www.inei.gob.pe>)

3.3. MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción de la vena coxígea o vena yugular. Posteriormente el suero es separado del coágulo, trasvasado en viales y conservados a congelación de -20° C para su posterior procesamiento.

3.4. EQUIPOS Y MATERIALES

- Tubos al vacío (sistema vacutainers)
- Agujas vacutainers
- Aglutinoscopio
- Tips descartables
- Micropipeta de 50-200 μ l
- Espectofotómetro
- Centrifugadora
- Sistema de baño maría
- Refrigeradora y congeladora.

3.5. REACTIVOS

Se utilizó antígeno rosa de Bengala (cepa *Brucella abortus* 1119-3 al 8%) con un pH de 3.65 proporcionado por el Ministerio de Agricultura- SENASA y la prueba de Fijación de Complemento.

3.6. METODOLOGÍA

Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se esperaba encontrar, por lo menos, un suero positivo, demostrando con ello la presencia de brucelosis bovina en la provincia de Canta, se trabajaron dos pruebas diagnósticas: rosa de Bengala, como prueba inicial y, luego, las muestras que resultaron positivas se confrontaron con una prueba confirmatoria, la de Fijación de Complemento

3.6.1. Prueba de Rosa de Bengala

La prueba de rosa de Bengala está internacionalmente estandarizada para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina y es recomendada por el Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis y por la OIE.

El antígeno, al unirse con el anticuerpo presente en los sueros problema, da una reacción de aglutinación visible y uniforme.

Procedimiento:

1. Se agregó 0.03 ml del suero problema sobre uno de los cuadrados de lámina de vidrio del aglutinoscopio.
2. Se colocó una gota o 0.03 ml de Antígeno de rosa de Bengala cerca de la gota de suero problema.
3. Se procedió a mezclar bien el suero y antígeno con la ayuda de agitadores o mondadientes (uno por muestra), formando una zona de 2 centímetros de diámetro aproximadamente.
4. Se giró la lámina por 4 minutos manualmente.

Se hizo la lectura a los 4 minutos. Una reacción positiva presentará grumos de aglutinación, que pueden ser grandes o pequeños. En cambio, en una reacción negativa no se evidenciará aglutinación. Dado que es una prueba cualitativa, el resultado se registra como positivo o negativo. Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos IgG1 anti-Brucella.

3.6.2. Prueba de Fijación de Complemento

Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Animal del SENASA. Los sueros resultantes positivos a rosa de Bengala fueron confrontados con la Prueba de Fijación de Complemento. Previamente los sueros positivos fueron colocados en viales y conservados a temperaturas de congelación hasta su posterior procesamiento. Se procedió a inactivar el complemento a temperaturas de 60° C por 30 minutos, posteriormente se adiciona un indicador que consiste en eritrocitos de ovino sensibilizados con anticuerpos de conejo. Se incubará por 14 horas a temperaturas de 10° C luego se centrifuga para su posterior lectura.

3.7. ANÁLISIS DE DATOS

3.7.1. Tamaño muestral

Para determinar el número de animales mínimo que era necesario muestrear se utilizó la siguiente fórmula de Prevalencia Límite. (Ahbom y Norell, 1990)

$$n = \frac{\text{Log}(\alpha)}{\text{Log}(1 - p)}$$

Donde:

n = número mínimo de muestras

α = 0.01 (nivel de precisión) al 99%

p = prevalencia límite = 0.01 (MINAG, 1987)

Reemplazando:

$$n = \frac{\text{Log}(0.01)}{\text{Log}(1 - 0.01)}$$

$$n = 458 \text{ animales}$$

El tamaño de la muestra representa el número mínimo a muestrearse, y éste fue de 458 animales distribuidos proporcionalmente según la población bovina de cada distrito. Al final, se llegó a obtener 486 muestras de suero en toda la provincia. (Cuadro 1)

**Cuadro 1. Población estratificada en cada distrito de la provincia de Canta.
Departamento de Lima. 2003.**

DISTRITOS	POBLACIÓN BOVINA	UNID. AGROP.	MUESTRAS ESTIMADAS	MUESTRAS TRABAJADAS	UNID. AGROP.
Canta	2630	312	91	104	37
Huamantanga	3271	312	115	122	24
Huaros	2256	218	78	80	16
Lachaqui	2100	223	73	73	10
San Buenaventura	1122	94	37	40	9
Arahuay	986	97	32	32	8
Santa Rosa de Quives	903	91	32	35	7
TOTAL	13268	1347	458	486	111

3.7.2. Intervalo de Confianza

El intervalo de confianza se estimó empleando el método de Simulación Beta $[\beta(\alpha_1, \alpha_2)]$.

IV. RESULTADOS

Para el diagnóstico serológico de la *Brucella spp.*, en el presente estudio se utilizó la Prueba de rosa de Bengala y una prueba confirmatoria de Fijación de Complemento. De un total de 486 sueros analizados procedentes de los siete distritos que representa la provincia de Canta, se detectaron 2 positivos a rosa de Bengala (cuadro 2), siendo confirmados luego con la prueba de Fijación de Complemento, dando como resultado tan sólo un positivo perteneciente al distrito de Santa Rosa de Quives. (Cuadro 3)

Según el análisis de Simulación Beta, el valor de prevalencia promedio de los animales muestreados en la provincia de Canta fue de 0.21% (2.1×10^{-1}), con un intervalo de confianza de 0.09 (0.95×10^{-1}) a 0.60% (6.05×10^{-1}) (Cuadro 4). Los intervalos de confianza se obtuvieron directamente del gráfico de la función Beta (Apéndice 2).

Cuadro 2. Distribución de muestras de sueros de vacunos hembra, según distrito y diagnóstico serológico mediante la prueba de rosa de Bengala. Provincia de Canta. Departamento de Lima. 2003

DISTRITOS	TOTAL DE MUESTRAS	POSITIVOS	
		NÚMERO	%
Canta	104	0	0
San Buenaventura	40	0	0
Huamantanga	122	0	0
Huaros	80	0	0
Lachaqui	73	0	0
Arahuay	32	1	3.13
Santa Rosa de Quives	35	1	2.86
TOTAL	486	2	0.41

Cuadro 3 *Distribución de muestras de sueros de vacunos hembra, según distrito y diagnóstico serológico, mediante la prueba de Rosa de Bengala y confirmados con Fijación de Complemento. Provincia de Canta. 2003*

DISTRITOS	TOTAL DE MUESTRAS	POSITIVOS	
		NÚMERO	%
Canta	104	0	0
San Buenaventura	40	0	0
Huamantanga	122	0	0
Huaros	80	0	0
Lachaqui	73	0	0
Arahuay	32	0	0
Santa Rosa de Quives	35	1	2.86
TOTAL	486	1	0.21

Cuadro 4. Prevalencia de vacas en edad reproductiva con Brucelosis bovina en la provincia de Canta. Departamento de Lima. 2003

Número total de animales	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)	Intervalo de Confianza (%)	
				mínimo	máximo
486	485	1	0.21	0.09	0.60

V. DISCUSIÓN

La prevalencia obtenida de 0.21% con un intervalo de confianza de (0.09-0.60%) concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en distintas cuencas lecheras, como es el caso del Valle del Mantaro, cuya prevalencia fue menor al 1%, utilizando como prueba principal ELISA indirecta, detectando un solo positivo (0.28%), mientras que con la prueba de Rosa de Bengala la prevalencia encontrada fue de 0.83% (Cruz, 1996). En el caso de la selva alta, Cordero y Huanca en 1999 mencionan una prevalencia de 0.53%, en la región de Pucallpa, encontrando coincidencias con los resultados del presente trabajo.

Por ser la prueba altamente sensible y específica, de fácil ejecución, de bajo costo, de mayor eficacia de diagnóstico, posibilitando estrategias de control de *Brucella spp.* en menor tiempo y la opción de aplicarla en campo, la prueba de rosa de Bengala es considerada como prueba tamiz y aplicada en casi todos los países sudamericanos como prueba base en el programa de control y erradicación de brucelosis bovina. Por tanto, es capaz de identificar y seleccionar una población en riesgo. (Megid *et al.*, 2000). Además de poseer una sensibilidad y especificidad de 96.2% y 95.8% (Davies, 1971), tiene la desventaja de presentar un alto porcentaje de falso positivos en animales vacunados con Cepa 19. En la elección de la prueba tamiz fueron consideradas tanto sus ventajas como su desventaja, teniendo como antecedentes el no uso de vacunación alguna contra brucelosis bovina en la provincia de Canta. (SENASA, 2000)

En cuanto a la prueba de Fijación de Complemento fue elegida esta prueba como prueba confirmatoria por ser altamente específica (cercaos al 99%) y además de tener una buena correlación con la prueba de Rosa de Bengala (Sandhu y Joshi, 1993). En cuanto a su metodología, se eligió la variante Fijación de Complemento en Frío, porque presenta menos porcentaje de falsos positivos en comparación de la prueba en caliente. (Chappel *et al.*, 1978)

El resultado encontrado de un animal positivo tanto a la prueba de rosa de Bengala como a Fijación de Complemento, demuestra la presencia de *Brucella spp.* en el ganado bovino de la provincia de Canta, pudiendo ser *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*. Además de ello podría deberse a un falso positivo, aunque muy remota, ocasionada por reacciones cruzadas por otras bacterias que comparten el liposacárido superficial similar al del genero *Brucella spp.*, dentro de las cuales se puede citar a: *E. coli* O:116 y O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella* serotipos Kauffman-White del grupo N, *Pseudomona maltophilia* y *Yersinia enterocolítica* serotipo O:9, siendo esta última de mayor frecuencia de presentación en otros países. (Jonson *et al.*, 1994; Kreig *et al.*, 1984)

Dentro de las posibles alternativas mencionadas anteriormente, la más probable podría deberse a una infección por *Brucella melitensis*, debido a las características de explotación que presentan los ganaderos del distrito de Santa Rosa de Quives. Y es que presentan una explotación mixta, el ganado bovino se encuentra junto o cercano al ganado caprino, compartiendo los mismos corrales y pasturas. Además de ello, un número considerable de cabras han resultado positivas a *Brucella spp.* en dicho distrito. (comunicación personal, Dra. Imelda Cardozo). Inclusive, datos anteriores demuestran que la población caprina de dicho distrito presentó *Brucella melitensis*, tal como lo menciona Vargas (1999), donde se encontraron caprinos seroreactores en un porcentaje de 3.64% de un total de 330 muestras, siendo el mayor porcentaje de animales positivos correspondientes a caprinos no vacunados.

Por ello, es importante remarcar que el programa de erradicación de brucelosis bovina podría verse obstaculizado debido a una posible infección por causa de *B. melitensis* en zonas donde mantienen una crianza mixta con el ganado caprino o

cercanos a éste. Los bovinos son susceptibles a infectarse con *B. melitensis* y ocasionar un nuevo brote de brucelosis bovina por esta especie de *Brucella*, tal como ocurrió en algunos países europeos donde presentaban una crianza mixta de ganado bovino con ganado caprino (Blasco, 2001). Por tanto, la baja prevalencia de brucelosis bovina podría aumentar si es que no se procede a las medidas pertinentes.

Además del animal positivo del distrito de Santa Rosa de Quives, también se detectó otro animal positivo en el distrito de Arahuary a la prueba de rosa de Bengala. Sin embargo, a la prueba de Fijación de Complemento resultó negativo; por tanto, este animal se consideró falso positivo. La prueba de rosa de Bengala puede dar resultados falso positivos y esto podría deberse a dos causas principales. Una de ellas es la presencia de anticuerpos residuales por la vacunación con *B. abortus* Cepa 19, aunque en el caso de la provincia de Canta no se procede a la vacunación contra brucelosis (Gorfroid *et al.*, 2002). Y, la segunda, por causas de reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas anteriormente mencionadas

El no haber encontrado en los demás distritos reactores positivos podría deberse a la geografía de la región y a la falta de vías de comunicación adecuadas. La no tenencia de vías de transporte adecuadas, limita el traslado de animales y el ingreso de nuevos a dicha provincia, impidiendo en cierta medida la transmisión de la enfermedad, tal como ocurre en otras zonas que presentan características similares, ya sea de transporte o geográficas, como en el centro poblado menor Obenteni-Gran Pajonal, región de Ucayali, donde no se encontró ningún seroreactor a *Brucella spp.* (Zapata, 1998).

Además de ello, el movimiento de los animales se centra tan sólo entre los distritos de Canta, aunque se debe tener en cuenta que la zona de Santa Rosa de Quives puede ser una zona de inicio de propagación de la enfermedad debido a su tipo de crianza mixta (bovinos y caprinos) que promueve la transmisión, además de ser un distrito limítrofe de fácil ingreso de otros animales provenientes de otras provincias de Lima que puedan tener presente la brucelosis, ya sea bovina como caprina. (Blasco, 2001)

Considerando los datos obtenidos de una prevalencia menor al 1% en la provincia de Canta, le correspondería un programa de erradicación mediante pruebas serológicas de diagnóstico y, conjuntamente, el sacrificio de los animales que resultaran positivos hasta erradicar completamente los posibles animales reactivos (Acha y Szyfres, 2003). Sin embargo, esto podría presentar ciertas dificultades para su procedimiento, debido a la resistencia de parte de los ganaderos a proceder a la eliminación de sus animales positivos. Se ha observado en todo el trayecto del presente trabajo que el número de bovinos de los ganaderos del distrito Canta va de un extremo a otro; es decir, existe un alto porcentaje de ganaderos con un número pequeño de animales en producción, muchas de ellos son de subsistencia o para autoabastecimiento y, otros, que poseen un número mucho mayor, en promedio veinte animales en producción. Por tanto, se deberá considerar en el programa de erradicación la resistencia que presentarían los ganaderos para eliminar a sus animales que resultasen positivos a las pruebas serológicas.

Otra dificultad que podría impedir que se proceda a la erradicación de la brucelosis bovina es el manejo de sus animales, que consiste en el movimiento continuo de éstos. Es decir, los animales que se encuentren en seca y animales jóvenes son llevados a las alturas, movilizándose a diferentes zonas en varios distritos y, si uno de ellos presentara la infección, éste podría diseminar la enfermedad en varios distritos.

Finalmente, antes de iniciar el programa de erradicación de brucelosis bovina, es importante tomar en cuenta el grado de conocimiento que presentan los ganaderos de la zona, ya que se pudo observar un gran desconocimiento de la brucelosis bovina, así como también ocurre con otras enfermedades de gran importancia zoonótica, tal como es el caso de la tuberculosis bovina.

VI. CONCLUSIONES

1. Utilizando la prueba de Rosa de Bengala y la prueba confirmatoria de fijación de complemento se determinó la presencia de *Brucella spp.* con una prevalencia menor al 1%. en el ganado bovino de la provincia de Canta, departamento de Lima.
2. Debido a la baja prevalencia encontrada, la provincia de Canta se puede considerar como un área aplicable para un programa de erradicación de brucelosis bovina con el sacrificio de los animales positivos sin la inclusión de vacunación.

VII. RECOMENDACIONES

1. Siendo la prueba de rosa de Bengala una de fácil utilización, bajo costo y de alta sensibilidad, es recomendable continuar con la aplicación de dicha prueba como prueba tamiz en la provincia de Canta debido a que no se realiza vacunación alguna.
2. Monitorear constantemente al ganado bovino, sobre todo en donde se presenten explotaciones mixtas con caprinos como es el caso del distrito de Santa Rosa de Quives.
3. Fomentar la educación sanitaria de bioseguridad e implantar un programa previo informativo que sea capaz de concientizar a la población, sobre todo a los ganaderos, para que le den verdadera importancia a la erradicación de la brucelosis bovina.

VIII. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Acha, P. y Szyfres, B. 1989. Brucelosis. p. 9-31. En: Programa de control y erradicación de tuberculosis, brucelosis y fiebre aftosa. OPS/OMS y IICA. Arequipa-Perú.
2. Acha, P. y Szyfres, B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y en los animales. 3ª . Ed. Pub. Científica y técnica. Organización Panamericana de Salud. Washintong. USA. 1(580): 28-53.
3. Adams, G. 2002. The pathology of brucellosis reflects the outcome of battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.* 90: 553-561
4. Alton, G.; Rogerson, H. y McPherson, G. 1979. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rosa bengal test. *Aust. Vet. J.* 51 (2): 57-63
5. Alton, G.; Jones, L.; Angus, R. y Verger, J. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut Nationale de la Recherche Agronomique, Paris-Francia. 190 pp.
6. Ahlbon, A; Norell, S. 1990. Introduction to modern epidemiology. 2ª . Ed. p. 25-27. Resources Inc. USA.
7. Aréstegui, M; Gualtieri, C.; Domínguez, J. y Scharovsky, G. 2001. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet. Mex.* 32 (2): 131-139.
8. Aristizábal, M. y Céspedes, N. 2000. Respuesta serológica y persistencia de títulos en terneras Holando Argentino vacunadas y revacunadas con cepa 19 de *Brucella abortus* entre los 3 y 10 meses de edad. *Vet. Arg.* 17: 161-165.

9. Baldwin, C. 2002. (a) Immune response overview. *Vet Microbiol.* 90: 365-366.
10. Baldwin, C. y Parent, M. 2002.(b) Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: GAT the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.* 90: 367-382.
11. Blasco, J. 2001. Brucelosis animal: la enfermedad y medidas para su control y erradicación. En: Manual de brucelosis. Junta de Castilla y León. España. p. 31-43.
12. Brew, S.; Perrett, L.; Stack, J. MacMillan, A. y Staunton, N. 1999. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet. Rec.* 145: 483.
13. Bricker, B. 2002 (b). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90: 435-446
14. Bricker, B. 2002(a). Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Vet. Microbiol.* 90: 433-434
15. Brook, G.; Butel, J. y Morse, S. 1999. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual moderno. 16ª Ed. p. 306-309. México DF.
16. Bullido, R.. 1996. Monoclonal antibody involved in adhesion and complement mediated phagocytosis. *J. Immunol. Methods.* 195:125-134.
17. Campell, G.; Adams, L. Sowa, B. 1994. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41:295-306.
18. Casas, R. 1976. Diagnóstico serológico de la brucelosis. *Zoonosis.* 18 (3/4): 107-130.
19. Cloeckert, A.; Vizcaíno, N.; Paquet, J.; Bowden, R. y Elzer, P. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90: 239-247.
20. Crawford, R.; Huber, J.; Adams, B.1990. Epidemiology and surveillance. Animal brucellosis. Boca Raton. Fl. USA. p.131-151.
21. Cruz, J. 1996. Prevalencia de la brucelosis bovina en la cuenca lechera del Valle del Mantaro. Tesis. Médico Veterinario. FMV-UNMSM. p. 14-17.
22. Chappel, R.; McNaught, D.; Bourke, J. y Allan, G.. 1978. The diagnostic efficiency of some serological test for bovine brucellosis. *J. Hyg. Londres.* 80(3): 373-384.

23. Cheville, N.; Rogers, D.; Deyoe, W.; Krafur, E.; Cheville, J. 1989. Uptake and excretion of *Brucella abortus* in tissues of the face fly (*Musca autumnalis*). Am. J. Vet. Res. 50(8): 1302-1308.
24. Dájer, A.; Gutierrez, E.; Zapata, D.; Honhold, N. y Villegas, S. 1995. Comparación de cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* y reporte preliminar del porcentaje de reactores positivos en hatos bovinos en Yucatán. Rev. Biomed. Yucatán. México. 6: 84-90.
25. Dájer, A.; Gutierrez, E.; Zapata, D.; Sierra, E. y Cámara, E. 2003. evaluación de una prueba de ensayo inmunoabsorbancia ligado a enzimas de competencia (ELISA-C) para el diagnóstico serológico de brucelosis bovina. Rev. Biomed. Yucatán. México. 14(1): 23-28.
26. Davies, G. 1971. The rose bengal test. The veterinary record.88: 447-449
27. Enright FM, Walker JV, Jeffers G, Deyoe BL, 1984. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. Am. J. Vet. Res. 45(3): 424-430
28. Erasmus, J. y Davey, S. 1987. bovine brucellosis in the highveld region. 1. Effect of delay in transit on rose bengal test result. J. S. Afr. Vet. Assoc. 58(2): 81-84.
29. Fensterbank, R. 1989. Brucellosis bovina, ovina y caprina: Diagnóstico, control, vacunación. p. 25-30. En: Programa de control y erradicación de tuberculosis, brucellosis y fiebre aftosa. OPS/OMS y IICA. Arequipa-Perú.
30. Folch, H. y Oñate, A. 1995. Propiedades mitogénicas y caracterización de diferentes fracciones polisacáridas obtenidas de dos especies de *Brucella*. Arch. Med. Vet. 37:85-92.
31. Folch, H.; Rojas, M.; Oñate, A.; Alonso, O.; Leyán, V. y Jara, U. 1995. Humoral and celular response in calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. Arch. Med. Vet. Vol. 27. No Extraordinario: 125-130.
32. Forbes LB, 1990. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196(6):911-916.
33. Forero, C, Rueda, E, Mariño, O y de Deleon, L. 1991. Purificación y caracterización de proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*. p. 54-68. En: Networking brucellosis research. Report of the united nations university brucellosis research network. J. Frank.

34. Forestier, C.; Moreno, E.; Méresse, S.; Phalipn, A.; Olive, D. Sansonetti, P. y Gorvel, J. 1999. Interaction of *Brucella abortus* Lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect. Immun.* 67(8): 4048-4054.
35. Foster, G.; MacMillan, A.; Godfroid, J.; Howie, F.; Ross, H.; Cloeckert, A.; Reid, R.; Brew, S. y Patterson, J. 2002. A review of *Brucella sp.* Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 90: 563-580.
36. Frenchick, P. Markham, R. y Cochrane, A. 1985. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble of vilurent *Brucella abortus*. *Am.J. Vet. Res.* 46:332-335.
37. García-Carrillo, C. 1981. Prueba de fijación de complemento para el diagnóstico de la brucelosis. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS/OMS. Argentina. Nota Técnica No. 24
38. García-Carrillo, C. y Lucero, N.1993. Diagnóstico bacteriológico. p. 97-98. En: *Brucelosis Bovina. Hemisferio Sur.* Buenos Aires. Argentina.
39. Godfroid, J.; Saegerman, C.; Wellemans, V.; Walravens, K.; Letesson, J.; Tibor, A.; Mc Millan, A; Spencer, S.; Sanna, M.; Bakker, D.; Pouillot, R. y Garin-Bastuji, B. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when a specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.* 90: 461-477.
40. Godoy, A.; Peres, J.; Barg, L.; Costa, J. 1985. Ixodidae como reservorio de brucelosis animal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootecn.* 37: 369-375
41. Gómez, G; Moreno, L y Umaña, G. 1991. Elaboración de vacunas a partir de fracciones antigénicas de *Brucella abortus*. p. 33-47. En: *Networking brucellosis research. Report of the united nations university brucellosis research network.* J. Frank. USA.
42. Gómez. P; Rueda, E; Villamil, M y Mariño, O. 1995. Mecanismos de protección inducidos por proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepa RB51. *Arch. Med. Vet.* Vol. 27. No extraordinario: 65-75.
43. Halling, S. 2002. Paradigm shifts in vaccine developmet: lessons learned about antigenicity, pathogenitcity and virulence of *Brucellae*. *Vet. Microbiol.* 90: 545-552.

44. Harmon, B. Adams, L. y Frey, M. 1988. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 49:1092-1097.
45. Cordero, A. y Huanca, W. 1999. Incidencia de *Brucella abortus* en ganado bovino cruzado en la zona de Pucallpa. (Online). Disponible: http://tumi.lamolina.edu.pe/resumen/anales/1999_105.pdf (20/03/2004)
46. Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. 1994. Compendio Estadístico. Censo Nacional Agropecuario de 1994. (Online). Disponible: <http://www.inei.gob.pe> (15/03/2004)
47. Jubb, K y Kennedy, P. 1963. Pathology of Domestic animals. Academic Press. New York Vol. 1. 574 pp.
48. Köler, S.; Teyssier, J.; Cloeckaert, A.; Rouot, B.; Liautard, J. 1996. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol. Microbiol.* 20: 701-712.
49. Krieg, N.; Holt, J. 1984. Begey's manual of systematic bacteriology. Edit. Williams y Wilkins. USA Vol 1. 377-388.
50. Leal, D.; Martínez, I.; López, A. y Martínez, J. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella spp.* From blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33(12): 3087-3090.
51. Liautard, J.; Gross, A.; Dornand, J. y Köhler, S. 1996. Interactions between professional phagocytes and *Brucella spp.* *Microbiol. SEM* 12:197-206.
52. Liu, M.; Herrera, P.; Brownsey, R.; Reiner, N. 1994. CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogenbacterial lipopolysaccharide, *J. Immunol.* 153 (6): 2642-2652.
53. López, J.; Best, A. y Morales, C. 1998. Diagnóstico de Brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). *Arch. Med. Vet.* 30 (1): 133-138.
54. Medina, G.; Rentería, T.; Licea, A.; Navarro, A.; Morales, J.; Montaña, J.; Pujol, L.; Saucedo, J. y Nielsen, K. 2003. Detección de brucelosis en ganado bovino a partir de muestras de leche y colonias sospechosas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). II Simposio internacional de brucelosis. Edit. E. Orozco y col. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México. p. 47-48.

55. Megid, J., Ribeiro, M. y Marcos, G. 2000. Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis. *Brazil. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37(5.):107-141
56. Moreno, E.; Cloeckaert, A. y Moriyón, I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 90: 209-227.
57. Moriyón, I; Díaz, R. y López, I. 2002. Bacteriología del género *Brucella*. Manual de brucelosis. Junta de Castilla y León. España. p. 22-30.
58. Moyer, N.; Evins, G.; Pigott, N.; Hudson, J.; Farshy, C.; Feeley, J. y Hausler Jr. 1987. Comparison of Serologic Screening Test for Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 25(10): 1969-1972.
59. Navarro, F. 1995. Determinación de la prevalencia serológica de brucelosis bovina en distintas zonas de la república Argentina. Tesis. Médico Veterinario. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río de Cuarto. Argentina. p. 55-72
60. Nielsen, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.:* 90: 447-459.
61. OIE. 2000 Manual of standards for diagnostic test and vaccines. Bovine brucellosis. Paris. Francia p. 328-354.
62. Oliveira, S. y Splitter, G. 1996. Immunization of mice with recombinant L7/12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine.* 14: 959-962.
63. Olsen, S. 1999. Vacunas disponibles para el control de brucelosis en animales. En: Brucelosis consulta de expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación. Centro panamericano de fiebre aftosa- OPS/OMS. p. 47-50.
64. Oñate, A. 1995. Proteína de 18.5kDa: un antígeno interesante en *Brucella*. *Arch. Med. Vet.* Vol. 27. No. Extraordinario: 93-102
65. Oñate, A. y Folch, H. 1989. Proteínas totales de *Brucella abortus* cepa 19 y sus contaminantes. *Ach. Med. Vet.* 21:103-108.
66. Parent, M.; Bellaire, B.; Murphy, E.; Roop, M.; Elzer, P. y Baldwin, C. 2002. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) facilitates intracellular survival of bacteria. *Microb Patho.*32(5): 239-248.

67. PANAFTOSA/OPS/OMS. 2002. II Reunión de países del cono sur: Tuberculosis y brucelosis. Brasil. (Online) Disponible: <http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/IIReuniaoConeSul.pdf> (13/04/2004)
68. Pluma, B.; Alonso, M.; Mesa, R.; Carrero, R. y Guedes, J. 2000. Obtención y evaluación de la vacuna cubana contra la brucelosis bovina. Rev. Cub. Cien. Vet. 26(1):30-32
69. Radostits, O.; Gay, C.; Blood, D. y Hinchcliff, K. 2002. Medicina veterinaria-tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. t. I. p. 1025-1053. McGraw-Hill-Interamericana. España.
70. Ramírez, M, Ernst, S, Elvinger, F.; Rivera, A. y Rosenfeld C. 2002. Respuesta serológica y tiempo de saneamiento en rebaños bovinos con brucelosis vacunados con Cepa 19 o Cepa RB-51; X^a Región, Chile. Arch. med. vet.34(2):213-220.
71. Ramírez-Romero, R. 1998. Is *Brucella abortus* a facultative intracellular pathogen with mitochondria-like activity?. Med. Hypothese. 51(1):41-45
72. Samartino, L. 2003. Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. p. 1-7.
73. Samartino, L.; Gall, D.; Gregoret, R. y Nielsen, K. 1999. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Microbiol. 70:193-200.
74. Samartino, L. y Enright, F. 1996. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 19(1): 55-63.
75. Sandhu, K. y Joshi, D. 1993. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic test for brucellosis. Indian. J. Pathol Microbiol. Oct; 36(4): 458-465.
76. Schurig, G. 1991. The role of cell mediated immunity in brucellosis. p. 93-96. En: Networking in brucellosis research. Report of the united nations university brucellosis research network. Edit. J. Frank. USA.
77. Schurig, G.; Roop, R.; Bagchi, T.; Boyle, S.; Bubrman, D. y Sriranganathan, N. 1991. Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 28:171-188.

78. Schurig, G.; Sriranganathan, N. y Corbel, M. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90: 479-496.
79. SENASA. 2000. Control y erradicación de tuberculosis y brucelosis bovina. Manual de procedimientos. Ministerio de Agricultura-SENASA. Programa de desarrollo de sanidad agropecuaria-PRODESA. p. 1-9.
80. SENASA. 2003. Programa de control y erradicación de tuberculosis y brucelosis bovina. (Online). Disponible: <http://www.senasa.gob.pe> (15/08/03)
81. Soto, L.; Rojas, X. y Alonso, G. 1991. Estudio *in vitro* del efecto de fracciones de pared celular de *Brucella* sobre la actividad de leucocitos polimorfonucleares bovinos. *Arch. Med. Vet.* 23(1): 27-33
82. Stemshorn. R. 1985. Bovine brucellosis-Diagnosis and eradication. *Can. Vet. J.* 26:35-39.
83. Stevens, M.; Hennager, S.; Olsen, S. y Cheville, N.1994. Serologic Responses in Diagnostic Test for Brucellosis in Cattle Vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB 51. *J. Clin. Microbiol.*32(4):1065-1066.
84. Tizard., I. 1995. Inmunología veterinaria. 4ª Ed., p. 242-266. Interoamericana McGraw-Hill. México.
85. Valcárcel, M. y Lumbreras, K. 1997. Agricultores de Chillón: Modernización e institucionalidad. p. 21-26. Fovida. Perú.
86. Van Bressenm , M.; Van Waerebeek, K.; Raja, J.; Godfroid, J; Breen, S. y MacMillan, A. 2001. Serological evidence of *Brucella* species infection in ondontoceles from the south pacific and the Mediterranean. *Vet. Rec.* p. 148, 657-661.
87. Vargas, I. 1999. Prevalencia de *Brucella melitensis* en el Valle de Chillón Provincia de Canta Departamento de Lima. Tesis. Médico Veterinario. FMV-UNMSM. p. 15-20
88. Vargas, F. 2002. Brucellosis en Venezuela. *Vet. Microbiol.* 90: 39-44
89. Vegas, J. 2003. A propósito del desarrollo del capitalismo en las comunidades campesinas de Canta: alcances y límites. *Revista de antropología.* UNMSM-Facultad de Antropología. Año 1(1): 87-92
90. Vemulapalli, R.; He, Y.; Boyle, S. Sriranganathan, N. y Schurig, G. 2000. *Brucella abortus* RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune response. *Infect. Immun.* 68: 3290-3296.

91. Vemulapalli, R.; He, Y; Sriranganathan, N.; Boyle, S. y Schurig, G. 2002. *Brucella abortus* RB51: enhanced vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet. Microbiol.* 90: 521-532.
92. Vera, A.; Seoane, G., Serrano, E. y Fernández, A. 1999. Evolución de la brucelosis bovina en Cuba. *Perspectivas. Rev. Cub. Cien. Vet.* 25(1): 3-7.
93. William, C. 1999. Enfermedades del ganado vacuno lechero. p. 623-626. Acribia. Zaragoza. España.
94. Winter, A.; Schurig, G, Boyle, S; Sriganathan, N; Bevins, J.; Enright, F.; Elzer, P. y Kopec, J. 1996. Protection of BALB/C mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella mellitensis* and *B. suis* biovar 4. *Am. J. Vet. Res.* 57: 677-683.
95. Wyckoff III, J. 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 90: 395-415.
96. Zambrano, A; Chiriguayo, B; Villalva, F. y Loor, K. 1991. Eficacia de dosis reducida en la vacunación de adultos de hatos vacunos infectados con brucelosis. p. 97-99. En: Networking brucellosis research. Report of the united nations university brucellosis research network. Edit. J. Frank. USA.
97. Zambrano, A; Villava, F; Schurig, G y Cherwonogrodzky, J. 1995. Preliminary results for the vaccination of pregnant cattle with *Brucella abortus* strain 19 or *B. abortus* RB51. *Arch. Med. Vet.* Vol. 27. No Extraordinario: 119-123
98. Zapata, F. 1998. Seroprevalencia de *Brucella abortus* en el centro poblado menor de Obteni-Gran Pajonal mediante la prueba de Elisa. Tesis. Médico Veterinario. FMV-UNMSM. p. 19-30
99. Zhan, Y.; Kelson, A. y Cheers, C. 1995. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Infect. Immun.* 63:969-975.
100. Zhan, Y.; Yang, C. y Cheers, C. 1993. Cytokine response of T cell subset from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect. Immun.* 61: 2841-2847.

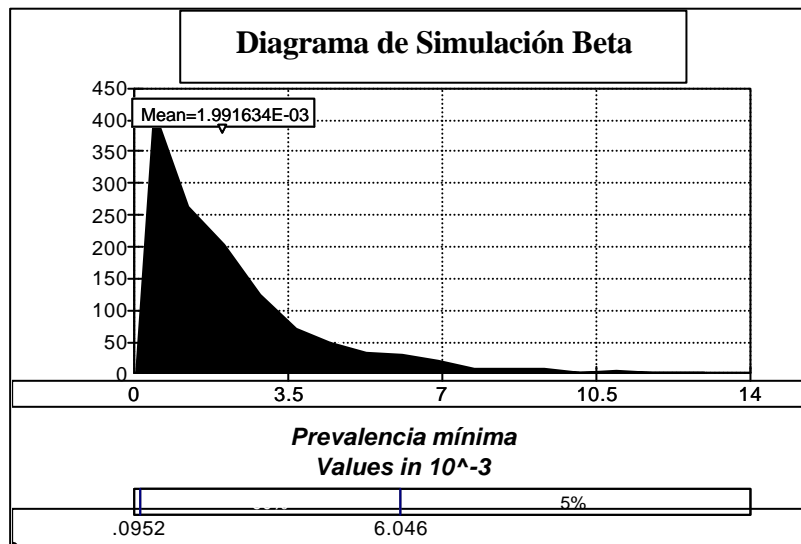
APÉNDICE

Apéndice 1. Población Pecuaria de vacunos y número de unidades agropecuarias, según distritos. Provincia: Canta-Lima. 1994

DISTRITOS	VACUNO	
	U. Agropecuaria	Cabezas
Agenc. Agrar. CANTA	1159	11379
Canta	312	2630
Huamantanga	312	3271
Huaros	218	2256
Lachaqui	223	2100
San Buenaventura	94	1122
Sede ARAHUAY	188	1889
Arahuay	97	986
Santa Rosa de Quives	91	903
TOTAL	1347	13268

Fuente: CENAGRO, 1994

Apéndice 2. Diagrama de Simulación Beta, intervalos de confianza



Apéndice 3. Ubicación geográfica de la Provincia de Canta. Departamento Lima

