

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA SEROLÓGICA DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN DISTINTAS ZONAS DE LA REPÚBLICA ARGENTINA

Dr. MV Fernando Navarro. FAV UNRC. Tesis. 1995.
www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Enfermedades de la reproducción](#)

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del Género *Brucella*. Es una bacteria Gram negativa. Hay seis especies.

La importancia de esta enfermedad es que causa pérdidas directas e indirectas a nivel productor, pérdidas de proteínas de origen animal para la alimentación humana. Es una zoonosis importante.

Los principales órganos afectados son los reproductivos; la contaminación del medio ambiente es por medio de la placenta, líquidos fetales y fetos.

Fue diagnosticada por primera vez en 1892 en la República Argentina. Se han dispuesto distintas medidas y planes para controlar esta enfermedad, hasta el momento ninguna ha sido efectiva. No hay datos de prevalencia actualizados, a nivel general, ni provincial, ni municipal.

En este trabajo se planteó la hipótesis de que el 10 % de los bovinos del país estaban infectados y el 30 % de los establecimientos tenían uno o más animales infectados.

Se procedió a realizar un muestreo sanguíneo estadísticamente confiable en el Partido de Tandil (Pcia. de Buenos Aires), Jovita - Serrano y Coronel Moldes (Pcia. de Córdoba).

Todas las muestras de sangre fueron analizadas por las pruebas de: BPA (Antígeno Bufferado de Placa); RB (Rosa de Bengala); SAT (Sero Aglutinación en Tubo o Wright); 2-ME (2 Mercaptoetanol); RV (Rivanol); FC (Fijación de Complemento); y se determinó la prevalencia de reactores en cada una de ellas.

En el Partido de Tandil se analizaron 2771 animales, provenientes de 91 establecimientos, cuya estratificación productiva era: 25 de tambo; 20 de cría; 32 mixtos; 14 sin identificar la producción.

Se encontraron establecimientos con animales reactores: 75 (82,41%) en BPA; 39 (42,85%) en SAT con título $\geq 1/50$ y 44 (48,35%) en RB; en 2-ME y RV 32 (35,16%); 24 (26,37%) en FC.

Los animales reactores fueron 451 (16,27%) en BPA; 148 (5,34%) en RB; 301 (10,87%) en SAT, con título \geq ; 115 (4,18%) en 2-ME; 110 (3,96%) en RV; 84 (3,03%) en FC.

De acuerdo a la Resolución 1269/93, que considera como prueba definitiva a la de 2-ME, la prevalencia brucélica global por establecimiento fue 35,16% y por actividad productiva: 30% en cría; 40% en tambo; 37,50% mixta y 28,57% sin identificar. La prevalencia individual fue 4,18% y por actividades productivas: 4,17% en cría; 4,34% en tambo; 4,32% en mixtos y 3,50% sin identificar.

En Jovita - Serrano (Pcia. de Córdoba) se estudiaron 981 animales, pertenecientes a 28 tambos. Fueron reactores a las distintas técnicas serológicas: 152 (15,96%) a BPA; 83 (8,60%) a RB; 89 (9,14%) a Wright con títulos $\geq 1/50$; a RV 86 (8,88%); a 2-ME 87 (8,89%) y a FC 78 (7,98%).

En cuanto a los tambos con animales reactores, se hallaron: 22 (78,57%) a BPA; 16 (57,14%) en SAT y 14 (50%) para RB, RV, 2-ME y FC.

Según la Resolución del año 93 la prevalencia de la brucelosis bovina es del 8,89% y del 50% en forma individual y por establecimientos.

En Coronel Moldes (Pcia. de Córdoba) se analizaron 2545 animales, que pertenecían a 37 establecimientos; reaccionando a las distintas técnicas serológicas: 212 (8,13%) animales a BPA; a RB 119 (4,70%); a SAT 335 (13,16%); a RV 91 (3,58%); a 2ME 91 (3,58%) y a FC 87 (3,56%).

Los tambos con animales reactores a las distintas pruebas fueron: 30 (81,08%) a BPA; a RB 22 (59,46%); a SAT 30 (81,08%); a RV y a 2ME 17 (45,95%) y a FC 17 (45,95%).

Por Resolución 1269/93; la prevalencia de la brucelosis bovina es del 3,58% en forma individual y a nivel de establecimientos 45,95%.

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del Género *Brucella* que comprende a seis especies, que se diferencian en cuanto a su huésped principal.

Las bacterias pertenecientes a este Género son coco bacilos, Gram negativos, sin cápsulas y sin flagelos; son aeróbicas e inmóviles; su metabolismo es respiratorio y tienen un sistema citocromo basado en el transporte

de electrones con oxígeno o nitrógeno como aceptor terminal. Producen nitrato reductasa. Son parásitos intracelulares (1).

Esta enfermedad está difundida casi mundialmente, jugando los animales los roles fundamentales para su continuidad en la naturaleza. El ser humano es un huésped trampa.

La Organización Mundial de la Salud ha declarado a esta enfermedad, en el manual de Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades, dentro del grupo de enfermedades zoonóticas bacterianas, bajo la categoría 023 (2)(135).

En los animales los órganos principalmente afectados son los relacionados con la reproducción y el aborto es el principal síntoma.

Las diferentes especies de brucelas se denominan:

NOMBRE	HUÉSPED PRINCIPAL	OTROS HUÉSPEDES
melitensis	ovinos-caprinos hombre	varios animales,
abortus	bovino hombre	varios animales
suis biovar 1,2,3.	cerdo hombre, excepto la 2.	varios animales
suis biovar 4	reno hombre	varios animales
suis biovar 5	múridos hombre	varios animales
neotomae	ratas	
ovis	carnero	desconocido
canis	caninos	hombre

Pese a ser una enfermedad que afecta principalmente a los animales, fue reconocida por los problemas que presentaba en los seres humanos. David Bruce del Servicio Médico del Ejército Inglés, fue destinado a la Isla de Malta, donde una misteriosa enfermedad, llamada Fiebre de Malta atacaba a los soldados ingleses de esa guarnición(3). En 1.887 logró aislar del bazo de cuatro pacientes humanos un microorganismo que él llamó *Micrococcus melitensis*(4). Este fue el primer hallazgo de la *Brucella* spp.

En 1892 Bernier describe la enfermedad en el República Argentina (5)(137).

A este padecimiento se lo reconoce con diferentes nombres: Fiebre Ondulante, Fiebre de Malta, Aborto Epizootico Bovino, Fiebre del Mediterráneo (en humanos), Melitococcia, Aborto Contagioso, Aborto Infeccioso, Enfermedad de Bang (159).

La gran importancia de esta enfermedad en los bovinos es que produce pérdidas económicas directas e indirectas y es un problema serio en Salud Pública, entre estas pérdidas directas la suma estimada asciende a \$ 40.853.790,00 (6).

La brucelosis bovina se presenta clínicamente como productora de abortos en la hembra bovina y en los machos bovinos puede producir orquitis(149)(150).

El aborto se produce en el último tercio de la gestación y una hembra que aborta difícilmente repita este cuadro. Esto sucede cuando la infección ocurre por primera vez. Con el aborto y las descargas vaginales se eliminan la mayor cantidad de brucelas al medio ambiente, siendo este momento, el más peligroso para el contagio de los demás animales del rodeo; dicho contagio se produce por el contacto del feto, líquidos y membranas fetales con animales susceptibles. El macho puede eliminar con el semen brucelas con capacidad infectante, estos machos enfermos no deben usarse; en inseminación artificial es peligrosísimo si este animal tiene semen infectado.

Hay diferentes métodos de diagnóstico para la brucelosis bovina, como por ejemplo:

- ◆ serológicos
- ◆ hipersensibilidad
- ◆ bacteriológico

En nuestro medio los más usados son los bacteriológicos (diagnóstico de certeza) y los serológicos (diagnósticos presuntivos).

Los métodos de control de esta enfermedad se basan en medidas de manejo, capacidad de detectar animales reactivos positivos y su segregación del rodeo.

No existen tratamientos eficaces para esta enfermedad en los bovinos.

Existen diferentes tipos de vacunas para prevenir la enfermedad en los animales: vacunas a cepas vivas atenuadas, y vacunas a cepas muertas. Se aplican por diferentes vías: subcutánea, oral, intramuscular.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Desde 1.887 en que se aisló por primera vez el agente causal de la enfermedad se ha investigado mucho en diferentes aspectos relacionados con esta dolencia.

2.1 Características de la Brucella abortus

La Brucella es una bacteria intracelular facultativa, Gram negativa que afecta particularmente a bovinos, ovinos, caprinos y al hombre (7)(151) . Esta bacteria se multiplica intracelularmente, preferentemente en las células del sistema retículo endotelial (SRE) y en la placenta (9) .

Esta bacteria mide 0,5 a 0,7 micras de ancho y 0,6 a 1,5 micras de longitud; no presenta cápsulas ni coloración bipolar y carecen de flagelos; son aeróbicas e inmóviles; su metabolismo es respiratorio y tienen un sistema citocromo basado en el transporte de electrones, con oxígeno o nitrógeno como aceptor terminal. Producen nitrato reductasa.

Especie biovar	Req. Prod CO SH2	Crec.en medio				Aglutin. con sueros monoespecíficos		
		Tionina	Fucsina			A	M	R
abortus	1	(+)	+	-	-	+	-	-
	2	(+)	+	-	-	+	-	-
	3	(+)	+	+	+	+	-	-
	4	(+)	+	-	+	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	(-)	+	+	+	-	-
	7	-	(+)	+	+	+	+	-
	8	-	+	+	+	-	+	-
	9	-	+	+	+	-	+	-

Patogenicidad para el hombre:

1 - 9 moderada

+: cepas positivas

(+): mayoría de las cepas positivas

-: todas las cepas son negativas

(-): la mayoría de las cepas son negativas

Lisis por Fago 2 1 DCD

Especie Tb Wb Fi Bk R Ro Iz Rc

B.abortus 1-7,9 - - - + - - + -

Oxidación de sustratos:

l-alanina + l-asparagina + d-ribosa +

l-arabinosa + d-galactosa + l-arginina -

d-glucosa + d-xilosa - m-eritritol +

dl-ornitina - l-lisina -

dl-citrulina - l-ac. glutámico +

Huésped natural preferido: bovino

d= los valores de Q(02)N pueden ser mayores o menores a 50 según las cepas (10) .

Desde 1.962 se sabe que las brucelas ven favorecida su crecimiento intracelular en los trofoblastos por la presencia del eritrol, 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 crecimiento de estas bacterias en los tejidos fetales (11) .

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 pH de 6,6 a 7,4, las destruye un pH menor a 3,5 (1) .

2.1.1 Supervivencia en el Medio Ambiente

Las brucelas son agentes infecciosos cuya supervivencia en condiciones naturales puede ser variable.

Esta condición se debe entre otros factores a:

* La temperatura afecta a la supervivencia, con el calor la sobrevida es menor; el congelamiento y descongelamiento reducen la sobrevida.

- * pH del medio
- * Nutrición
- * Acción de enzimas autolíticas
- * Luz solar: los rayos solares directos las destruyen en poco tiempo
- * Presencia de otros microorganismos.

La temperatura de pasteurización las elimina por completo.

No resisten a los desinfectantes comunes (1)(12) , así observamos que:

Carbonato de Sodio 1:10 las destruye en 30 minutos; fenol 2,5% en 15 m.; formaldehído 2% en 15 m.; permanganato de potasio 1:5000 en 10 m.; potasa cáustica 1:1000 en 15 m.(21)

2.1.2 Estructura Antigénica

En 1.984 se descubrió la estructura de la cadena O de lipopolisacáridos lisos (LPS) de *Brucella abortus* que se forma por la repetición de unidades de monosacáridos, 4 amino-4,6-dideoxy-D-manosa o más comúnmente referida como perosamina (8)(13) .

La mayoría de los antígenos brucelares son comunes a todas las cepas. Una excepción a esto son los lipopolisacáridos (LPS) somáticos que difieren entre las cepas lisas y rugosas, y en las proteínas de la membrana externa que muestran algunas diferencias entre los grupos de especies.

La mayoría de los test serológicos miden la respuesta de anticuerpos a los antígenos LPS O que naturalmente ocurren en cepas de campo de la *Brucella abortus* (15).

La diferencia en las características de las cadenas de lipopolisacáridos entre las cepas lisas y rugosas (S-LPS y R-LPS) ahora permite examinar la respuesta inmune de los antígenos purificados con esos LPS (16) .

En las cepas lisas de las brucelas hay 2 determinantes antigénicos A y M, estos antígenos están asociados a la cadena de polisacáridos O del S-LPS. La estructura de ambos antígenos es muy similar: homopolímero lineal de uniones 1,2 a unidades de 4,6 dioxi -4- formamido- alfa -D- manopiranosil terminadas por un componente oligosacárido. La diferencia es que el antígeno M tiene una composición semejante pero con la unión 1-3 por cada cuatro uniones 1-2 (1) . La diferenciación entre la *B. abortus* y *B. melitensis* está en la distribución de los antígenos específicos A y M. La *B. suis* tiene un porcentaje intermedio de estos antígenos A; en la *B. abortus* hay un mayor porcentaje de A, en la *B. melitensis* el predominio es del M, pero en todas están los dos antígenos.

En las brucelas hay una endotoxina que se compone de proteínas, lípidos y polisacáridos.

La pared celular es más inmunógena que la bacteria aislada; esta contiene varios hidratos de carbono y solo trozos de proteína y ácido RNA (14)(16) . En este componente celular se encuentran las siguientes sustancias activas:

- Aglutinógenos P., M. y A.
- Receptores para bacteriófagos.
- Hemoaglutinógenos.
- Endotoxinas (proteínas, lípidos y polisacáridos).
- Lipolisacáridos.
- Alérgenos.
- Sustancias protectoras.

Existen reacciones cruzadas entre las especies de *Brucellas* y otros géneros; estas reacciones incluyen: *Pasteurella* sp., *Proteus vulgaris*, *Pfeifferella mallei*, varios serotipos de *Salmonella*, incluyendo *S. urbana* y *pollorum*, *Franciesella* (*Pasteurella*) *tularensis*, serotipos de *Leptospira*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Campylobacter* (*Vibrio*) *cholerae* y *Yersinia enterocolítica* (14)

2.2 RESEÑA HISTÓRICA

La primera descripción de la enfermedad corresponde, aparentemente, a Hipócrates, que la describe en un paria residente en Thasos, quien muere de la enfermedad después de 120 días.

1.814: Burnett parece entrever la infección melitocócica, pero la confunde con las demás pirexias.

1.863: Marston es el primer médico que identifica la Fiebre de Malta como una enfermedad propia y la llama "Mediterranean Remitent or Gastric Remitent Fever" y describe su sintomatología.

1.887: Bruce aisló por primera vez el Género *Brucella*, descubriendo al agente etiopatogénico. Dicho hallazgo lo hizo en la isla de Malta, donde la enfermedad produjo numerosos enfermos y muertos entre los soldados de la guarnición inglesa. Llamó a los gérmenes "*Micrococcus melitensis*"(3) .

1.892: Hughes aísla al *Streptococcus melitensis* y llama a la enfermedad "Fiebre Ondulante."

1.897: Wright y Semple descubren la existencia de aglutininas específicas en el suero de los enfermos, facilitando el diagnóstico, en su honor se lo llama método de Wright.

Bang y Stribolt aislaron un microorganismo en fetos y membranas fetales de bovinos abortados, el cual era el productor del "Aborto Epizoótico o Contagioso del Ganado Bovino", al que denominaron *Bacillus abortus*, pero en honor a su descubridor se llamó "*Bacillus de Bang*" y a la enfermedad: "Enfermedad de Bang". Este

descubrimiento fue confirmado en Hungría en 1903 por Mc Fadyean. En Inglaterra en 1.909 por Stockman y en 1.910 por Mc Neal y Kerr.

1.904: El gobierno inglés establece en dicha isla una comisión compuesta por Bruce y varios médicos militares más, con el objeto de estudiar la enfermedad, epidemiología y las medidas preventivas que sean efectivas.

Las investigaciones en la Isla de Malta progresan: Zammit, Shaw, y Gilmour aíslan de sangre periférica de los enfermos el *Micrococcus melitensis*, Hodrroks y Basset comprueban que en un 10% de los casos, los enfermos eliminan gérmenes por orina.

1.905: Zammit descubre a las cabras y en cultivos de leche reconoce a las bacterias, a la que considera fuente de infección para las personas. También descubre las aglutininas en el suero de la leche, la prueba se denominó lactosuero-aglutinación de Zammit.

1.906: Bang realiza experiencias sobre inmunización artificial con cultivos vivos.

1.911: Schoroeder, Cotton, y Smith, Fabyan; en forma paralela descubren que la ubre bovina era un reservorio de *Bacillus abortus*, inoculan con leche sospechosa de ser tuberculosa a cobayos y observan que el bazo e hígado se presentan lesiones miliare y nodulares semejantes a las de tuberculosis pero de donde se aíslan los bacilos de Bang. Descubren al cobayo como animal susceptible y que facilita la investigación.

1.914: Traum aísla la tercera especie del género de fetos porcinos abortados, que por su semejanza con la especie anterior se la llamó *Bacillus abortus var suis*. Posteriormente, Hutyra comunica que en 1.909 había aislado dicho germen.

1.916: Cooledge sospecha la característica de infecciosidad del bacilo de Bang para el hombre y demuestra la presencia de aglutininas específicas en la leche, señalando que ellas indican la existencia de ubres enfermas.

1.918: Evans comprueba que el *Micrococcus melitensis* y el *Bacillus abortus* Bang, presentan muy pocas diferencias morfológicas, se acentúa la similitud con las pruebas inmunológicas y sugiere que ambas se denominen genéricamente: *Bacterium*.

1.920: Feusier y Meyer; Meyer y Shaw, por el hallazgo de Evans realizaron estudios sobre varias cepas y confirman ampliamente lo expresado por Evans y proponen que estas 2 especies estén bajo el nombre de "Género *Brucella*" en honor a su descubridor Sir David Bruce.

En ese mismo año Zwick en Alemania, realiza la inmunización con cultivos vivos y muertos.

1.922: Nicolle ensaya la posibilidad de inmunizar preventivamente al hombre.

Burnett inocula extractos de cultivos de *Micrococcus melitensis* intradérmicamente, obteniendo un nuevo y excelente método de diagnóstico.

1.925: Se descubre una cepa atenuada de *Brucella abortus* que se la denomina, para diferenciarla cepa 19, altamente eficaz para la inmunización de los bovinos.

1.929: Mediante su estudio con el género *Brucella*, permitió por métodos de laboratorios, considerar al germen aislado por Traum como una especie más del género citado, llamado desde entonces *Brucella suis* y estableció simultáneamente la diferenciación de ésta última con las otras 2 especies.

1.932: Huddleson y Abell crean el método de investigación rápido de aglutininas, facilitando el reconocimiento de reactores y desarrollo de planes profilácticos: la reacción se denominó: Reacción de Huddleson(137) .

2.3 DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Esta enfermedad fue descrita en Europa por primera vez, y se desconoce a ciencia cierta como fue que se introdujo en el Hemisferio Americano.

Según Huddleson, puede haber sido la causa de un brote epidémico de abortos espontáneos en Mississipi y Louisiana en 1.864. En 1.876 demostró la naturaleza contagiosa del aborto en vacas.

En Venezuela se diagnostica en 1.898.

En Perú se describe la enfermedad en humanos, como "una fiebre de curso largo, irregular con baja mortalidad" entre los años 1.907 - 1.908.

Otros estudiosos consideran que la enfermedad pudo introducirse al continente con los animales que trajeron consigo los conquistadores que provenían de España y de otros países del Continente Europeo (17) .

2.3.1 Situación Mundial

Esta enfermedad es de distribución mundial, encontrándose varios países que están libres o en vías de estarlo(1)(149)(150) . En África los únicos territorios libres de brucelosis bovina son: Madagascar, las islas Comores y las Seychelles, la isla Mauricio y el Sahara español.

En Asia y Oceanía hay poca información sobre la prevalencia de la enfermedad, aunque se sabe que existe.

Los siguientes países se han declarado libres: Bahrain, Isla Timor, Japón, Jordania, Kampuchea, Nueva Guinea, Paquistán, Singapur y Vietnam.

En Europa la mayoría de los países, desde 1.940 están libres de esta enfermedad y los que permanecen infectados lo están con prevalencias muy bajas. La zona de mayor infección es el Mediterráneo por la brucelosis caprina.

2.3.2 Situación en América

Los territorios libres son los insulares como Dominica, Malvinas, Santa Lucía, San Vicente, Trinidad y Tobago, Grenada, Bermudas, Islas Vírgenes, Martinica, Guadalupe, Montserrat, Anguila y San Martín. Canadá, Uruguay y la mayor parte de EE.UU. también están libres de brucelosis (1)(17) . La situación de los rebaños lecheros del distrito Federal de México se describe en el trabajo de Luna Martínez et al (136)

Según Acha y col.(159) es una de las enfermedades más importantes de América Latina, las pérdidas estimadas alcanzarían los 600 millones de dólares por año.

2.3.3. Situación en la República Argentina.

En Argentina, Bernier describe la enfermedad por primera vez en el año 1.892 en Buenos Aires, Villafañe en 1.913 y Rosenbusch en 1.917.

La situación actual es de desconocimiento de la cifra exacta de prevalencia a nivel país, solo hay datos parciales o estimaciones entre los que se pueden citar (17) :

Prevalencia estimada para 1.985:

* bovinos prevalencia mayor al 10%

* caprinos prevalencia mayor al 5%

* cerdos prevalencia mayor al 5%

Los datos oficiales que el SENASA cuenta son los siguientes (6)(128):

2.3.3.1 Provincia de Buenos Aires:

Para la Cuenca Lechera próxima a la Capital Federal en 1.978 se estimaba una prevalencia del 10%.

En 1.981 sobre 14.743 bovinos de 191 tambos en 19 partidos de Buenos Aires, se detectó el 4,8% de animales reaccionantes.

Un trabajo cita para el año 1.984 en rodeos lecheros una prevalencia de 6,7%.

El Ministerio de Asuntos Agrarios de esta provincia, en el año 1.987 encuentra el 42% de 6535 tambos investigados, sospechosos a la Prueba de Anillo en Leche. En 1.988 este mismo Ministerio efectuó 2 pruebas de Anillo en Leche en 54 tambos con 2.754 animales del partido de Adolfo Alsina, resultando 27 sospechosos a una o ambas pruebas.

La GELSA en una usina láctea, sobre 66 tambos detecta en el 27,3% reacción positiva a la PAL.

Las autoridades sanitarias de la provincia realizan un monitoreo constante de las cuencas lecheras, en el área llamada Mar y Sierras los porcentajes de tambos sospechosos se encuentran en el 30%.

En 1.990 en el partido de Navarro se detectaron el 3,4% de bovinos reactivos a las pruebas serológicas.

Un trabajo realizado por el CEDIVE(156) detectó el 76,56% de prevalencia y piensan que esta puede ser mayor en lugares donde no existe el asesoramiento veterinario. En este estudio se analizaron 39 tambos; el 35% de los mismos tenía 0% de reactivos, el 43% tenía entre 1 y 4%; el 18% entre 4 y 10% y el 3% más de 10%.

Para rodeos de cría los datos obtenidos son los siguientes: San Miguel del Monte, en el año 1.984 se determinó la prevalencia del 7.2%.

En el partido de Ayacucho en el año 1.989 sobre 732 muestras se detectó el 3,9% de prevalencia, y en el año 1.992 en el partido de Patagones el 3.4% de reaccionantes.

En el año 1.993 se efectuó el diagnóstico serológico sobre las muestras de VIA ampliadas para Brucelosis de diez partidos de la Cuenca Deprimida del Salado, ubicándose en el promedio de la tasa de reaccionantes en un 6%. El mismo año en 5 partidos del sur de la provincia se determina el 2,57% de reaccionantes positivos en los sueros de las muestras para VIA.

2.3.3.2 Provincia de Córdoba

No hay datos de prevalencia serológicas en tambos, solo se conocen establecimientos sospechosos por la Prueba de Anillo en Leche.

Departamento	Nº de Rodeos	% de sospechosos
San Justo	3.508	11,12%
Río Primero	1.098	10,74%
Río Segundo	768	13,67%
Gral. San Martín	1.482	19,87%

En el departamento San Justo se hace un nuevo estudio sobre 2.908 tambos, resultando 2.589 negativos, mientras que 319 fueron reaccionantes, el porcentaje de tambos es de 10,90. Los títulos de la reacción son (18) :

++++	81 establecimientos	25,4%
+++	112 establecimientos	35,1%
++	91 establecimientos	28,53%
+	35 establecimientos	10,97%

2.3.3.3 Provincia de Santa Fe

Se analizaron por la prueba de Anillo en Leche, en 1.985, en un trabajo en el cual participaron el Ministerio de Agricultura y Ganadería, SENASA y empresas lácteas, se obtuvo como resultado que el porcentaje de tambos sospechosos no era mayor al 20%.

En 1.989 sobre 1.413 tambos el porcentaje de establecimientos que reaccionaban positivamente era del 4,5% y en algunas usinas receptoras solo el 1,7%.

En 1.990 el Ministerio y SENASA siguen trabajando juntos en tambos, con los resultados que siguen:

Mes-Año	Nº de Tambos	% de Reaccionantes
Abril 1.990	1.286	8,0%
Diciembre 1.990	906	12,9%
Abril 1.991	340	3,1%
Agosto 1.991	295	4,7%

Otra empresa estudia 1.036 rodeos y surgen como sospechosos el 9,75%.

En 1.992 se hace un estudio sobre 825 establecimientos que remiten a 12 plantas receptoras de leche, detectándose el 8% de rodeos sospechosos, en 4 plantas los tambos remitentes son negativos, cosa que se repite al año siguiente.

El panorama para los rodeos de cría en pruebas con Rosa de Bengala sobre las muestras VIA de 14 departamentos de la provincia, determinó una tasa de reaccionantes positivos del 8,71%.

2.3.3.4 Provincia de Entre Ríos

Para tambos, en 1.983 se analizan 469 establecimientos distribuidos de la siguiente manera:

Departamento	Nº de Rodeos	% de Sospechosos
Paraná	272	17,2%
Nogoyá	86	15,4%
Diamante	111	19,0%

En 1.990 en el Dpto. de Paraná se analizan 233 tambos, resultando sospechosos el 12%.

2.3.3.5 Provincia de Jujuy

Sobre 19 tambos que componen la cuenca lechera de esta provincia, en el año 1.983, el 6,5% de los animales son reaccionantes.

2.3.3.6 Provincia de Catamarca

Se realiza en 1.983 un estudio serológico de los animales de 86 tambos, resultando el 2,9% positivos y no encontrándose reaccionantes en el 59% de los rodeos.

En 1.992 se realiza una extracción de sangre en 40 establecimientos del Valle Central de Catamarca, sobre un total de 1.642 bovinos, resultan positivos el 1,27%.

2.3.3.7 Provincia de Río Negro

Para los rodeos de cría, los datos de la Región Patagónica en el Dpto. de Pichi Mahuida, en 1.981, la serología da por resultado un 2,4% de positivos y el 3,8% de sospechosos.

2.3.3.8 Provincia de Chubut

Datos parecidos arrojan encuestas efectuadas en Cushamen y Futaleufú, en los Dptos. Tehuelches y Río Senguerr. Los resultados fueron 0,4% y 1,97% respectivamente.

2.3.3.9 Provincia de La Pampa

En un estudio hecho por Fort y colaboradores, para determinar la prevalencia serológica de brucelosis en los Departamentos de Toay y Capital, en el primer Departamento la actividad es la cría con tendencia a la re cría, mientras que en el segundo se efectúa el ciclo completo y la existencia es de treinta tambos. El muestreo fue no aleatorio y la prevalencia esperada fue de un 50% \pm 5% y el nivel de confianza fue del 95%. De acuerdo a esto se

estudiaron 383 animales en Toay y 382 para Capital, todos los animales muestreados tenían mas de 2 años. Las técnicas utilizadas fueron BPA, SAT y 2ME. BPA fue utilizada como tamiz y el 20% de los animales analizados en Toay fueron reactores mientras que el 10,8% lo fueron en Capital. Para 2ME se consideraron títulos positivo aquellos iguales o superiores a 1/25 y el 10,4% de los animales de Toay y el 3,5% de los de Capital (152) .

En otro estudio Fort(153) analiza 28 tambos del Departamento de Santa Rosa con un total de 1347 animales y 48 animales de promedio por tambo. El análisis lo efectuó en leche no encontrando ningún tambo positivo.

2.3.3.10 Provincia de Tucumán

Spath y col. (19) hacen un estudio en los años 1.977 y 1.978 realizando el diagnóstico por Fijación de Complemento. Trabajan con 3 estratos de tambos, divididos según la cantidad de animales:

E1: hasta 40 animales mayores a un año.

E2: 41 a 80 animales mayores a un año.

E3: más de 80 animales mayores a un año.

Obteniendo los siguientes resultados:

	ESTRATOS		
	E1	E2	E3
Est. c/Anim. react. a Br.	30/108	34/57	32/38
Porcentaje	(27,8)	(59,6)	(84,2)
Animales react. a Br.	57/1571	140/1817	311/2731
Porcentaje	(3,6)	(7,7)	(11,4)

2.3.3.11 Provincia de Chaco

Bakos (20), basado en las memorias anuales del Lab. Reg. de Resistencia (Chaco) en 1.988 se diagnosticó según el sexo:

Reacción de Huddleson

Del total de animales el 44,55% fueron hembras con 8.70% de estas con títulos mayores a 1/50.

El 55,44% fueron machos y tuvieron títulos mayores a 1/25 el 3,97%.

Rosa de Bengala

El 58,44% de los análisis fueron hechos a hembras con 12,33% de reaccionantes.

El 41,44% restante fueron hechos a machos con el 72% de reaccionantes.

2.4 FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA ENFERMEDAD.

En toda enfermedad existe una relación, llamada triada ecológica en la cual están representados el Agente, el Huésped y el Medio Ambiente.

AGENTE

MEDIO AMBIENTE

HUÉSPED

Hay características propias de cada factor y las relaciones mencionadas Huésped-Ambiente, Agente-Huésped, Agente-Ambiente.

2.4.1. Características propias del agente.

La brucelosis bovina es ocasionada por la *Brucella abortus* biotipos 1,2,3,4,5,6,7,9. En nuestro país se han diagnosticado los biotipos 1,2,4,6. Los bovinos se pueden infectar, también, con la *B. melitensis* y la *B. suis*. La *B. abortus* puede infectar a otros animales y al hombre.

No hay diferencias de patogenicidad ni en la antigenicidad entre los diferentes biotipos de diferentes cepas. Ocasionalmente pueden existir múltiples biotipos en un mismo predio. En los bovinos la infección natural con otras especies de brucelas son raras (12) .

En los bovinos, las brucelas, tienen predilección por el útero grávido, cuya principal consecuencia será el aborto y se debería a la producción de eritritol que éstas usan como fuente de hidratos de carbono, producido por los tejidos fetales (11)(12)(21)(23)(151) También se la halla en la ubre, higromas de articulaciones del tarso, carpo y en los testículos, epidídimos y glándulas accesorias de los toros(12)(13)(149)(150) .

2.4.2 Contaminación del medio ambiente

Las vías de eliminación de las brucelas por parte de los bovinos son la vagina (abortos y descargas vaginales), ubre y órganos genitales del toro(1)(11)(12)(13)(22)(149)(150) .

2.4.3 Transmisión

Existen 2 tipos de transmisiones para la brucelosis en un rodeo: horizontal y vertical. La primera se produce al contaminar el medio ambiente, pueden adquirir la enfermedad todos los animales susceptibles en forma directa (1)(12)(23)(57)(150) . La forma indirecta, por medio de vectores mecánicos, en los cuales la sobrevivencia de las brucelas es muy corta, se ha demostrado, entre ellos pueden citarse: moscas, mosquitos, garrapatas (25)(26)(149)(150) .

Por medio de aerosoles se ha descrito, para los seres humanos, como por ejemplo; para los operarios de laboratorio que trabajan con brucelas vivas, Médicos Veterinarios, en frigoríficos. Las edades de 20 a 59 años son los que mayormente la adquieren y son los hombres más afectados que las mujeres (27)(28) .

Los animales silvestre que pueden infectarse con brucelas son numerosos (1)(12)(166)

Una vaca con infección en la glándula mamaria puede persistir de por vida con esa infección y eliminar microorganismos con cada lactancia (45) . La eliminación puede ser intermitente(150) .

La forma vertical se da en la infección congénita(30) (31)(32)(33)(150) .

2.4.4 Huésped

Como se ha mencionado *Brucella abortus* tiene marcada afinidad por el útero grávido, a medida que avanza el estado de preñez, aumenta la producción de eritritol, lo que favorece el crecimiento de estas bacterias en dichos tejidos, cuya consecuencia será el aborto. La placentitis y retención de placenta están comúnmente asociadas con esta infección (11)(57)(149)(150) .

Los animales prepúberes pueden estar en contacto con las brucelas, pero son eliminadas por los ganglios que drenan la orofaringe entre los 30 y 60 días posteriores al contacto y la susceptibilidad es mayor cuanto más (12)(21)(35) .

Un punto para tener muy se acerca la madurez sexual y la preñez en cuenta es la presencia de animales con infección "latente", es decir animales cuyas madres son animales infectadas, que serológicamente son negativos pero que están infectados terminando su preñez en un aborto, con la contaminación del establecimiento (29)(30)(31)(32)(33)(95) .

En cuanto a razas, la susceptibilidad sería mayor en aquellas más precoces.

Hay sustancias químicas que pueden alterar la respuesta inmunológica ante el contacto del animal con las brucelas como por ejemplo tratamientos médicos, desparasitaciones, etc.(34) .

Existe mucha discusión si los machos son igualmente susceptibles que las hembras para adquirir la infección; Nicoletti (12) basado en datos de reactores halló que los toros son posiblemente más resistentes que las vaquillonas y vacas sexualmente maduras, pero menos que los terneros inmaduros sexualmente.

2.4.5 Medio Ambiente

Las condiciones de clima y topografía tienen influencia sobre la supervivencia de la bacteria y sobre las condiciones de pastoreo de los animales. En zonas áridas las condiciones climáticas (temperaturas extremas y poca humedad ambiental), con una densidad animal muy baja, hacen que la bacteria no tenga posibilidades de sobrevivencia en el medio ambiente.

En rodeos grandes, la posibilidad de que la enfermedad aparezca es mayor y los costos de control y erradicación también lo son, esto es por que a mayor número de animales se acompaña una mayor densidad de animales (12) .

Cuadro 1: Supervivencia de *Brucella abortus* en el medio ambiente.

Material	Supervivencia
Agua(lagunas, lagos) a 37°C y pH 7,5	<1 día
Agua(lagunas, lagos) a 8°C y pH 6,5	>57 días
Desechos animales en tanques	7 semanas
Desechos animales en tanques a 12°C	>8 meses
Fluidos secreciones en verano	10-30 min.
Lanas en depósitos	110 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Helado a 0°C	1 mes
Manteca a 8°C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Paja manchada con excremento de vaca	31 días
Grasa de ordeño	9 días

Piel cubierta de pelos	3 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días
Tierra desecada a temperatura baja	27 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Capa de cal manchada con excrementos de vaca	16 días
Heces bovinas naturales	1-100 días

Adaptado:García-Carrillo et al. (1)

2.5 PATOGENIA

El aborto y descargas vaginales son la principal fuente de contaminación del medio ambiente y al contaminarse el medio las brucelas pueden ingresar al organismo animal por distintas vías:

Conjuntivas: las mucosas son la principal puerta de entrada.

Respiratoria: esta vía es también importante.

Digestiva: sería en la orofaringe donde el Huésped se pone en contacto con el mayor número de agentes.

Genital: en vagina, por el pH, sería poco probable la sobrevivencia de la bacteria, y por lo tanto el contagio. Cuando se usan toros infectados en Inseminación Artificial al depositar el semen con brucelas directamente en el útero (pH favorable) el contagio es probable.

Piel: la piel lesionada es permeable a la invasión de esta bacteria.

Congénita y latente: Una hembra infecta al feto. El porcentaje de casos es bajo (29)(30)(31)(32)(33)(150) .

Transplante embrionario: Este método no sería una fuente de ingreso del microorganismo, por los cuidados con que se manejan los embriones.

Al penetrar las brucelas al organismo animal, son transportadas solas o con células fagocitarias, a los linfonódulos regionales. Hay una inicial replicación de *Brucella abortus* en los de la orofaringe, seguido por una bacteriemia y una rápida multiplicación en los tejidos fetales.

Después del aborto, más del 80% de las vacas infectadas pasan a ser enfermas de cuadro crónico, localizándose las bacterias en la glándula mamaria y ganglios linfáticos supramamarios. La infección de esta glándula es de por vida en la vaca enferma (45). Otros tejidos y órganos donde se pueden hallar bacterias son: bazo, linfonódulos ilíacos, mesentéricos y supramamarios. En estos sitios se produce una hiperplasia con la formación de un granuloma. Estos cambios pueden tardar semanas en desarrollarse. La dispersión por vía linfática o sanguínea a otros órganos puede ocurrir, con predilección al útero, ubre y linfonódulos asociados.

La bacteriemia puede prolongarse meses o años y está relacionada con la susceptibilidad y/o resistencia. A mayor susceptibilidad, mayor es la persistencia de las brucelas en sangre (1)(13) .

En los toros el lugar de asentamiento son los testículos, epidídimo y glándulas anexas.

La placenta, líquidos fetales y fetos abortados son la mayor fuente de infección, tal es así que Alexander et al.(23) aisló:

del ombligo 2.4×10^8 a 4.3×10^9 bacterias/gramo.

fluidos fetales 9.5×10^{10} bacterias/ml.

cotiledones fetales 5.2×10^{11} a 1.4×10^{13} bacterias/gramo.

Estas cantidades de *Brucella abortus* aisladas de distintos tejidos y fluidos fetales nos dan una idea del peligro que es para el profesional veterinario la atención de partos de animales cuyos antecedentes desconocemos y todas las medidas de bioseguridad que hay que tener para estos casos.

El aborto se produce por varias causas, que actúan todas en conjunto:

- Colonización de las brucelas a la placenta (cotiledones y membrana corioalantoidea).

- Alteración del metabolismo de los fagosomas. Recordemos que las brucelas tiene mecanismos defensivos que impiden su destrucción por parte de la célula y las convierten en un parásito intracelular. Como ejemplo de esto se puede destacar la sobrevivencia de las brucelas dentro del retículo endoplásmico rugoso en los trofoblastos de las placentas de los rumiantes(11) .

El aborto se puede producir como resultado directo de infección de la placenta o como resultado indirecto de las endotoxinas brucélicas (37) .

2.5.1 Vías de eliminación

Las brucelas son eliminadas del cuerpo animal por las siguientes vías:

- abortos

- descargas vaginales

- glándula mamaria; a través de la leche. En esta glándula la supervivencia de esta bacteria se desarrolla en los macrófagos, la cual se puede explicar por la poca actividad de la mieloperoxidasa de estos macrófagos, lo que no permitiría la eliminación de las brucelas(149)(150) .

2.6 RESPUESTA INMUNE

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.

Recordemos que la *Brucella abortus* es un parásito intracelular facultativo en la línea celular de los macrófagos monocitos, es decir, que es un microorganismo capaz de multiplicarse dentro del huésped normal, el fagocito.

Describiré cada tipo de respuesta:

2.6.1 Respuesta de tipo celular

La Inmunidad Mediada por Células (IMC) es el mejor mecanismo de defensa, para estos microorganismos que son patógenos intracelulares de los linfocitos mononucleares como son: *Leishmanias* spp., *Toxoplasma gondii*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia psittaci*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium* spp. como así también *B. abortus*.

Este mecanismo de defensa se lleva a cabo como sugieren varias observaciones:

- *Brucella abortus* es un parásito intracelular facultativo,
- los macrófagos de animales inmunizados tienen una capacidad mayor para destruir al microorganismo,
- la transferencia pasiva de anticuerpos séricos no protege a los animales de laboratorio,
- los altos niveles o títulos de anticuerpos séricos se correlacionan positivamente con infecciones de tipo crónico más que con resistencia,
- los antisueros contra *Brucella abortus* favorecen la fagocitosis de este germen pero no aumentan la destrucción por medio de los neutrófilos.

Los resultados obtenidos con linfocitos específicos-*B. abortus* mediadores de respuesta inmune, como es inhibición de migración leucocitaria y transformación blástica linfocitaria, indica que la respuesta inmune mediada por células se correlaciona de una manera elevada con valores de infección como de protección (42).

Cuando las brucelas invaden a los tejidos, son fagocitadas por los polimorfonucleares y fagocitos mononucleares. Estas bacterias tienen al menos dos componentes que realizan esta función inhibitoria: un lipolisacárido y un material nucleotídico (41).

Una parte de las brucelas virulentas son destruidas y otra parte sobrevive, éstas se multiplican y se reinicia el ciclo.

Los linfocitos después de recibir un estímulo antigénico específico inician la producción de Interleuquina 2 (IL2) en un animal inmune es un correlato de la actividad de los linfocitos T helper y estos son los responsables de la memoria inmunológica y median la respuesta anamnésica. La inmunidad para este tipo de patógenos parece depender de linfocitos específicamente reactivos, cuyo encuentro con los antígenos específicos, se realiza por medio de sustancias que aumentan o facilitan que los macrófagos puedan destruir a los patógenos(43).

Eaglesome et al. (13) señalan que Winter (1990) 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 esta por las células T de la clase CD4 (L3T4) y CD8 (Lyt2).

Algo más dificultoso para demostrar en bovinos, indica que la Inmunidad Mediada por Células juega un rol importante en la protección contra la brucela. La IMC considera que envuelve al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (C.M.H.) con las moléculas de Clase II y la Interleuquina 1 (IL 1), que pueden participar en la presentación de los antígenos brucélicos a los linfocitos T bovinos.

Se ha postulado que la activación de los macrófagos tanto como la destrucción de los macrófagos infectados presentando antígenos brucelares en asociación con moléculas de la Clase II por Th1 (células inflamatorias T, CD4+) son responsables de la eliminación de las brucelas.

Además, 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 asociadas con antígenos brucelares.

La inmunidad celular juega un rol mayor en la defensa contra la infección del ganado vacuno a *B. abortus*. Inmediatamente después de esta el bovino con bacterias virulentas, se produce una considerable multiplicación y activación de los macrófagos, junto con la formación de anticuerpos por las células plasmáticas. El estímulo de la respuesta celular, puede ocurrir independientemente de la producción de anticuerpos humorales específicos(39).

Esta IMC, que es un mecanismo de defensa para los patógenos intracelulares facultativos puede ser usada como método de diagnóstico. La IMC puede ser usada como medida de la estimulación de linfocitos e hipersensibilidad retardada para animales que han sido expuestos a los antígenos (38).

Los linfocitos T helpers son responsables de la memoria inmunológica y de la respuesta anamnésica mediada, se considera a la IMC como importante en la evaluación de los regímenes de inmunización y en el uso de antígenos para vacunas.

Además la IMC brinda protección contra bacterias patógenas intracelulares mediante la activación de los fagocitos mononucleares los cuales son las células huésped para las brucelas (40).

2.6.1.1 Respuesta Celular en Fetos

Existe un moderado número de neutrófilos mezclados con una población predominantemente compuesta por leucocitos mononucleares(37) .

2.6.2 Respuesta Humoral

El organismo ante una agresión responde con la formación de inmunoglobulinas: proteínas formadas en los plasmocitos y en los linfocitos, que tienen actividad de anticuerpos.

Mediante campos eléctricos (diferente movilidad electroforética) se divide en 4 grupos: albúmina, globulinas alfa, beta y gamma; se usa como sinonimia anticuerpos.

Sin embargo, la actividad de anticuerpos se puede asociar con algunas otras globulinas, especialmente beta y algunos con movimientos intermedios entre beta y gamma.

Se identifican con los términos Ig A, Ig G e Ig M.

Se caracterizan por numerosas propiedades:

- * Peso Molecular
- * Constante de sedimentación
- * Movilidad electroforética
- * Contenido de carbohidratos
- * La presencia de actividad específica de anticuerpos
- * La habilidad para atravesar la barrera placentaria (en humanos)
- * Posesión de determinantes antigénicos comunes
- * Posesión de determinantes antigénicos clase específicos

2.6.3 Estructura de las Inmunoglobulinas

En el hombre las Igs G consisten en la unión de 4 subunidades unidas, 2 con un Peso Molecular de 50.000 a 55.000 (cadenas pesada o H o cadenas A) y 2 con un Peso Molecular de 20.000 (cadena liviana o L o cadenas B)(53).

2.6.3.1 Producción de Inmunoglobulinas

Cuando el estímulo antigénico es un virus, la respuesta del organismo es con anticuerpos. Pero en una primera fase estos anticuerpos no fijan complemento, tienen la característica de ser neutralizantes y de inhibir la hemoaglutinación. Los anticuerpos fijadores del complemento aparecen más tarde. En términos generales la respuesta frente a virus es en primer lugar Ig M, estos anticuerpos son neutralizantes e inhibidores de la Hemoaglutinación, pero no fijan el complemento. Más tarde aparecen las Ig G con propiedades neutralizantes, inhibidoras de la hemoaglutinación y fijadoras del complemento.

Cuanto más complejo es el estímulo para la producción de anticuerpos, como es una bacteria o un micoplasma, el patrón de producción de Ig. es semejante: Ig M seguido de Ig G; las Ig M no son capaces de fijar el complemento, pero los anticuerpos fijadores del complemento aparecen más tarde y es en el momento en que los anticuerpos neutralizantes y aglutinantes. En estos casos, se ha hallado que las Ig M fijadoras del complemento tienen menor habilidad que las Ig G para fijarlo(39) .

Los bovinos infectados con brucelas en fase lisa, en sangre aparecen inmunoglobulinas (Ig), anti-antígenos S-LPS, al hapteno natural (NH) y al polisacárido B (1)(15)(16) .

Lo primero en detectarse es Ig M, Ig G1 y G2 (1)(12)(16) (50).

A los 5 a 7 días post vacunación aparecen las Igs M, cuya concentración tiene un pico máximo a los 13-21 días post infección. A los 14-21 días de la vacunación aparecen las Igs G cuya concentración máxima se verifica a los 28-42 días post infección. Las Igs M aparecen primero para declinar primero y la respuesta duradera se debe a los anticuerpos de tipo Ig G. La Ig G1 hace pico a los 2 meses y disminuye hasta los 5 meses. La Ig G2 aumenta mucho menos, el pico lo hace a los 4 meses y persiste hasta los 10 meses. La Ig A tiene una respuesta que es mucho menor en duración y magnitud; la duración es de, aproximadamente 6 meses(21)(46)(47)(48) (50)(52).

Una de las particularidades de la Ig A bovina es su, relativamente, baja concentración en el calostro comparada con la gran cantidad de Ig G1(46) .

En los toros hay registrados casos de infección localizada en el Sistema Reproductivo con ausencia de anticuerpos séricos pero con anticuerpos en el plasma seminal(21) . En el semen de estos animales se detectan aglutininas. Se ha observado que en la brucelosis genital hay una respuesta humoral y paralelamente se observa la aparición de anticuerpos específicos en el semen y una marcada prevalencia del contenido de Ig G en los sitios de infección activa. La Ig G2 se mantiene constante(36) .

En la glándula mamaria hay una síntesis reducida de Ig G1, que se observa en pequeñas cantidades de Ig G1 madura en leche, pero no es la fuente total de Ig G1 del calostro, esta cantidad se obtiene por un transporte selectivo del suero al calostro (46) . Es posible que la Ig G1 provenga del suero y que la Ig M sea de origen local (47).

En bovinos serológicamente positivos, la mayor parte de los anticuerpos presentes son Ig G1, en cantidades mucho mayores que en bovinos vacunados. Se han hallado Ig G1 no aglutinante en el suero de animales infectados usando antiglobulinas. 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.

Una gran proporción de la Ig G1 presentes en el suero de los animales positivos son anticuerpos específicos contra Brucellas y una pequeña cantidad de Ig M fue detectada (47) .

CUADRO 2: Algunas características diferenciales de las Igs. (48)(134):

	Ig G	Ig M
Peso molecular	160.000	1.000.000
Constante de sedimentación	7S	19S
Movimiento electroforético	media gamma	rápida gamma
Estabilidad al calor	Resistente	Lábil
Mercaptoetanol	Resistente	Lábil
Rivanol (1%)	No precipita	Precipita
pH ácido	Resistente	Inhibida

La inmunidad humoral no tiene correlación directa con el grado de protección, la resistencia es de base celular (42)(49)

Aparentemente la síntesis de Ig G2 es un componente esencial de la respuesta de anticuerpos requerida para eliminar la infección de campo o con la cepa 19. En animales infectados los niveles de Ig G2 son mucho más bajos que los de Ig G1. Es interesante hacer notar que las Ig G2 son los únicos isotipos de anticuerpos que son efectivamente dependientes de la citotoxicidad celular(42)(49) .

La principal actividad aglutinante del suero de animales infectados está constituida por una fracción de globulinas con movilidad gamma. En suma, un nivel significativo de actividad aglutinante en bovinos no vacunados corresponde a las Ig G1. La mayor actividad aglutinante del suero en animales vacunados se halló en las Ig G2. La actividad de la Ig G1 fue inexistente (no detectable) en los sueros de ganado vacunado y fue detectable solamente con antígenos bufferados. La diferencia de la actividad aglutinante debido al Ig G1 y al Ig G2 puede, posiblemente, diferenciar entre animales vacunados e infectados. Se halló que el ganado infectado tenía un nivel de Ig G1 mayor que el vacunado (51) .

En algunas especies animales la cadena B es antigénicamente similar para todas las Inmunoglobulinas (un determinante antigénico común) y por ello, un determinado antisuero producido contra Ig G tiene reacción cruzada con las Ig A e Ig M.

La cadena A (pesada) lleva los determinantes antigénicos de clase y se ha propuesto que esta cadena de las Ig G se identifique como gamma, para las Ig A como alfa y para las M como mu.

Los ovinos, bovinos, caprinos, suinos, y equinos no transfieren anticuerpos por la placenta (agamaglobulinémicos), pero su sistema inmune responde después de los 200 días de gestación (37)(44)(52) .

Los anticuerpos se obtienen hasta 36 hs. post nacimiento por ingestión de calostro(52), salvo en los caprinos que pueden absorber anticuerpos calostrales hasta 4 días posteriores al nacimiento(170) .

Estos anticuerpos en terneros jóvenes ejercen un efecto supresor de la respuesta inmune ante un desafío, más que la inmadurez del Sistema Inmune del animal.

Fetos vacunados "in útero" producen anticuerpos contra Brucella abortus y animales recién nacidos pero privados de calostro son capaces de responder con anticuerpos contra la brucela más efectivamente que los animales que han ingerido calostro (44) .

La respuesta primaria en anticuerpos del bovino a los agentes infecciosos se caracteriza por una producción precoz de Ig M, seguida por un cambio a Ig G. La respuesta secundaria consiste, principalmente, en anticuerpos Ig G. La respuesta total es influenciada factores tales como el carácter del estímulo antigénico y el estado inmunológico del animal.

En los bovinos infectados naturalmente, producen Ig G1 (no aglutinante) y pequeñas cantidades de Ig M (39) .

La respuesta humoral como celular son de corta duración, sugiriendo que una infección permanente no se ha establecido. Esta sugerencia se basa por la incapacidad de aislar Brucella abortus en los animales (35) .

Se puede inferir que la actividad unida a la Ig G se localiza externamente sobre la superficie de la bacteria (53)

2.6.3.2 Efectos de Adyuvantes en la Producción de Inmunoglobulinas

La presencia de aceites minerales tiene un pronunciado efecto sobre el nivel y la duración en la producción de Ig G, los cuales son mayores(52)(54) .

2.7 PATOLOGÍA

En los equinos se asocia con una patología de las bolsas supraespinosas de la nuca, cruz y tejidos asociados; es una infección crónica. Se caracteriza por una acumulación de material seroso y purulento bajo el ligamento nucal. No es la única bacteria que puede causar este cuadro(56) .

En la hembra bovina produce lo siguiente: en el útero grávido endometritis y placentitis. Placenta engrosada en los espacios intercotiledonarios con la producción de un líquido gelatinoso y amarillento achocolatado. Sobre la superficie hay zonas de necrosis. Los cotiledones y las distintas membranas se presentan edematosos.

Lesiones microscópicas: gran proliferación de células mononucleares. Exudado inflamatorio que tiende a solidificarse con lo que se adhiere firmemente a la placenta fetal y a las vellosidades coriónicas, por lo cual se produce la retención de placenta (1)(10) . Hay una inflamación necróticas a nivel de las uniones carúncula cotiledones cuyo resultado final es el aborto(11)(21) .

Glándula mamaria: macroscópicamente normal.

Histológicamente: focos inflamatorios de una mastitis intersticial proliferativa, no purulenta (1) .

En los machos la brucelosis se presenta con orquitis uni o bilateral con focos necróticos, a veces puede ser granulomatosa con periorquitis fibrinosa. Con degeneración tubular media y fibrinosa. Agrandamiento del epidídimo por inflamación necrotizante y fibrinosa. Ampulitis intersticial crónica. También hay vesiculitis y lesiones articulares en carpo y tarso, como higromas y artritis purulenta (1)(13)(21) (36)(150).

En los fetos se han descrito reacciones inflamatorias diseminadas, hiperplasia adrenal cortical e hiperplasia de linfonódulos. Presentan una neumonía que se debería a una aspiración de líquido contaminado, pero la localización de la bacteria en el pulmón y el resultado de la inflamación, posiblemente se debería a una diseminación hematogena después de la invasión de los vasos de la placenta.

El feto tiene aspecto edematoso.

Hay abundante cantidad de brucelas en el contenido estomacal (1)(37) .

Cuando se realiza una necropsia de un feto sospechoso se deben buscar en el hígado lesiones granulomatosas. En el bazo hay variable grado de hipertrofia; los ganglios externos e internos presentan hipertrofia.

Para hacer aislamiento se utilizan el bazo, útero, testículos, vesículas seminales, glándula mamaria, y la mayoría de los ganglios linfático, preferencialmente los supramamarios, los submaxilares, los retrofaríngeos y los ilíacos.

2.8 SINTOMATOLOGÍA

Los signos clínicos dependerán del estado inmunitario del rebaño(150) .

No hay síntomas característicos que indiquen la presencia de la enfermedad. Realizando un buen estudio clínico (buena anamnesis del rodeo y del animal en particular) se puede sospechar de la enfermedad.

El aborto se produce en el último tercio de la gestación, y se lo considera como un síntoma, aunque no patognomónico, compatible con la enfermedad (11)(21)(25)(58) (59)(60)(61)(149)(150).

Otros síntomas son la metritis por la retención de placenta, lesiones genitales en útero, infertilidad; higromas y artritis (1)(13)(36)(149)(150). En el caso de existir infecciones mixtas puede haber metritis lo que trae como secuela una septicemia y la muerte del animal o un estado crónico seguido por la infertilidad(150) .

Fallas en la reproducción; disminución de la fertilidad(15)(62).

Nacimientos de terneros débiles, mortinatos(23)(61).

El cuadro subclínico fiebre recurrente esporádica y linfadenopatías (36).

El aborto generalmente ocurre en la primera preñez post infección (31) , hay casos de vacas que han abortado 2 o más veces(150) .

En los machos se producen orquitis uni o bilateral, epididimitis, ampulitis, higromas y artritis(36) . Estos animales pueden tener uno o los 2 escrotos con tumefacción aguda y dolorosa, los testículos están normales, si la tumefacción escrotal permanece por largo tiempo, se produce una necrosis testicular, dicha necrosis es por licuefacción. Los toros enfermos pueden ser estériles cuando la orquitis es aguda, pero pueden recuperar la fecundidad si solo un testículo es el afectado(150) .

2.9 DIAGNOSTICO

2.9.1 Diagnóstico de certeza:

Este se realiza con el aislamiento bacteriológico (1) ; aparte de flujo vaginal, sangre, leche, calostro o semen y fetos (1)(97) . En el animal adulto los mayores aislamientos se obtienen de los Ganglios Linfáticos: Retromamarios, Preescapulares, Precurales, Paratoideo, Retrofaríngeo, Hepático y Poplíteo (animales jóvenes y no gestantes). La distribución generalizada indica infección general(105) .

Se puede realizar un examen directo de excreciones y órganos infectados (fetos abortados, envoltorios fetales, descargas vaginales, pus, etc.). La coloración usada es Ziehl-Nielsen modificada por Stamp (66) o por tinción de Gram(151) .

Las probabilidades de éxito dependerán de las normas de asepsia al tomar las muestras, de la siembra en medios de cultivo adecuados y de la inoculación de animales de laboratorio. Cuando los tejidos son provenientes de necropsia es adecuado quitar la grasa y flamear antes de sembrarlos. Otro método de descontaminación es con ácido clorhídrico 1N o por sucesivos pasajes en solución salina estéril, luego se practican cortes que permitan el sembrado de la parte interna por impresión.

Para que el medio utilizado sea satisfactorio hay que tener en cuenta que permita cultivar la mayoría de las cepas de *Brucella* a partir de un pequeño inóculo. Se debe verificar que desarrollen colonias del biotipo 2 muy exigentes y que demandan suero.

El aislamiento primario se realiza por siembra directa en medios sólidos, si el material está muy contaminado se recurrirá a la inoculación de animales de laboratorio o bien se adicionarán a los medios violeta de etilo y/o antibióticos. Cuando se utilicen estos últimos hay que tener en cuenta que estas sustancias pueden inhibir el crecimiento de algunas cepas de *Brucella*, por eso la siembra debe realizarse por triplicado, en el medio básico, en el medio básico con antibióticos y en otro con violeta de etilo. Otro medio selectivo es el de Farrel suplementado con antibióticos y agentes antimicrobianos, pero estos inhiben el crecimiento de *Brucella ovis* y de *Brucella abortus* biotipo 2(1) .

Para aislar *Brucella* de fluidos (sangre, líquido cefalorraquídeo o líquido amniótico) se emplea también medio líquido adicionado con el 2,5 % de citrato de sodio. El método preferencial para aislar brucelas de sangre es el desarrollado por Castañeda(139) .

2.9.1.1 Medios de cultivo

Los medios sólidos permiten la observación de la morfología de las colonias. Los medios utilizados son los siguientes:

Suero-Dextrosa-Agar (SDA) : permite el crecimiento de todas las especies.

N-Z-Amine-Primateone : este medio fue desarrollado en el Centro Panamericano de Zoonosis.

Triptosa-Agar y Tripticasa- Soya-Agar : crecen la mayoría de las cepas y si se les agrega el 5 al 10 % de suero equino o de conejo crecen todas.

Agar-Suero-Glucosa

Agar-*Brucella*-Albini (contiene suero)

Agar con 5% de sangre de cordero.

Todos los cultivos se incuban a 37° C y en atmósfera adicionada con el 5 al 10 % v/v de CO₂. Las colonias suelen verse a partir del cuarto día y sólo se descartaran las negativas una vez transcurridos 15 días(1) . Según Ramacciotti(139) a los 35 días.

Las muestras inoculadas en medio de cultivo líquido estático se transfieren semanalmente a medio sólido y no se descartan como negativas antes de los 30 días.

Para cepas semilla para vacunas y antígenos se utiliza Agar-Papa, que es un medio de bajo costo, buen rendimiento y poca disociación de colonias.

Para hacer un aislamiento por inoculación, el animal de laboratorio aconsejado es el cobayo (66) . La vía de inoculación es la intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, estas dos últimas se aconsejan para leche o material en descomposición. Se debe inocular 2 o más cobayos, de los cuales uno se sacrifica a las 3 semanas y el otro a las 6 semanas. Las lesiones macroscópicas que presentan estos animales son: hipertrofia de ganglios y bazo, lesiones necróticas de hígado, lesiones articulares, en testículos y epidídimo. Se trozan los órganos, se trituran y se hace el sembrado con el sobrenadante. Se considera una reacción positiva cuando hay títulos serológicos o evidencias patológicas en los cobayos inoculados.

La inoculación de material en embrión de pollo ha sido utilizada con buenos resultados para aislar *Brucella* a partir de sangre(139) .

2.9.2 Diagnóstico clínico:

Por el cuadro clínico que se presenta con abortos, mortinatos o terneros débiles. Las hembras no preñadas son asintomáticas (1) .

En los machos hay orquitis uni o bilateral, disminución de libido e infertilidad. Atrofia testicular, vesiculitis, ampulitis y ocasionalmente higromas y artritis (1) .

2.9.3 Inmunodiagnóstico

Este procedimiento diagnóstico se basa en detectar la respuesta del organismo ante la presencia de un agente patógeno, el que al estimular el Sistema Inmunológico desencadena 2 tipos de respuesta: una de tipo celular y otra de tipo humoral.

2.9.3.1 Inmunidad Celular

En las infecciones intracelulares hay una relación entre la IMC y la hipersensibilidad retardada, aunque, no siempre pueda demostrarse tal asociación. En la infección, generalmente, la Hipersensibilidad Retardada (HR) y el aumento de la actividad bactericida, aparecen juntas, pero la primera puede aparecer, también, en ausencia de proteínas inmunitarias (1).

La HR puede ser inducida por infecciones activas o por sensibilización debida a enfermedades subclínicas, o a vacunación. Una prueba cutánea positiva a un antígeno de *Brucella* indica que ha habido infección pero no es prueba de enfermedad. En caso contrario, la prueba negativa, no indica ausencia de infección; cuando la función linfocitaria es deficiente las pruebas cutáneas pueden ser negativas. En el momento de la infección activa, en los animales serológicamente positivos, los resultados de las pruebas en piel pueden ser negativas. Han sido recomendadas para complementar un diagnóstico dudoso(1)(38)(42).

Los problemas que presenta esta prueba son entre otros: la falta de alérgenos estandarizados; algunos pueden aumentar los títulos serológicos o producir lesiones locales frecuentes en animales sensibilizados.

Los antígenos libres de S-LPS, como la Brucelina INRA o hidrolizados, pueden ser útiles para resolver reacciones cruzadas con otras bacterias. Se ha demostrado que la brucelina puede emplearse ventajosamente como prueba tamiz, siempre que la prueba se interprete teniendo en cuenta la historia del animal o para el diagnóstico epidemiológico del animal(1).

2.9.3.1.1 Test alérgicos

Se usan alérgenos proteicos extraídos a partir de una cepa rugosa de *B. melitensis* en vacas. Este test no es compatible, en animales vacunados con las cepas H38 o 45/20, pero puede usarse en vacas que han sido vacunadas con cepa 19 al menos 2 años antes.

En rebaños recién infectados, con los test cutáneos se puede obtener un resultado más temprano y completo que con los test serológicos. Se ha recomendado como un test complementario para detectar vacas con infección en períodos de incubación con datos anamnésicos desconocidos y en rebaños problema(12).

Para Martrenchar et al.(63) obtienen en su trabajo un 8.4% de positivos serológicos y un 6.4% de positivos a la HR a la brucelina (INRA) y los positivos para ambas pruebas combinadas fue de un 12%. La sensibilidad a la HR relativa a la serología fue de $96 \pm 2\%$. El Valor Predictivo Negativo de la HR es del $94 \pm 2\%$ y el Valor Predictivo Positivo fue del $44 \pm 16\%$. Los métodos serológicos usados fueron Sero Aglutinación en Tubo (SAT), Rosa de Bengala (RB) y Test de Fijación del Complemento (FC). El porcentaje de animales positivos, por lo menos para una de las pruebas, serológicas estándares fue significativamente mayor para hembras mayores de 3 años. Si se considera sobre FC, los porcentajes previos no se modifican significativamente. Si solo RB se considera, la sensibilidad relativa de la HR aumenta significativamente ($\chi^2=4.3$, $df=1$, $P<0.04$) y llega a $58 \pm 20\%$ (hay 14 verdaderos positivos y 558 falsos de 583 verdaderos negativos).

Estos autores observaron que hay animales que reaccionan a las pruebas de HR, pero no a las serológicas; esto se puede deber que la HR aparezca antes que los anticuerpos circulantes; alternativamente, estos animales pueden estar en un estado crónico de la enfermedad. Puede haber falsos positivos, dependiendo de la ausencia de pared celular LPS en el antígeno. Los animales que reaccionan a la serología pero no a la HR pueden estar en un estado anérgico. De todos modos, no se debe olvidar que los falsos positivos a la serología existen: esto se debe a reacciones cruzadas entre LPS del género *Brucella* y algunos antígenos de la familia Enterobacteriaceae (*Salmonella* urbana, *Yersinia* enterocolítica tipo 9, *E. coli*, etc.).

Las pruebas se realizan del mismo modo que la tuberculinización, es decir, se mide el grosor de la piel con un cutímetro; la reacción inflamatoria es mucho menor, si no se usa el cutímetro, cualquier reacción palpable debe considerarse positiva.

Si el animal tiene nódulos de parásitos intradermales (*Demódex*, *Filariodea*, *Besnoitia*) pueden interferir con el diagnóstico; para que esto no suceda, se debe afeitar o pintar el sitio de inoculación del antígeno, para no confundir alguna de estas lesiones con una reacción diagnóstica.

Esta prueba da mejores resultados si se combina con las serológicas y se considerará positivo, si el animal es reaccionante a una o ambas pruebas, la sensibilidad será mayor pero la especificidad decrece.

Otra ventaja es que no es necesario el uso del laboratorio y no se necesita identificar a los animales (facilidad de manejo).

Se debe recordar que esta prueba tiene una relativamente baja sensibilidad y algunos animales infectados pueden no ser detectados.

Para Bercovich et al. (64) el test de hipersensibilidad retardada no detecta la infección en animales con títulos serológicos altos, pero si diagnostica infección en vacas con serología dudosa o solo positiva a Ring test. En estos casos el test de hipersensibilidad retardada debe usarse como prueba definitiva.

En la hipersensibilidad retardada no hay falsos positivos. Esta prueba detecta un 77% de infección comprobada por bacteriología.

Según Shuterland (39) un animal con infección, vacunado o después de la exposición a brucela o a un antígeno brucelar produce una respuesta inmunitaria que tiene dos aspectos, hay por un lado un aumento de la respuesta serológicas y por el otro hipersensibilidad. Dicha hipersensibilidad involucra a linfocitos y es llamada "tipo demorada", es equivalente a inmunidad mediada por célula, las cuales son célula T y macrófagos. Se produce un eritema e induración a las 24-48 hs.

Se ha demostrado que el complejo LPS-endotoxina esta asociado al aglutinógeno L y es el responsable de la elevación anamnésica de las aglutininas después de la prueba alérgicas.

El LPS es la causa de la toxicidad dérmica de los animales positivos. Lo que provoca la reacción es la proteína del antígeno brucélico: la mayoría de las proteínas antigénicas son comunes a todas las especies dentro del género *Brucella*.

2.9.3.1.2 Pruebas anamnésicas

De todo animal infectado, serológicamente negativo, Shuterland demostró que tenía un 75% de sensibilidad y un 100% de especificidad en ganado expuesto a brucelas.

2.9.4 Diagnostico Serológico

Con este tipo de diagnóstico lo que se detecta son anticuerpos (Ig M, Ig G1 e Ig G2) y por este tipo de pruebas no se pueden reconocer las clases de anticuerpos pero si el predominio de alguno de estos.

2.9.4.1 Antígenos

Para la preparación de los Antígenos se usa la cepa de *Brucella abortus* 1119-3. Todos los antígenos deben ser uniformes y estandarizados. Mayores referencias en cuadro N°3. Hay una serie de requisitos que deben cumplir:

Pureza: no deben tener otros gérmenes. El control se realiza con tinciones de Gram, Koster o Zielh Nielsen.

Esterilidad: el antígeno sembrado en Thioglicolato, Saboureaud, caldo dextrosado con indicador de Andrade y SDA; no deben presentar crecimiento.

Sensibilidad: debe probarse por lo menos frente a 20 sueros con títulos conocidos, incluyendo negativos, en comparación con el antígeno patrón.

2.9.4.2 Suero Patrón Internacional anti-*Brucella*

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis recomienda el uso del 2° Suero Estándar Internacional Anti-*Brucella abortus* (ISABS), al cual se le asigna arbitrariamente, el valore 1.000 U.I./ml.(94) .

Cuadro 3: Características de los diferentes antígenos usados para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina.

Antígeno	pH	Vol. Cel.
Placa	6-7	10-12%
Tubo	6-7	4,5%
Rosa Bengala	3,65±0,02	8%
Rivanol	5,8-6,2	4%
Anillo Leche	4-4,3	4%
BPA	4±0,02	11%

Fuente:Ex-CPZ (65)

2.9.4.3 Fenómeno de zona

Este fenómeno puede ocurrir con sueros que posean títulos finales altos, pero que en las diluciones bajas den resultados negativos.

Una de las causas es que se trabaje con antígenos que no respondan a las normas estándares o si el suero está muy contaminado. Pero en estos casos se forma un depósito en el fondo del tubo.

Este fenómeno también se puede observar en la Fijación del Complemento, Rosa de Bengala y no lo presenta la prueba de Placa con Antígeno Buferado (BPA)(85)(156)(157) . Esto se produce por la presencia de anticuerpos incompletos o monovalentes que se unen al antígeno sin producir aglutinación. Algunas veces estos anticuerpos, demostrables por la Prueba de Coombs, bloquean los determinantes antigénicos de la célula, impidiendo la formación de puentes intercelulares, y por ende, la aglutinación.

2.9.4.4 Descripción de técnicas serológicas

2.9.4.4.1 Prueba de aglutinación en placa (Huddleson y Abel). (1)(21)(52)(66)(69) .

Es una prueba sencilla y económica. Pero está muy influenciada por el medio externo (operador, temperatura ambiente, etc) . Tiene la ventaja sobre la prueba en tubos, que es menos afectada por los fenómenos de zona, presencia de anticuerpos incompletos y la hemólisis de los sueros.

Con esta prueba se detectan las siguientes inmunoglobulinas: Ig M, que son la que mayormente se detectan, también las Ig A, Ig G1 e Ig G2

En todos los países donde se la utiliza se debe repetir cada 30 a 60 días, si los títulos aumentan significa infección y si disminuyen, el animal es negativo.

2.9.4.4.2 Prueba de aglutinación en tubo. SAT (Wright 1.897) (1)(52)(69).

Esta prueba se usa para el tránsito internacional de animales, los resultados son expresados en Unidades Internacionales (UI).

Los títulos bajos pueden deberse a infecciones recién adquiridas, pudiendo ser, estos animales negativos; o en los casos crónicos la prueba puede ser negativa.

Con SAT es frecuente obtener bajos títulos en animales infectados. Estos títulos se obtienen en un gran número de animales de los cuales no se aísla la Brucella. SAT clasificó correctamente solo el 52% de 165 vacas infectadas.

Estas 2 pruebas, en placa y tubo, por su baja sensibilidad y especificidad, están dejándose de lado. La SAT se realiza de rutina con el 2 Mercaptoetanol.

Esta prueba tampoco diferencia anticuerpos post-vacunales de los que son el resultado de infección(39) .

Los inconvenientes de esta prueba es que son necesarios tubos, estantes, estufas y su largo tiempo para la lectura (69)

Con la adición de EDTA, se eliminan algunas reacciones inespecíficas y fenómenos de zona. El agente quelante actúa bloqueando la interacción entre porción FC de las Ig M bovina y las brucelas. El bloqueo no se origina por la quelación del calcio, sino, por la configuración del EDTA que le permite competir por los sitios receptores de la brucela. Se le agrega a la dilución final del antígeno 10mM de EDTA. Esto hace aumentar la especificidad a la prueba.

Cuando los niveles de brucelosis bovina son bajos, la presencia de reacciones cruzadas o inespecíficas adquiere mayor importancia, el EDTA disminuye las reacciones inespecíficas(70)

El uso del EDTA modifica el antígeno en el SAT pero no altera significativamente la aglutinación causada por la infección por Brucella abortus, en muchos sueros. Efectivamente, el título se puede aumentar en algunos de estos sueros, en estos casos, el EDTA provee una aglutinación específica. Esto es inexplicable. Además existe una buena correlación entre el SAT modificado por EDTA, y el SAT a 56°C. Sin embargo, el SAT a 56°C altera más específicamente las reacciones de aglutinación y en menor medida que el SAT por EDTA. Por otra parte, el antígeno modificado por EDTA reduce significativamente los títulos no específicos del suero. El test de FC reconocido como un test muy específico y sensible para brucelosis, si se compara con los resultados obtenidos con EDTA positivos, pueden ser algo variables, lo cual se explica por la presencia en el suero de factores aglutinantes específicos y no específicos, en niveles variables (71)

También se ha demostrado que el cobre mejora la interacción entre el isotipo Ig G1 y el antígeno, en presencia de albúmina(74) .

Bowden et al(72) describe que esta técnica se comienza a usar a partir de los trabajos de Scheibner en 1.976, continuados por Nieber en 1.979. La modificación de la técnica de Wright se debe al agregado de la sal disódica del ácido etilen diamino tetracético (EDTA) de antígeno (W-EDTA). Su mecanismo de acción no es calcio ni magnesio dependiente, sino que correspondería a un fenómeno de competición entre el EDTA y la FC de las Ig M alteradas, por los sitios de unión sobre el antígeno de brucela sin afectar la actividad de las Ig M específicas. El antígeno se prepara con el agregado de 0,372g de EDTA a 100ml de antígeno (100mM por litro de antígeno).

Como características salientes de la prueba W-EDTA se pueden mencionar:

- * Precocidad: se positiviza entre las 16 y 18 hs., no modificando sus títulos, lo que no se observa en Wright.
- * Facilidad de lectura: caracterizada por un sobrenadante cristalino y una aglutinación en el fondo del tubo que resulta más consistente a la agitación suave, con grumos de gran claridad y tamaño.
- * Bajo costo
- * Fácil disponibilidad de la droga
- * No tóxico
- * Sin olores desagradables
- * Sin problemas de conservación, ni pérdidas de actividad por prepararse en forma extemporánea y de sencillo desarrollo.

2.9.4.4.3 Prueba con antígeno Rosa de Bengala

A veces indica infección antes que Rivanol, aglutinación o FC. Sobrestima el número de animales que poseen anticuerpos contra brucelas en su organismo(75)(76) .

Es una prueba útil en áreas donde no se aplica la vacunación y la prevalencia es alta. Los animales vacunados entre los 3 y 8 meses de vida, a los 2 años los anticuerpos residuales no son tan altos como para interferir en el diagnóstico; lo que sí ocurre con los animales vacunados de adultos.

En las áreas de baja prevalencia por poca especificidad hay posibilidades que de resultados falsos positivos, identificando bien los negativos; a los positivos se los debe someter a otras pruebas complementarias. Estos sueros falsos positivos se debe a la presencia de anticuerpos no específicos los cuales no solo aglutinan con Brucellas, sino con otras bacterias como Proteus, Salmonella y Alkaligenes; su presencia es la responsables de estas reacciones. La actividad de estos anticuerpos es inhibida si la reacción se realiza con el antígeno de brucela a un pH de 3,65 en el cual la actividad de los anticuerpos contra brucelas no son afectados. Cualquier reacción de aglutinación es considerada positiva (52) .

Tiene como ventaja el identificar animales con títulos bajos y con infecciones crónicas, que pueden ser negativos a otras pruebas de aglutinación.

La especificidad esta dada por el pH y la concentración salina del antígeno; las inmunoglobulinas afectadas son las Ig M, más que las Ig G1 o Ig G2 y como la Ig M es producida, principalmente, como respuesta a la vacunación con cepa 19; se llega a la conclusión que la reacción con la Ig M puede explicar las reacciones falsas positivas (39) . La Ig M es inmunoglobulina no específica, que resulta afectada por el pH, quedando activas las Ig G, y de ellas la G1 permanecen activas(77(79) .

En la primera fase de un programa es una buena prueba, porque es fácil y barata. Tiene el inconveniente que da falsos negativos, aunque éstos son escasos.

Según Corbel(80) el posible efecto del colorante RB sobre la especificidad del antígeno RB fue comparado con el mismo antígeno pero sin teñir, no hallando diferencias. Este colorante si afecta la estructura antigénica, es en forma mínima. RB no es esencial para la especificidad, varios colorantes como fucsina básica, eosina, naranja de acridina, verde de malaquita, cristal violeta con el mismo pH (3,65); obtienen resultados idénticos al colorante RB. Este colorante sensibiliza a las Brucellas abortus vivas a la inactivación fotodinámica aunque no afectó apreciablemente a la estructura antigénica del organismo.

No detecta anticuerpos post-vacunales, ni detecta incubación y estados crónicos de la enfermedad(81) .

Hay correlación entre los sueros RB positivos - FC y RB - SAT. En rebaños infectados detecta animales infectados más tempranamente que el SAT e inclusive los positivos, siendo SAT negativos, pero FC positivos. Si se vacuna al rodeo debe confirmarse el diagnóstico con FC. Puede existir una proporción de sueros positivos a RB y negativos a FC (82) .

Timbs et al. (83) describe que existe una relación muy alta entre RB y FC cuando los niveles de infección de la población estudiada son muy altos.

Algunos animales pueden ser RB positivos y FC negativos en algunos test del rodeo y antes resultaron RB(+) o FC(-). Cada repetición de estos resultados (RB +, FC-) ocurre en rebaños que continúan teniendo reactores después de realizado los test. En el campo siempre se teme que estos animales puedan ser fuente de infección; pero después de repetidos esfuerzos por aislar brucelas de estos animales, no se encontraron evidencias que indicaran que pudieran ser una fuente significativa de infección.

No hay relación entre las posibilidades que una reacción de RB(+) siendo FC(+) esté relacionado con el número de ocasiones previas en las cuales esos animales hayan sido RB(+) y FC(-). Se ha observado el hecho que un animal haya sido RB(+) y FC(-) según el número de ocasiones previas que ha sido diagnosticado no varía, si el estado de infección del rodeo se ha establecido por el test de FC. Estos datos demuestran que hay animales que en los rodeos bajo estudio por algún tiempo, que reaccionan primero a RB que a otros test.

2.9.4.4.4 Prueba con Antígeno en placa tamponado (BPA)(Angus y Barton, 1.984). (1)(157) .

González Tomé et al (85) describen la prueba, la metodología, interpretación. Las conclusiones que estos autores arriban son las siguientes:

- * es un antígeno estable en el tiempo,
- * muy simple de realizar, ya que se trabaja con una sola dilución (1/25),
- * los sueros negativos a BPA, también son negativos a las otras pruebas complementarias,
- * no se hallaron fenómenos de zona,
- * con esta metodología se obtienen más falsos positivos, que con RB pero esta última no detecta algunos pocos sueros positivos a otros test.

2.9.4.4.5 Prueba de aglutinación con 2 Mercaptoetanol (Anderson, 1.964).

Un animal positivo a esta prueba, debe considerarse infectado, aunque este vacunado, siempre que la vacuna haya sido colocada, por lo menos 8 meses antes.

El 2ME es sensible a luz y al calor, por eso se los mantiene en heladera y frascos oscuros, la preparación de la solución debe efectuarse antes de usarla. El olor que tiene es muy desagradable. Es una prueba lenta y calidad del suero puede afectar el desarrollo (12) .

Detecta infecciones crónicas, da menos falsos positivos que la prueba en tubo, placa o RB.

Un resultado SAT (+) y 2-ME (-) indicaría reacciones inespecíficas o una infección reciente, lo que se aconseja es repetir a los 15 ó 20 días.

2.9.4.4.6 Prueba con Rivanol (Anderson, R.M. y col. 1.962).

Los animales no vacunados con títulos de 1/25 se los considera infectados.

Animal vacunado con título 1/25 se lo considera sospechoso, se debe repetir la prueba entre 30 y 60 días posteriores a la primera; si el título es 1/50 ese animal es positivo.

Esta prueba es muy semejante al 2-ME, en lo que las pruebas determinan y en su interpretación.

Algunos sueros son inactivados resultando Rivanol (-), pero son 2-ME (+), si esto sucede y la diferencia de títulos es de medio punto, es que, el Rivanol puede tener una pequeña acción sobre las IGs(66) .

El Rivanol puede ser tóxico, tiñe el material de vidrio que debe ser limpiado con solución sulfocrómica.

2.9.4.4.7 Prueba de Fijación de Complemento

Hay 2 técnicas: una trabaja con el 100% de hemólisis y la otra con el 50% de hemólisis, siendo esta última más exacta, pero más compleja y requiere mayor minuciosidad. Las dos se pueden realizar en frío y en caliente.

La técnica en frío requiere una incubación 14 a 18 hs. a una temperatura de 4°C y la en caliente requiere una incubación de 1,5 horas a una temperatura de 37°C.

El Ex-Centro Panamericano de Zoonosis (INPPAZ) y el INTA - Castelar recomiendan la técnica en frío.

La Ig G1 es más efectivamente fijada a 4°C, la Ig M lo es a 37°C.

En los animales vacunados los anticuerpos fijadores del complemento desaparecen más rápidamente que los aglutinantes, pero en los animales infectados son los fijadores que permanecen más tiempo. Con una vacunación oleosa, los anticuerpos Fijadores permanecen más tiempo(52) .

Esta técnica puede detectar anticuerpos aglutinógenos y no aglutinógenos. No mide Ig G2, si mide Ig G1 y es incierta su acción con las Ig M(29)(39) , las que son inactivadas con el calor(51)(101).

No detecta animales en estado de "latentes"(32)(33) . Se pueden producir reacciones anticomplementarias o prozonas por bloqueo de Ig G1 e Ig M por Ig G2 contra B. abortus(15) . Las prozonas se dan en la técnica en caliente(73) . Esta técnica está sujeta a fallas mínimas.

Por el uso de diferentes técnicas, es recomendable utilizar, siempre como referencia el Suero Patrón Internacional (ISBAS) para exportación de los animales.

El Ex-Centro Panamericano de Zoonosis aconseja tomar a una dilución de 1/20, como positivo y una dilución de 1/10 como sospechosa(86) .

Ahora la técnica esta automatizada con lo que se elimina el error humano, improvisaciones y reduce los gastos en materiales de laboratorio(87) .

Es un método de diagnóstico más eficiente que el SAT (73)

La FC solo es escasamente influenciada por reacciones no específicas y es considerada más específicos que los test de aglutinación(88).

2.9.4.4.8 ELISA

La sensibilidad y especificidad es semejante a la FC, se podrían detectar otros isotipos, ya que la actividad fijadora del complemento, está asociada solo a Ig G1 e Ig M. Permite trabajar con muestras que presentan poder anticomplementario(1) .

Para poder utilizar esta técnica se necesita un lector fotométrico, el cual sirve para lecturas de diagnóstico de otras enfermedades.

Los antígenos que se pueden usar son de diferente origen: particulados, sonicados, enteros, solubles, LPS y proteicos. Los purificados son más recomendables porque disminuyen las reacciones inespecíficas, pero es de escaso rendimiento.

La sensibilidad es semejante a FC y Rivanol(12) .

Este es un proceso diagnóstico rápido, sensible y fácil de realizar, pero necesita mucha atención la estandarización del antígeno, el conjugado del suero, tiempo de incubación y concentración enzimática(89) .

El uso de ELISA de competición puede ser de gran valor para el diagnóstico confirmatorio de la infección en animales, sirviendo esta para diferenciarlos de los anticuerpos postvacunales (15)(90) .

Heck et al(91) compara ELISA con otros métodos convencionales (HIGT-Test de Hemólisis en Gel-, RB, Riv., FC, SAT), y para ello hace una experiencia en la cual mide la respuesta inmunológica de 2 grupos de animales, uno vacunado y otro no vacunado; a los 284 días de la vacunación, se los desafió con una descarga de la cepa 2308.

En el grupo de los vacunados con cultivo bacteriano positivo, a los 8 semanas fue: el 100% para ELISA, 100% para HIGT, 88,5% para RB; a las 20 s., 85,2% Riv.(16s.), 84,6% en FC (20s), SAT 85,2% (20s.). Sueros del 92 y 96% de los infectados, vacunados son positivos con ELISA y HIGT respectivamente a las 4 semanas del

desafío y el suero del 100% de los animales pertenecen positivos a las 8 semanas post desafío. El suero de menos de 88,6% de estos animales reaccionan positivos en los test convencionales en cualquier intervalo mayor a los 24 semanas post desafío.

Sueros del 90 y 93% de los animales infectados, no vacunados tienen reacción positiva en ELISA y HIGT 4 semanas post desafío y menos del 62% de estos sueros tienen una reacción positiva por otro método en este intervalo, se realizaron pruebas hasta 12 semanas post desafío, el suero de todos los animales no vacunados permaneció positivo en todos los test.

2.9.4.4.9 Hemólisis Indirecta

Es una prueba de mucha sensibilidad, se puede realizar en sueros que presentan poder anticomplementario o fenómenos de zona en Fijación de Complemento. Es menos específica pero tiene la ventaja de ser menos laboriosa que esta.

2.9.4.5 Diagnósticos con otros materiales

2.9.4.5.1 Mucus Vaginal(92)

Para esta prueba se usa flujo vaginal de animales recién abortados, pero expone al operador con un material altamente contaminado. También se puede usar un tampón vaginal en los momentos alejados del parto o periparto. El problema creado por el fracaso de algunas vacas para la producción de anticuerpos séricos cerca o después del aborto, se podría solucionar con este método.

No hay falsos positivos. Este método usa antisueros fluorescentes. Las descargas uterinas no son homogéneas, en la cantidad de bacterias expulsadas y que son recogidas para ser observadas en una tinción o porque existe una predilección de las brucelas por el tejido fetal y los niveles existentes en las descargas pueden ser muy bajos con la expulsión de la placenta.

2.9.4.5.2 Prueba del Anillo en Leche(1)

Este test fue desarrollado por Fleischauer en 1.937, para detectar la presencia de anticuerpos contra la Brucella en leche, usando antígenos de brucelas teñidos. El desarrollo de una reacción positiva depende de 2 factores:

- los glóbulos grasos de la leche llevan adheridos los anticuerpos presentes en la leche. Cuando se deja reposar la leche, los glóbulos grasos suben a la superficie. Estos con las aglutininas son sensibles al calor y al agitación vigorosa; la adición de células de brucelas teñidas son aglutinadas por los anticuerpos anti Brucella;
- la unión antígeno-anticuerpo se produce en la superficie de los glóbulos grasos y la coloración se observa en la capa grasa de la superficie.

Este test es influenciado por el contenido de grasa de la leche y por el tamaño del glóbulo graso.

La posibilidad de obtener un positivo con leche mezclada de 25 vacas cuando hay dos reactores es del 96% y cuando hay 3 es del 99%(22)

Aparte del antígeno, la sensibilidad del test dependerá del título de anticuerpos que excreta el animal por leche.

Una reacción positiva en ausencia de infección puede deberse a que las vacas han sido vacunadas con la cepa 19 en edad adulta, estos títulos aparecen a la semana y persisten por 2 ó 3 meses.

Pueden dar resultados positivos si la prueba es realizada en períodos de secado, en animales preñados o a vacas con mastitis(12)(39) .

La leche debe ser conservada a 4°C.

Esta prueba es de alta sensibilidad y puede usarse como prueba de vigilancia epidemiológica(22)(67) .

Es una prueba simple, de amplia difusión. El antígeno es una suspensión de Brucella abortus muertas, teñidas con hematoxilina.

Otra ventaja que posee es su bajo costo y la fácil ejecución. Cuando se juzga por medio de reacciones serológicas positivas se tiene una eficiencia del 73,4% (39) .

Si se realiza esta prueba en una plataforma receptora de una usina láctea, cada 90 días., la eficiencia es de, aproximadamente el 95%.

Cedro et al. (68) resume las principales características de esta prueba de la siguiente manera:

- Es una buena prueba para el diagnóstico presuntivo de brucelosis.
- Sencilla, fácil metodología, gran sensibilidad, económica y no molesta al animal lechero.
- El antígeno está teñido con hematoxilina o tetrazolium, estos colorantes son los de mayor eficacia para la realización de esta prueba y a igual concentración, los resultados son comparables e igualmente sensibles.
- Los antígenos son de fácil preparación y mantienen la sensibilidad por más de un año.

- Una leche positiva diluida en progresión geométrica con leches negativas, mantiene su positividad hasta la dilución de 1/16 a 1/32 y que en algunos casos la positividad puede alcanzar hasta títulos de diluciones muy elevadas (1/512 - 1/1024).
- Si se mezclan lechas positivas con negativas, el resultado es positivo.
- Es una buena prueba para vigilancia epidemiológica.
- Existe una concordancia en la prueba del Anillo en Leche y la lactosueroaglutinación. Cuando esta última se practica a partir de diluciones bajas (1/2 en adelante).

2.9.4.5.3 Ring Test sobre leche de animales individuales

En épocas anteriores, a veces se usaba como test adicional cuando no es posible detectar los animales positivos, por los métodos de Wright y Huddleson.

La muestra debe ser obtenida de cada animal en producción y se realiza de la misma manera. De este modo el animal responsable de ser el que produce que la mezcla de leche sea positiva, se detecta, y si es necesario se somete a otros test, pudiendo llegar a hacer un cultivo con la leche. Este test está influenciado por las mismas causas que afectan a las muestras colectivas.

Una muestra que resulta positiva se debe realizar diluciones seriadas con leche negativa, para eliminar reacciones falsas positivas, frecuentes después de la parición, al final de lactación y en casos de mastitis. Reacciones de 1/8 es significativa. A veces, animales con brucelosis crónica tienen seroaglutinación con títulos bajos en Wright y Huddleson; y la prueba del Anillo en Leche puede detectar la enfermedad.

2.9.4.5.4 Test de dilución seriada de leche positiva a Anillo en Leche

Esta es usada sobre muestras de leche de animales individuales que han reaccionado a la prueba del Anillo en Leche. Se usa para hacer diluciones leche libre de brucelas y se realiza de la forma usual. Algunos de los animales infectados tienen títulos de 1/256 o mayores. Los vacunados no infectados pueden reaccionar con títulos de 1/16 o mayores en los primeros meses post vacunación.

2.9.4.5.5 Ring Test de muestras de cuartos

La muestra de cada cuarto de animales positivos a Ring Test se analiza en forma separada. El valor de esta test, se basa en la siguiente observación: el animal infectado tiene una amplia variación entre cada cuarto, el animal vacunado no tiene mucha variación de títulos entre cada cuarto.

Con la leche también se pueden realizar las siguientes pruebas diagnósticas:

- Test de aglutinación de suero lácteo en tubo
- Test de suero lácteo en placa
- Test de Coombs

Las Igs de la capa de crema, provenientes de vacas infectadas experimentalmente o vacunadas, reaccionan positivamente a la prueba del Anillo en Leche. Se demostró que la Ig A estaba siempre presente, en menor medida que la Ig G. El isotipo Ig G1 produce aglutinación en el fondo de un tubo y puede interferir en la formación del anillo.

Una leche es negativa si todo el tubo está coloreado y la capa de grasa es blanca.

Cantidad de Animales y cantidad de leche necesaria para realizar la prueba

< de 150 A.	1 ml.
151-450 A.	2 ml.
451-700 A.	3 ml..
> de 700 A.	Dividir los tambos

Se usa 1 gota (0,03 ml.) de Ag.

Un tambo que resulta positivo a esta prueba, se debe someter a todos los animales a pruebas serológicas.

Hay una relación entre el diagnóstico individual del 99,46% entre la prueba del Anillo en Leche y el diagnóstico serológico.

2.9.4.6 Otros diagnósticos:

2.9.4.6.1 Antígeno acidificado en placa(94)

Elimina factores no específicos responsables de falsos positivos. La solución con que se detectan anticuerpos tiene un pH de 4. El antígeno con un 10% (en volumen) de brucelas en solución acuosa con 0,5% de fenol y 0,85% de NaCl. El pH inhibe la mezcla de las aglutininas no específicas o las destruye.

- Test de inactivación por calor
- Test de aglutinación de anticuerpos incompletos
- Test de Coombs
- Anticuerpos fluorescentes
- Test Casteñeda
- Test (difusión en gel) precipitinas
- Plasma seminal (SAT)
- Inmunodifusión
- Hemólisis en gel
- Hemoaglutinación indirecta
- Inmunofluorescencia
- Microaglutinación
- Radio inmuno ensayo

2.10 TRATAMIENTO

En los bovinos no se acepta; hasta el momento ninguno ha dado resultados efectivos. No se realiza ni tratamiento etiológico ni sintomático, ya que cuando se inicia el proceso del parto o aborto nada lo puede interrumpir.

En la brucelosis humana si hay tratamiento con antibióticos(151)(171) .

2.11 PREVENCIÓN

Para la prevención de la brucelosis tenemos que saber si el agente causal de la enfermedad existe en el lugar. De no existir se deberán tomar todas las medidas de manejo como para evitar su ingreso, entre las cuales podemos citar: al comprar animales, hacerlo de establecimientos que se hallen libres de la enfermedad con sanidad garantizada; hacer sangrías periódicas para detectar posibles reaccionantes; tener un lazareto para la cuarentena de todos los animales que vayan a ingresar al campo.

2.12 CONTROL

Para ello existen vacunas que se deben usar en las zonas donde la enfermedad está y con rodeos de prevalencia elevada (107) .

La vacuna ideal debe poseer las siguientes características:

- Inocuidad.
- Protección del 100% de los animales vacunados.
- Facilidad de aplicación y almacenamiento.
- Que no existan restricciones sobre la edad de los animales que van a ser vacunados.
- Que no genere interferencia con el diagnóstico posterior.

Teniendo en cuenta los ítems anteriores se llega a la conclusión que no existe la vacuna ideal.

Las vacunas para evitar la brucelosis se pueden dividir en 2 tipos:

- a) bacterias muertas (por calor o medios químicos)
- b) bacterias vivas pero atenuadas (más efectivas).

En nuestro país se usa la cepa 19, vacuna viva, pero de muy baja patogenicidad.

Haciendo una breve reseña sobre los planes para el control y erradicación de la enfermedad que en su momento fueran obligatorios y rígidos y ahora son obligatorios pero con la participación fundamental del productor.

2.12.1 Legislación(1)

Año 1.932: Ley 9.588 y sus decretos reglamentarios incluye a la brucelosis (fiebre ondulante) como una enfermedad ocupacional.

Año 1.947: Ley 11.544, 11.729 y 12.887, así como el Decreto 26.942/47 considera, indirectamente, la infección contraída en los mataderos como un accidente de trabajo. Una Resolución Ministerial (2.396) crea un registro de productores que quieran vacunar a su ganado contra la Brucelosis.

Año 1.949: Ley 5.317 y sus Decretos regulatorios: hace de momento obligatoria la profilaxis de esta enfermedad en la Provincia de Buenos Aires.

Año 1.951: se la considera una enfermedad social.

Año 1.952: Res. Ministerial 83 el cual dice que todos los criadores de ganado bovino, porcino y caprino deberán realizar los tests para la detección de la enfermedad.

Año 1.955: Decreto 11.962. Regula la obligatoriedad de los tests para detectar brucelosis en los animales importados.

Año 1.958: Resolución 179 regula el registro de la producción de vacunas y antígenos para el diagnóstico.

Año 1.963: Ley 6.703 y Decretos regulatorios incluyen a la brucelosis entre las enfermedades que requieren atención prioritaria por la Policía Sanitaria y los agentes de promoción de la ganadería.

Año 1.970: Ley 18.913 que enmienda la Ley 9.688, que considera a la brucelosis como un accidente de trabajo y hace extensivo a los trabajadores de envasado de carne, aunque no estén en contacto directo con la carne.

Año 1.980: Resolución 698 del Departamento de Agricultura y Ganadería; hace obligatoria la vacunación de terneras entre 3 y 8 meses de edad para todo animal al norte de los ríos Colorado y Barrancas.

Año 1.982: Resolución 73. Extiende ese requisito a todo el país.

2.12.2 Campañas

Año 1.932: el gobierno nacional crea una comisión para el estudio de la fiebre ondulante.

Año 1.947: numerosos planes son propuestos para el control de la enfermedad. Porque en la Pcia. de Córdoba existen severos problemas con la misma, se proponen campañas basadas en la vacunación y varias medidas sanitarias.

Año 1.957: Ministerio de Educación y Justicia apoyados por un grupo de expertos crea las bases para la "Ley Nacional de una Campaña Compulsoria Contra la Brucelosis Animal y Humana".

Año 1.965: La vacunación es compulsoria en áreas de las Pcias. de Santa Fe y Córdoba.

Un desarrollo notable de un programa piloto realizado en Córdoba, Buenos Aires entre 1.966 y 1.967, reduce el porcentaje de positivos de 16,1% a 8,5%.

Un estudio realizado por estudiantes del Curso de Planificación en Salud Animal del Centro Panamericano de Zoonosis detectó el 8% de animales reaccionantes.

Entre 1.965 y 1.971 la rutina de trabajo del SENASA reporta que la enfermedad ronda alrededor del 13%.

En los años 80 una única campaña oficialmente conducida con vacunación obligatoria en los Dptos. Las Colonias y Castellanos en la Pcia. de Santa Fe, donde alrededor de entre 200.000 y 600.000 cabezas de ganado son vacunadas cada año.

La campaña compulsoria comienza en estos años y tiene como base las experiencias previas. Los valores de prevalencia de infección fueron del 17,7%; 10 años más tarde, un estudio de muestras presentó una prevalencia del 3% y un 50% de productores con establecimientos libres de infección.

Año 1.980: 1.882.697 animales fueron registrados como vacunados sobre un estudio de 5.625.300 animales en el área del norte de los ríos Colorado y Barrancas.

Febrero de 1.981: la vacunación se hace obligatoria para todo el norte de los ríos Barrancas y Colorado. Después de esta decisión los datos en la vacunación de un 33,7% (1.980) asciende a 74,3% en 1.981 valores que siguen en aumento.

Año 1.982: la vacunación es obligatoria en todo el país, Resolución 73/82 (127).

Año 1.993: Por Resolución 83 se creó la Comisión Nacional de Lucha contra la Brucelosis y Tuberculosis.

Resolución 1.269: establece un Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina en todo el país (96). En la misma, entre otras cosas, se establece, que la vacunación se realizará a todo animal bovino de sexo hembra comprendida entre los 3 y 10 meses de edad.

El inmunógeno utilizado será la cepa 19.

2.12.3 Características de la vacuna cepa 19.

La cepa 19 de la *Brucella abortus* se mantiene estable desde su aislamiento en 1.925(117).

Es un inmunógeno ampliamente difundido(97), de virulencia atenuada, no patógena para el bovino. Esta sirve para el control y erradicación de la enfermedad (97)(98)(117). Deben estar las bacterias en fase lisa. Esta vacuna protege entre el 70 y 80% de los animales contra el aborto y el 55.7% de la infección y no es transmitida por los animales vacunados pero puede provocar abortos, siendo suficiente la inmunidad que produce por 4 ó 5 preñeces(102)(117); la revacunación no aumenta la inmunidad(103). Un trabajo realizado por Cedro et al(108) se comprobó que después de 4 meses y medio de la vacunación, que a los animales que se los desafiaba con una cepa virulenta, la vacuna los protegía al 66,66% en forma absoluta y el 33,33% restante era protegido en forma relativamente alta. Con una vacunación temprana no existen anticuerpos residuales que interfieren con las pruebas diagnósticas. Los animales vacunados, protegidos o no, elevan sus títulos de forma muy significativa, siendo un problema para el diagnóstico.

Presenta problemas de interferencia en las pruebas de diagnóstico. Esta vacuna induce la producción de anticuerpos para el antígeno O de los LPS; si se vacuna entre los 4 y 12 meses; estos anticuerpos no tendrían interferencia con las pruebas serológicas. Durante las 2 y 10 semanas post vacunación los bovinos son, generalmente, positivos o sospechosos a todos los tests (15)(21).

La respuesta humoral (RB, FC, IH Ind. y ELISA) es muy rápida para los vacunos. Esta respuesta es anterior a la respuesta celular(35).

La inmunidad celular es importante, para el reconocimiento de la infección por brucela. La cepa 19 provee una limitada eficiencia en la protección al desafío ante una cepa virulenta. Hay numerosas razones de esto: la posibilidad que la IMC contribuya efectivamente a la resistencia de la enfermedad está demostrado. La cepa 19 no estimula a esta respuesta (una dosis), para lograr ese estímulo sería necesario la colocación de más dosis en el animal (los linfocitos no son sensibilizados por la cepa o pueden suprimirlos(38) .

La protección por la IMC de los patógenos bacterianos intracelulares dada por la activación de los fagocitos mononucleares que son las células huésped de las brucelas. Se ha determinado que la IMC y la linfoproliferación produce la protección contra la brucela. Se producen IL2, células T CD4 y CD8(39) . Por otro lado, se ha hecho notar que la estimulación linfocitaria guarda una buena correlación con los hallazgos bacteriológicos en animales infectados(41)(102) . No hay correlación entre el nivel de anticuerpos detectables en la seroaglutinación y la estimulación linfocitaria de los linfocitos en animales vacunados y es pequeña o no existe en los infectados, de esto se desprende:

a) los linfocitos de animales vacunados con bacteriología confirmada por aislamiento de *Brucella abortus* tiene una relación muy alta de estimulación linfocitaria específica entre los terneros vacunados con cepa 19 y los animales no expuestos a las brucelas.

b) la correlación fue baja entre los test de estimulación linfocitaria y el nivel de anticuerpos. Las vacas infectadas con cepas de *Brucella abortus* tienen una correlación directa entre la respuesta IMC y los títulos de anticuerpos; los animales vacunados no tienen correlación entre los títulos de anticuerpos y la respuesta de IMC, medida por la estimulación linfocitaria.

El efecto de los anticuerpos calostrales deprime la respuesta de anticuerpos en los terneros, igual efecto tienen los niveles de corticoides. Por lo cual Plackett et al(44) recomienda hacer una vacunación temprana, antes de los 5 meses, y proceder a un revacunación.

Hay diferentes vías de aplicación de la vacuna contra la brucelosis: oral, subcutánea, intradérmica, vía conjuntival, por pellets vaginal(21)(107) , no presentando ningún tipo de reacciones adversas ninguna de estas vías.

No se aconseja el uso de vacuna en machos por la posible producción de orquitis(21) .

La concentración de bacterias en un principio fue de 5×10^{10} UFC; a mediados de los 80 redujo a 3×10^9 , de 1×10^{10} UFC.

En cuanto a la edad de vacunación hay varias posturas: de 4 a 12 meses(13) ; de 3 a 8 meses (1) ; de 3 a 10 meses(97)(98) .

Alton(101) recomienda la vacunación entre los 3 y 8 meses de edad; realizó una experiencia vacunando animales entre los 2 y 3 meses, estos animales desarrollaron una resistencia semejante a los vacunados entre 4 y 8 meses y la producción de anticuerpos fue menor. El límite menor para la vacunación de las terneras es de 2 meses, por los problemas de los anticuerpos maternos (calostro). Los anticuerpos predominantes en los vacunados son las Ig M y en los animales infectados son las Ig G.

García-Carrillo et al(103) obtienen buena respuesta inmunitaria en terneros vacunados a los 3 meses; los animales recién nacidos son inmunocompetentes. La producción de anticuerpos en terneros de 6 meses es superior a la obtenida en terneros de menos edad. También observaron que si vacunaban animales de entre 8 y 15 días de edad, la respuesta serológica obtenida era variable y poco intensa, con una edad mayor, la reacción es más uniforme y los títulos obtenidos son más altos en los de mayor edad.

Eaglesome et al (13) informa: a) a las vaquillonas conviene vacunarlas antes de los 9 meses y preferiblemente antes de que inicien la actividad sexual,

b) las vaquillonas de 9 meses o más edad deberían ser vacunadas con dosis no mayor a 1×10^{10} UFC para reducir los títulos posvacunales,

c) las vaquillonas de cualquier edad (3 a 23 meses) que se les aplique dosis reducida (1×10^6 UFC a 1×10^9 UFC) no están adecuadamente protegidas contra las brucelas virulentas,

d) ante el desafío con una cepa infectante, la infección fue significativamente menor en hembras vacunadas a cualquier edad con la dosis normal (3×10^9 a 1×10^{10} UFC).

La vacunación de animales adultos con dosis normales se ha usado, pero hay interferencias con los anticuerpos y los problemas de diagnóstico(43) . En los EE.UU. el programa de erradicación de la brucelosis bovina contempla la aplicación de dosis reducida con cepa 19.

Después de una vacunación con la cepa 19 las terneras, usualmente, presentan una infección pasiva y desarrollan un aumento en la resistencia a la brucelosis. En raras ocasiones los animales pueden quedar persistentemente infectados, en cuyo caso las reacciones serológicas no pueden diferenciarse de las infecciones con las cepas virulentas. En los animales vacunados, se requiere un estudio para saber si la infección es por cepa 19 o por una cepa de campo. De 104 vacas examinadas bacteriológicamente, se confirmó que el 37,5% de las mismas eran positivas a cepas de campo, cepas vaccinales o a ambas. El alto porcentaje de vacas con infección con la cepa 19, es compatible con la hipótesis que la vacuna es usada en animales adultos y causa la condena de algunos de estos animales(105)

La dosis reducida no obvia este problema. Los animales preñados en el primer momento o al final del 2º trimestre, con dosis reducida tienen un gran riesgo de ser positivas a los test.

La multiplicación masiva de brucelas en el útero preñado se debe a la estimulación del crecimiento bacteriano por la abundancia del eritrol en ese órgano. La cepa 19, es una cepa cuyo crecimiento es, en general, inhibido por el eritrol. Este factor puede ser el más importante en prevenir la colonización de dicho organismo cuando se vacuna animales preñados. Pero, hay cepas mutantes que utilizan este alcohol para su crecimiento y es conocida la regular aparición de cepas eritritol sensibles en cultivos de cepa 19. Se vacunaron más de 10.000 bovinos con la dosis estándar de cepa 19, entre el 7º y el 8º mes de preñez observándose el 1% de abortos, por esta razón la dosis recomendada para vacas preñadas es de 3×10^8 células viables(55) . En otra experiencia, la proporción de vacas Holstein fue RB (+) cuando se las vacunó entre los 4 y 6 meses de gestación. La proporción de animales para carne que fue positivo al cultivo de la cepa 19, fue mayor cuando se las vacunó entre los 4 y 6 meses de gestación. Tanto para ganado lechero como de carne, la proporción de positivos fue mayor cuando se los vacunó en la mitad de la gestación, que cuando se lo hizo en el final (7-9 meses). Las vacas que se vacunaron al final del 1er o al principio del 2do trimestre (84 - 135 días de gestación), con una dosis reducida, corren mayor riesgo de ser positivas a los tests para detectar la brucelosis. La infección inducida por la cepa 19 no fue confirmada por aislamiento(105) .

Hay un reporte (Nicoletti, 1.986) que la cepa 19 puede producir infertilidad permanente en los machos semejante a la enfermedad normal, y por ello no se recomienda el uso de la vacuna en estos animales.

Para García-Carrillo la inmunidad que produce la cepa 19 disminuye cuando se aplica junto con otras vacunas con adyuvantes oleosos, lo mismo sucede cuando la vacunación es realizada un mes antes, aunque la diferencia es muy pequeña. Se propone que la diferencia entre las vacunaciones sea de un mes o más, esta determinación se realizó en cobayos por lo que el autor recomienda hacer un estudio para las especies mayores(99) .

Según Torioni de Echaide et al(100) determinaron la mayor persistencia de anticuerpos en *Bos indicus* que en *Bos taurus*. Los niveles de anticuerpos con valor diagnóstico en los *Bos taurus* desaparecían a los 84 días (FC) y a los 114 días (2-ME y AT), mientras que los *Bos indicus* los anticuerpos desaparecían a los 198 días (FC) y a los 224 en (AT y 2ME).

A un año de la vacunación, existían diferencias estadísticamente significativas entre los *Bos taurus* e *indicus* a RB y de animales con títulos de significado diagnóstico a 2-ME y FC. Los *Bos taurus* a los 8 meses metabolizaron las Ig G.

Esta diferencia plantea el problema de hacer la sanidad y la eliminación de reaccionantes (se eliminan falsos positivos). El problema surge con la edad para iniciar las pruebas (en el ganado índico).

Los niveles de anticuerpos post vacunación son detectables, por FC, a los 7 u 8 días; haciendo un pico en el día 15, declinando y puede haber un 2º y 3er pico a los 2,5 y 6 ó 7 meses respectivamente, estos picos están compuestos por Ig G1 pero no por Ig M. Las Ig G2 responden mucho menos y la respuesta de Ig A no sobre pasa los niveles basales por 10 meses. Parece que la síntesis de Ig G2 es un componente esencial de anticuerpos requerida para eliminar la *Brucella abortus* cepa 19 o la infección de campo. En bovinos infectados se ha observado una respuesta mucho menor a Ig G2 que de Ig G1. Es interesante notar que la Ig G2 es el único isotipo de anticuerpo que son efectivos como anticuerpos dependientes de la citotoxicidad celular. Es posible que la respuesta disminuyeran las Ig G2 y de por resultado la cíclica respuesta observada. La ausencia de las Ig G1 causa la respuesta cíclica de las Ig M. Las Ig G1 hace un feed back con las Ig M y la Ig G2 hace un feed back con la Ig G1; todo este cuadro explicaría el porque de la respuesta cíclica detectada por FC (50) .

Por el método de ELISA a los 5 días post vacunación aparecen los 4 isotipos de anticuerpos. Ig M tiene un pico alrededor del mes y la actividad declina hasta los 4 meses. Ig G1, presenta el pico más tarde, alrededor de los 2 meses y declina hasta los 5 meses; hay un 2º pico, más pequeño, alrededor de los 8 meses. La Ig G2 presenta un pico mucho menor, ubicándose alrededor del mes 4, declinando hasta los 10 meses. La Ig A es mucho menor y no es detectable alrededor del 6º mes. Una vacuna como la cepa 19 obtiene una respuesta humoral relativamente corta, pero es evidente que las respuestas inmunes anormales pueden ocurrir, esto se puede deber a una infección persistente con la cepa vacunal, la que se debe a la incapacidad para deshacerse el animal de este tipo de estímulo antigénico. Este tipo de respuesta, quizás infrecuente, causa problemas en el diagnóstico serológico y en el animal presenta problemas de salud.

2.12.3.1 Vacuna cepa 19 Dosis Reducida

El uso de la vacuna contra la Brucelosis a Dosis Reducida (DR) traería aparejado una mejora en los métodos de diagnósticos, ya que los anticuerpos post vacunales tendrían una menor duración.

Campero et al (49) trabajaron con terneras de 6 meses de edad, haciendo 2 lotes; a uno le aplicaron la dosis reducida (DR) y al otro, testigo la dosis total (DT). La DR constaba de $0,8 \times 10^9$ células viables contenidas en 2 ml. de diluyente; la DT constaba de 83×10^9 células en 5 ml. de diluyente. En el lote vacunado con DR todos los animales fueron serológicamente negativos a RB a los 2 meses P.V.; SAT a 1 1/2 mes P.V.; FC a los 3 meses

P.V.; 2-ME 2 1/2 meses P.V. y Riv. a los 2 meses P.V.. En el lote control (DT), las terneras se hicieron serológicamente negativas para RB y FC a los 3 1/2 meses; SAT a los 5 meses de la vacunación; 2-ME a los 7 meses P.V. y Riv. a los 3 meses de la vacunación. En todas las pruebas serológicas realizadas se observó una tendencia a una menor persistencia de títulos en el tiempo para las terneras vacunadas con la DR con respecto a las vacunadas con la DT.

En el trabajo anteriormente citado, se deja establecido que la inmunidad contra la *Brucella* es del tipo celular. Se establece, por otra parte, que la inmunidad humoral no tiene correlación directa con el grado de protección. Hembras vacunadas cuando son terneras con cepa 19, no guardan correlación entre los títulos serológicos medidos por SAT y la IMC evaluada por la prueba "in vitro" de estimulación linfocitaria. La vacunación con DR necesitaría de una revacunación a los 12 meses de la primera dosis; si la ternera es vacunada al mes de vida con cepa 19, se hace un replique a los 12 meses de vida con DR.

Esta vacuna DR protege efectivamente contra el aborto. Los efectos protectores son superados por una dosis creciente de la cepa 2308. Un aumento en la dosis de bacterias virulentas, hace que aumente el porcentaje de animales que presentan abortos, en los animales vacunados con la DT y en los no vacunados.

Beckett et al(109) determinaron que puede existir una infección persistente con la cepa 19 y los títulos residuales en suero y leche; y estos títulos eran provenientes de una vacunación hecha en el animal adulto con la DR. Sin embargo esto no ha sido considerado como inconveniente o interferencias en el test subsiguiente. En contraste, la presencia de títulos de FC 1:8 (después de los 3 meses de la vacunación) había resultado en la condenación del 16% del ganado vacunado. La vacunación de terneras con cepa 19 tiene por efecto hacer disminuir significativamente la proporción de animales que exhiben títulos persistentes a FC siguientes a la vacunación de adultos. Sumado a esto, los títulos persistentes a FC en ganado vacunado de terneras fueron menores que en ganado no vacunado de terneras. Presumiblemente, la mayoría de los animales reaccionantes de terneras poseía inmunidad suficiente para prevenir una infección persistente con cepa 19. Se ha reconocido por mucho tiempo que la vacunación de ganado en la preñez tardía con cepa 19 puede causar algunos abortos. Debido que la replicación de la brucela es necesario para el desarrollo de la inmunidad, no hay razón para esperar que las DR de la cepa 19 se comporten de forma diferente a las dosis normales. A este respecto, se establece que los abortos post vacunación producidos por la cepa 19 ocurren de manera poco frecuente.

Mientras que la cepa 19 es una de las pocas cepas de *Brucella abortus* que es inhibida por la presencia abundante del eritritol que se encuentra en los úteros preñados, hay cepas mutantes, tolerantes al eritritol que se pueden hallar en cultivos de cepa 19. Probablemente la colonización de úteros preñados por estas mutantes originaria los abortos. Esta suposición es sostenida por el aislamiento de las mutantes en fetos y tejidos provenientes de abortos(104)(110)(111).

Mientras que la vacunación con cepa 19 puede proveer una alternativa posible para el saneamiento de los rebaños problema, los resultados presentados aquí indican que no deberían ser usados en rebaños no infectados, pues las reacciones serológicas persistentes y los exámenes de leche podrán frustrar la detección temprana de la brucelosis. Se cree que la vacunación con cepa 19 debería ser restringida a rebaños, en los cuales hay una parte sustancial de ganado no vacunado previamente y en los cuales el contagio activo de brucelosis se está desarrollando. Los beneficios anticipados deben ser evaluados con las posibles pérdidas resultantes de abortos inducidos por la vacunación y la eliminación de reactores persistentes. Las pérdidas por estos abortos podrán ser evitadas no vacunando las hembras preñadas. Sin embargo, los beneficios de la vacunación contrapuestos a la dispersión activa de la infección, en términos de ganado protegido, pueden ser más beneficiosos que las posibles pérdidas debidas a la vacunación. La vacunación con dosis reducida de cepa 19 puede, por lo tanto, ser una herramienta práctica y económica para tratar problemas de brucelosis severos o potencialmente severos.

Para Crawford et al (110) la vacunación de hembras adultas induce la protección contra cepas patógenas de *Brucella abortus*, existe un período de la preñez, entre los días 190 y 253, en el cual hay algo de inmunosupresión. Hay poca diferencia en la respuesta inmune entre las vacas vacunadas cuando no están preñadas con las que están preñadas. En estudios recientes se indica que la gran incidencia acumulada observada, en vacas lecheras vacunadas, puede deberse al gran riesgo de inducir reactores con la cepa 19, si son vacunadas en el 2º trimestre y la baja eficacia de esta cepa si las vacas son vacunadas en el tercer trimestre. Los resultados de esta investigación soportan la hipótesis que el estado de gestación en el momento de la vacunación puede afectar la protección a la brucelosis o la eficacia de la cepa 19, en vacas vacunadas con una DR y por lo tanto podría ser una manera de explicar la variación en la protección, dada por la cepa 19.

Cuando una vaca vacunada con la cepa 19 se enfrenta con una gran dosis desafío de *Brucella abortus* patógena, aumenta el porcentaje de aislamientos en esas vacas vacunadas con el mayor tiempo de la preñez. Existe una relación positiva entre los días de gestación y el desarrollo de brucelosis en los animales vacunados. La infección se desarrolla más prematuramente en vaquillonas (terneras) que en vacas. Esta asociación puede ser esperada, en tanto y en cuanto, el parto prematuro (aborto) sea el signo clínico que caracterice a la brucelosis. Los días de gestación en la exposición de la vaquillonas y vacas con la cepa 19 aumenta, la proporción de las primeras que fueron infectadas fue mayor, especialmente en aquellas que fueron vacunadas con dosis reducida, por lo tanto

los días de gestación en la exposición es una variable importante que se debería considerar y controlar cuando la protección de las hembras vacunadas es testada y discutida(111) .

Para González Tomé et al(112) no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los animales vacunados de joven y los revacunados de adulto con la cepa 19, pero en dosis reducida. Tal afirmación, se basa en que el porcentaje de preñez fue similar en los 2 lotes: no hubo abortos atribuibles a brucelosis, los animales reactivos a las pruebas serológicas fueron eliminados en 12 meses del campo; por lo que se determinó que no hubo diferencias de incidencia entre revacunados y testigos.

Se ha estudiado que la vacunación de terneras con la cepa 19, da por resultado, que el 100% de las mismas sean reaccionantes antes de los 30 días siguientes de la vacunación. Cuando la erradicación de la enfermedad ha progresado, los reaccionantes persistentes se tornan en un problema que va en aumento. El cese de la vacunación, sin embargo, puede producir en la población bovina, un aumento en el nivel de susceptibilidad a la infección por brucela y puede tornar peligroso una infección recurrente.

Se sugiere que el problema de los títulos persistentes en vacas vacunadas de adultas con la cepa 19 puede ser mitigado con una reducción en el número de bacterias en la dosis de vacuna y que esto puede ser hecho sin afectar el grado resultante de resistencia a la enfermedad.

En todos los estadios de la preñez con dosis normales, los abortos pueden ocurrir en menos del 1% de las vacas y en 700 vacas lactantes vacunadas 2 ó 3 meses previos, menos del 2% excretaban cepa 19 por leche. Una reducción de la dosis en 1/400 pareció subsanar los inconvenientes causados por la persistencia de la infección por cepa 19. La resistencia es semejante en las vacunadas cuando adultas que cuando terneras al mismo desaffo(113) .

La respuesta serológica a la vacuna en dosis reducidas fue normal y no hubo interferencia con la preñez. La inmunidad conferida con las dosis reducidas fue apreciablemente mayor que aquella resultante de la vacunación a vaquillonas con las dosis normales con la cepa 19.

Ante un desafío excepcionalmente alto la inmunidad inducida debe ser considerada como satisfactoria. Fue mejor que con aquella dada por la vacunación convencional a vaquillonas con cepa 19, pero no tan buena como aquella resultante de administrar la dosis reducida a vacas preñadas.

La inmunidad producida por la vacunación con cepa 19 es mejor cuando el ganado es vacunado siendo adulto que cuando es vacunado de ternera.

Se sugiere que la restricción de vacunar terneras menores de 6 u 8 meses puede ser aconsejada y esa consideración puede ser dada por el uso de una dosis reducida de cepa 19 en ganado mayor (más de 18 meses) cuando se confronta a un brote de brucelosis en ganado previamente no vacunado o parcialmente vacunado(114)(115) .

En 1.977, los "Métodos Uniformes Recomendados" y las "Reglas para la Erradicación de la Brucelosis" fueron enmendadas para reconocer la vacunación de ganado adulto con dosis reducida de una vacuna de cepa 19. La eficacia de la cepa 19 en el ganado adulto esta bien documentada. Sin embargo, hasta recientemente, su uso en adultos había sido prohibida debido a los problemas con los títulos de aglutinación que complican el diagnóstico de brucelosis. Estos problemas han sido reducidos a niveles mínimos a través del uso de dosis reducidas de la vacuna de cepa 19 y tests serológicos más específicos.

Estudios hechos en Florida verificaron trabajos anteriores, los cuales concluían que la protección resultante de dosis reducidas de la vacuna cepa 19, fue relativamente la misma que aquella obtenida a partir de la dosis completa. En 1.952, se concluyó que no había diferencias en la protección de dosis administradas subcutáneamente entre 0,25 ml. y 5 ml.. Más tarde se reportó que no existían diferencias significativas en cuanto a la protección con dosis más pequeñas.

Investigaciones hechas anteriormente habían concluido que la rapidez de la "seroconversión" a estado negativo luego de la vacunación con la cepa 19 estaba inversamente relacionado con la edad y estado de la preñez en el momento de la vacunación.

Rebaños infectados de brucelosis que son difíciles de limpiar o que tienen alto porcentaje de animales infectados son llamados "rebaños problemas". Para poder manejar el problema de los títulos residuales en vacas adultas, pruebas distintas a los tests de RB o de aglutinación son necesarios. Concurrentemente con un aumento en la aparición de rebaños con problemas no tratados, el test de precipitación con Rivanol y el test de FC, fueron desarrollados o adaptados para el diagnóstico de la brucelosis.

Siendo mucho más específicos que los tests estándares de aglutinación, su uso minimiza los problemas experimentados anteriormente con los títulos aglutinantes que persistían, como resultado de la vacunación.

En 1.975 se realizaron estudios de campo cuyas conclusiones fueron las siguientes:

- 1) La vacunación con cepa 19 de ganado adulto podría ser una herramienta práctica y útil en rebaños problema
- 2) Los problemas de diagnóstico podrían ser eliminados en gran medida, usando vacunas con dosis reducidas de cepa 19 y también con procedimientos complementarios.
- 3) Los tests de Rivanol y FC, fueron los mejores tests para detectar las seroaglutininas resultantes de la vacunación de adultos.

4) Hubo más del 80% de reducción en pérdidas de animales reactivos por mes, cuando las pérdidas pre vacunación fueron comparadas con aquellos 9 meses después de la vacunación.

5) El problema de abortos post vacunales y la infección persistente en las ubres por la inoculación de la cepa 19 serían mínimos. Los criterios de selección de rebaños para efectuar la vacunación de animales adultos, está a menudo basado en el síndrome del rebaño problema del cual hay 2 tipos básicos:

a) los rebaños infectados en estado "crónico", del tipo que inicialmente señalaban la necesidad de la vacunación de adultos y son a menudo rebaños lecheros de más de 200 animales,

b) el rebaño infectado en estado "agudo" que tiene abortos y contagio rápido de la enfermedad, con alta y potencial exposición en el curso del brote. El dosaje y forma de administración para la vacunación de adultos es $1-3 \times 10^9$ bacterias administradas subcutáneamente.

Los abortos ocasionales pueden ocurrir en ganado vacunado en tanto y en cuanto, la brucelosis permanezca en el rebaño. Abortos después de la vacunación debidos a la cepa 19 ocurren infrecuentemente y la mayoría de los rebaños son vacunados sin tener en cuenta el estado de la preñez. Mediante el uso de la FC y los tests de Rivanol, el problema de los títulos residuales en adultos que habían sido vacunados de terneras, no parece ser apreciablemente mayor que en animales no vacunados previamente.

Se concuerda, que la administración de vacuna cepa 19 no altera el curso de la brucelosis en animales recién expuestos a una dosis infectante al momento de la vacunación. La exposición antes de la vacunación contribuye al desarrollo y contagio de la enfermedad durante varias semanas siguientes a la vacunación de adultos.

Las principales ventajas de la vacunación de adultos son:

- 1) Provee una nueva herramienta de control para usar en rebaños seleccionados, que de otro modo sufrirían pérdidas prohibitivas por la brucelosis,
- 2) Provee un medio para elevar la resistencia promedio en rebaños infectados contra la brucelosis,
- 3) Reduce, en muchos casos, el número de tests requeridos para eliminar la brucelosis de rebaños infectados,
- 4) Reduce las pérdidas por la eliminación de animales reactivos en rebaños infectados, particularmente, cuando se combinan vacunación con buen manejo.

Las desventajas principales son:

- 1) Los títulos residuales de la vacunación.
- 2) Resultados positivos persistentes de brucelosis en rebaños lecheros siguiendo una aparente eliminación de cepas de campo en un pequeño porcentaje de adultos vacunados.
- 3) El estigma ligado a los adultos vacunados que los identifica con rebaños infectados, aunque la brucelosis haya sido eliminada y el rebaño liberado de la cuarentena(115) .

La vacuna que ha sido importante en el control de la brucelosis es la vacuna con la cepa 19. La vacuna cepa 19 cuando se introdujo por primera vez contenía una dosis standard de, aproximadamente, 5×10^{10} UFC. Desde mediados de los años 80, vacunas con dosis reducidas (3×10^9 a 1×10^{10} UFC) han sido recomendadas como un medio para reducir los anticuerpos séricos post vacunales, reducir otras reacciones post vacunación y elevar la edad de vacunación de terneras de 4-12 meses.

La vacunación de ganado adulto con dosis normales de *Brucella abortus* cepa 19 ha sido largamente practicada en programas de control de brucelosis. Sin embargo, la vacunación de animales adultos se asocia con la presencia de anticuerpos persistentes en el suero, los cuales pueden interferir con la interpretación correcta y el diagnóstico utilizando técnicas oficiales. La vacunación de ganado adulto con dosis reducida de la cepa 19 no ha aliviado este problema. Si el ganado vacunado con dosis reducida esta preñado en el primer o en la primera parte del segundo trimestre de la gestación, están expuestos a un riesgo mayor de ser positivos en los tests oficiales para detectar la brucelosis. Se ha publicado, en 1.986, que la cepa 19 puede producir una infección permanente en toros similar a la enfermedad natural y la vacunación no se recomienda (13)

El mayor cuestionamiento de vacunar animales adultos con la cepa 19 son la persistencia y frecuencia de la infección en la ubre con el agente de la vacuna. Usualmente causa títulos en el suero sanguíneo y leche; y si no está culturalmente diferenciado puede resultar en la clasificación de vacas vacunadas como infectadas con cepas de campo. La frecuencia de infecciones de cepa 19, luego de la vacunación de ganado adulto, ha sido estudiados por diversos autores. Poco se ha informado sobre la persistencia de la cepa 19 en la ubre de ganado vacunado como adulto.

El mayor porcentaje de eliminadores de la cepa 19 fue encontrado entre ganado vacunado por la vía conjuntival. No se hicieron aislamientos del ganado que fue vacunado intra dérmicamente. La dosis reducida administrada subcutáneamente disminuyó la probabilidad de infección en la ubre, cuando se la comparó con la dosis normal (0,45% contra 0,83%). El porcentaje de eliminación entre todo el ganado fue de 0,53% y entre ganado seropositivo y cultivo positivo fue del 5,6%.

Basado en los descubrimientos serológicos y bacteriológicos, el porcentaje de recuperación de infecciones con la cepa 19 pareció ser, aproximadamente, el 40% por 6 meses, el 65% por 12 meses y el 80% por 18 meses después del aislamiento original.

El uso de la cepa 19 en ganado adulto ha resultado en grandes reducciones de brucelosis en rebaños infectados y es a menudo necesario para controlar la brucelosis.

Se ha confirmado que la prevalencia de infecciones con la cepa 19 es baja y a menudo no es permanente. La prevalencia fue más baja entre ganado que había sido vacunado con la dosis reducida por vía subcutánea que entre aquellos que lo habían sido con las dosis normal.

La influencia de la gestación o lactancia sobre infecciones temporarias o permanentes con cepa 19 permanece desconocida, pero los datos sugieren que no hay ningún aumento de la susceptibilidad frente a la enfermedad. 11 vacas infectadas con la cepa 19 fueron repetidamente estudiadas y se encontró que casi todas fueron Rivanol positivas y eliminaban en forma crónica y de manera intermitente. Estos estudios enfatizan la utilidad de exámenes bacteriológicos para el diagnóstico de la infección por brucelas. El ganado infectado por la cepa 19 puede ser identificado y retenido para posterior venta o mayor producción de leche. Muchas de estas infecciones son temporarias. La determinación de biotipos de cepas de campo es a veces útil en investigaciones epidemiológicas(118).

2.12.4 Vacuna Melitensis Rev 1

El aislamiento de esta cepa fue realizado en 1.953 y esta cepa es no dependiente de la estreptomicina. La cepa Rev 1 se ha usado con éxito para prevenir la brucelosis en distintas especies animales, principalmente cabras y ovejas.

Se obtuvieron resultados prometedores en bovinos. En trabajos en los cuales a los bovinos vacunados con esta cepa se los sometió a un desafío con una descarga de bacterias muy alta y el resultado observado fue que la vacuna Rev 1 es un inmunógeno superior a la cepa 19 frente a la infección por *Brucella abortus*(1).

En 1.957 se comunicaron los resultados obtenidos con una vacuna preparada con *Brucella melitensis* atenuada. Trabajos realizados en Israel e Irán han demostrado que la vacuna Rev 1 es un buen agente inmunógeno para prevenir el aborto y la infección de caprinos y ovinos. En estos animales los resultados son superiores a los obtenidos con la cepa 19.

Aunque se cree que el poder inmunizante de la vacuna Rev 1 es superior al de la cepa 19, su uso en otras especies animales no ha pasado de la fase experimental, debido a que la virulencia de esta cepa es también superior. En el hombre, esta vacuna produce la enfermedad aguda, en la mayoría de los casos, cuando se inocula por vía subcutánea(97)

La vacuna *Brucella melitensis* Rev 1 ha sido estudiada y usada exitosamente en muchos países y se considera como la vacuna de referencia recomendada contra la brucelosis ovina y caprina. Puede, sin embargo, inducir respuestas serológicas de largo alcance y causar el aborto en ovejas preñadas; ambas dificultades pueden ser reducidas por la administración conjuntival. Esta vacuna puede sufrir cambios genéticos si no es mantenida apropiadamente (119).

Ni la cepa 19 ni la Rev 1 han dado buena protección contra una dosis desafío de 109 células viables, se sometió a 2 lotes de vacas, uno vacunado con cada vacuna y se observó una diferencia entre grupos de animales. Todas las vacas vacunadas con la cepa 19 abortaron y fueron encontradas infectadas, mientras que de 8 vacunadas con Rev 1, cuatro abortaron, dos fueron infectadas levemente y dos fueron completamente negativas. Los resultados presentes sugieren que la dosis desafío de 109 células de *Brucella abortus* 2308 (virulenta) es probablemente demasiado severa para evaluar la calidad de una vacuna, porque en este experimento todas las vacas vacunadas con cepa 19 se infectaron y abortaron.

La mayoría de las conclusiones concuerdan en que una dosis de Rev 1 (3 x 10⁹ células) produce un grado mas elevado de inmunidad que 60 x 10⁹ células de cepa 19.

En los animales vacunados con Rev 1, la respuesta serológicas es más baja y las reacciones post vacunación desaparecen mas rápidamente que en aquellos vacunados con cepa 19. Consecuentemente, el uso de la vacuna Rev 1 para la inmunización de terneras reduciría la interferencia en las actividades de diagnóstico en programas de erradicación.

Debido a la inmunidad mas elevada que confiere y las pocas reacciones post vacunación, esta vacuna puede ofrecer promisorios resultados en el control de la brucelosis en el ganado. Un programa piloto seria deseable para una mayor evaluación bajo condiciones de campo(117).

2.12.5 Vacuna M

Esta vacuna contiene una cepa mucoide que no estimula la producción de aglutininas, pero tiene propiedades inmunogénicas. Huddleson demostró en múltiples experimentos que variantes mucoides de *Brucella abortus*, *melitensis* y *suis* no producen aglutininas o solo muy bajos niveles, mientras que estimulaban la inmunidad frente a cepas virulentas. La protección que brinda es pobre y siempre inferior a la de la cepa 19 (1).

2.12.6 Vacuna *Brucella suis* (S2)

Esta vacuna es originaria de China. En 1.958 se comprobó que una cepa de *Brucella suis* aislada de un aborto años antes (1.953) y mantenida por cultivos seriados en medios artificiales, había perdido mucha de su virulencia manteniendo sus propiedades inmunogénicas. Capaz de prevenir la infección por *Brucella abortus* en el ganado bovino, lo mismo que la infección por *Brucella melitensis* en las cabras y ovejas incluyendo la infección por *Brucella suis* en el cerdo. Esta vacuna se puede administrar por vía oral y parenteral. Puede ocasionar reacciones locales (subcutánea o intramuscular). Por vía oral no tiene efectos adversos. La cepa es de crecimiento rápido y fácil.

La inmunidad es semejante a la obtenida por la cepa 19 y Rev 1 y en algunos casos superior.

La dosis para administrar a los caprinos es de 10×10^9 células y a los bovinos 25-50x109 células.

Ensayos tendientes a exaltar la virulencia de la cepa S2 han sido negativos. Tampoco se ha demostrado que se elimine por leche en condiciones normales; se supone que si se eliminase por leche la importancia sería mínima(1) .

Esta vacuna es usada ampliamente en China desde 1.971 y la eficacia para prevenir la brucelosis en el campo es evidente. Se producen entre 30 y 40 millones de dosis por año. Esta cepa mantiene las características de *Brucella suis* biotipo 1 y es lisa. La virulencia de la cepa es semejante a la de la cepa 19 pero mucho menor que otras cepas de campo de *Brucella suis*. La inoculación subcutánea en cerdas preñadas con 50×10^9 células vivas de S2 no causaron el aborto, no infectaron a la parturienta así como, la inoculación con 5×10^4 - 15×10^4 células de una cepa de campo virulenta de *Brucella suis* sí lo hizo.

La propiedad avirulenta de la cepa S2 es muy estable cuando se inocular a los animales susceptibles.

Es un efectivo inmunógeno capaz de desarrollar una inmunidad efectiva a cobayos y cabras. La S2 confiere una mayor protección contra la infección de *Brucella melitensis* que la cepa 19.

La S2 es capaz de estimular la producción de títulos de aglutininas séricas en un rango entre 1/100 - 1/400 en ovejas y cabras. Después de instilar la vacuna directamente en la cavidad oral o ser administrada en el agua de bebida, la S2 penetra a los linfonódulos y órganos internos para desarrollar inmunidad protectora contra las infección brucelar.

Después de varios experimentos, es claro, que para ovinos y caprinos 5×10^9 células vivas es suficiente para producir una inmunidad sólida. En la práctica, la dosis de rutina es 10×10^9 . Para bovinos la dosis de rutina es de 50×10^9 y para cerdos dos dosis de 20×10^9 células, cada una separadas por un intervalo de 2 ó 3 meses.

La vacunación de grandes majadas de ovinos y caprinos con S2 por vía oral (agua de bebida) es posible y efectiva.

La inmunidad inducida en corderos, los cuales han recibido una dosis oral de S2 en la edad de 4 a 6 meses puede durar 4 a 5 años. Se demostró que una revacunación no prolonga la duración de la inmunidad.

Los títulos serológicos producidos después de la vacunación oral con S2 son bajos y de corta duración, a los 9 meses post vacunación, ambas aglutininas y los anticuerpos fijadores de complemento han desaparecido completamente. Si se realiza la vacunación de corderos con S2, las majadas constituidas por animales jóvenes y maduros pueden quedar limpias de brucelosis y de reactores serológicos.

La vacuna S2 cuando se inyecta por las vías subcutánea o intramuscular a cabras u ovejas preñadas puede ser causa de abortos pero si se administra oralmente no lo produce; en las vacas en lactación no produce disminución en la producción.

Puede ser usada en una vacunación de emergencia en rebaños o majadas en los cuales los abortos por brucelosis ocurren repentinamente y la dispersión de la enfermedad es muy rápida. Durante un brote de abortos por brucelas muchos de los animales del rebaño o majada están preñados. En este estado, la vacunación de emergencia con una vacuna viva por vía subcutánea o intramuscular puede causar en algún animal un aborto o disminución de la producción láctea, mientras que la administración oral no perjudica a los animales.

Con la administración oral (agua de bebida) la dosificación de la vacuna no puede ser estrictamente controlada. En lugares semiáridos, la vacunación de cabras y ovejas con S2 se realiza diluyendo el volumen de la vacuna requerido por el total del rebaño dentro del agua de bebida y permitiendo a todos los animales del rebaño beber el agua, sin separar los animales preñados y ni los serológicamente reactivos. En áreas donde el agua y el pasto son abundantes, la vacunación se lleva a cabo a menudo colocando la vacuna directamente en la cavidad oral de cada animal. En rebaños infectados, siguiendo la vacunación de todos los ovinos y caprinos con S2, bien en el agua de bebida o colocando la vacuna en la cavidad oral una vez al año, por tres o cuatro años la brucelosis puede ser eliminada exitosamente. Con la disminución de la enfermedad en los animales se consigue la merma de esta en los seres humanos.

Es evidente que las combinación de la vacunación oral con tests diagnósticos y plan sanitario es muy efectivo y ofrece un rápido método para la erradicación de la brucelosis en tambos (120)

La protección inducida por S2 contra el desafío de 3 cepas fue igual a la obtenida por la Rev 1 o la cepa 19 en el corto término. Esta declinó, con el tiempo cuando fue testeada con una cepa virulenta de *Brucella melitensis*. Desde que la vacunación con S2 es usada para proteger de la infección con *Brucella melitensis*, una revacunación puede ser necesaria para mantener un nivel suficiente de inmunidad en la práctica. En efecto, en

China, la inmunidad testeada en ovejas preñadas decrece significativamente con el tiempo. La cantidad y nivel de inmunidad ha sido comparada entre la Rev 1 y S2 en ovejas y de ello se concluye que la S2 puede ser recomendada en lugar de la Rev 1. La baja persistencia de la inmunidad inducida por S2 contra el desafío heterólogo de H38, en contraste, con otros tests de inmunidad; con otras combinaciones de heterólogos, puede deberse a la corta supervivencia de la cepa vacunal dentro de los linfonódulos. Una estimulación del sistema inmune puede ser corta, también, podría ser la inducción en la producción de anticuerpos contra el antígeno menor M de la cepa y/o por la estimulación de una memoria inmune celular de largo tiempo. Por ello, antes de considerar una comparación directa entre S2 y Rev 1 en ovejas, se debe hacer un estudio profundo sobre la persistencia de la S2 en los órganos linfoides de estos animales, para poder predecir si es necesario una revacunación(121) .

2.12.7 Vacuna H-38

Es una vacuna con bacterias muertas, con una fase lisa de *Brucella melitensis* 53 H-38, suspendida en un adyuvante oleoso.

Esta vacuna H-38 fue descrita por Renoux en 1.957 y fue ensayada por primera vez en diferentes especies animales, para bovinos el uso de H-38 ha quedado limitado a trabajos experimentales. Los ovinos y caprinos se han vacunado a campo. De todas las vacunas con cepas muertas la que mayor inmunidad brinda por ser una cepa lisa, estimulando altos niveles de anticuerpos que interfieren en el diagnóstico. Otro problema que acarrea es que en el lugar de la inoculación se pueden producir inflamaciones.

Esta vacuna produce un grado de inmunidad no tan alto, la cual se aumenta si se aumenta el número de gérmenes y la adición de un adyuvante. Buena para pequeños rumiantes(1)(98) .

2.12.8 Vacuna 45/20

Esta vacuna contiene una cepa rugosa de baja virulencia; la cepa está muerta por calor y suspendida en un adyuvante oleoso.

Los efectos de esta vacuna son contradictorios. Las reacciones locales en el punto de inoculación son muy intensas y no protege contra el aborto.

La principal ventaja es no producir aglutininas en el suero de los animales vacunados (no se puede decir que sea "no aglutinogénica" por completo). El estímulo a los anticuerpos fijadores del complemento es superior al de la cepa 19 y la prueba del Anillo en Leche da siempre negativa con el uso de esta vacuna.

El poder inmunogénico es producido por la naturaleza del adyuvante.

Se aconseja la vacunación de animales mayores de 6 meses de edad y una revacunación, por vía intramuscular, a los 3 meses, pero la protección obtenida no es semejante a la brindada por la cepa 19(1)(98) ; para otros autores la protección es muy semejante.

Esta vacuna se ha usado para disminuir el riesgo de infección en el ganado adulto e incrementar los títulos a la FC, este aumento de los títulos de FC por esta vacuna se la conoce como "test anamnésico". La desventaja del uso de esta vacuna es que produce reacciones serológicas en los tests de FC estándares, que no pueden distinguirse de aquellas provenientes de una infección normal o por la vacunación con la cepa 19.

Donde las dificultades para reducir la prevalencia de la brucelosis, por la imposibilidad de realizar análisis de sangre periódicos, es altamente deseable eliminar la mayor cantidad de animales infectados con el mínimo número de sangrías; un método que se ha usado para permitir que el ganado infectado, pero serológicamente negativo y ganado sospechoso sea detectado, es el sangrado del animal, vacunarlos con 45/20 y sangrar nuevamente 6 semanas más tarde. La utilidad de este procedimiento en la erradicación, particularmente, si el título positivo mínimo es elevado, así necesita ser confirmado. Se ha señalado que el método no diferencia entre animales infectados normalmente y aquellos que han sido vacunados con la cepa 19.

Si los animales no han sido expuestos a *Brucella abortus* atenuada, la inyección de la vacuna 45/20 resulta en títulos bajos o negativos con relación al estándar de FC, pero con títulos bastante altos en relación al antígeno 45/20.

La diferenciación de títulos debido a la vacuna 45/20 e infección natural puede ser importante cuando el uso de la vacuna 45/20 y de antígenos estándares pueden permitir la diferenciación de los animales vacunados de los animales infectados en estas instancias. En la mayoría de las veces los títulos de 45/20 son 4 veces más altos que los títulos estándares de FC y el título estándar de FC se convierte en negativo más rápidamente que el título 45/20. El anticuerpo detectado, en los animales revacunados, fue Ig G usando la FC para 45/20(122)

La bacterina 45/20 se ha usado como un inmunógeno efectivo para la prevención de infecciones de bazo en chanchitos de la India (*Cavia porcellus*), cuando es combinada con un adyuvante en emulsión al 1% en aceite mineral. Estudios subsiguientes demostraron que esta bacterina fue tan efectiva como la vacuna cepa 19 en los mismos animales. Si es efectiva en el ganado, el uso de la bacterina ofrecería muchas ventajas sobre la vacuna cepa 19. La falta de antígenos somáticos, asociados con los lipopolisacáridos de esta cepa mutante haría que los tests serológicos sean más significativos, porque las aglutininas no son inducidas por esta vacunación. Por lo tanto, ganado de cualquier edad podría ser vacunado sin tener títulos persistentes. El costo de mantener rebaños

resistentes a la enfermedad podría ser reducido por la administración de esta vacuna por el dueño de los animales. La "Fiebre ondulante" en los seres humanos por inyección accidental de la cepa 19 también sería eliminada.

La eficacia de las bacterinas con la cepa 45/20 comercial es variable, aunque han sido usadas en algunos países durante un número de años. Los porcentajes de protección informados difieren, pero muchos estudios han demostrado que estas bacterinas son menos eficaces que la cepa 19. Otro tema de importancia es la respuesta alérgica al contenido de aceites de estas emulsiones. La presencia de abscesos y reacciones granulomatosas son comunes, la necesidad de revacunación para mantener la protección adecuada, también limita un adecuado programa de control.

El fracaso experimental de la bacterina 45/20 para inducir adecuada protección al aborto o a la infección, probablemente, resultó por una dosis excesiva de la dosis desafío o de una reexposición muy fuerte de los animales que abortaron.

La presencia de Hipersensibilidad Retardada en la mayor cantidad de ganado al cual se le administró la bacterina 45/20 es evidente por la presencia de linfocitos T sensibilizados. Sin embargo, la reacción en piel no podría ser correlacionada con la resistencia adquirida de base celular. Este descubrimiento sostiene que la Hipersensibilidad Retardada es solo una faceta de la respuesta inmune mediada por células y a menudo no puede ser considerada como inmunidad. Por el contrario, con la bacterina 45/20, 2 inyecciones fueron administradas al ganado para inducir la respuesta inmune máxima. Una revacunación para proteger, cuando son obtenidas de firmas comerciales, las cuales contienen suspensiones oleosas. Es posible que las bacterinas usadas por estos estudios contuvieran antígenos inadecuados para una adecuada estimulación, alternativamente, excesivos antígenos en una inyección de revacunación podría haber producido actividades inmunosupresoras.

2.12.9 Vacuna RB51

La cepa RB51 de *Brucella abortus* es una mutante rugosa derivada de la cepa virulenta 2308, obtenida en laboratorio. Esta cepa carece de la mayor parte de la cadena O del LPS que se encuentra en la cepa 19 y en cepas de campo de *Brucella abortus* virulentas. El contenido en la cepa RB51 de la cadena O es reducida, lo que implica que esta vacuna no induce anticuerpos en el ganado vacunado, dando SAT negativos. Por lo tanto, resultados positivos a SAT en ganado vacunado con RB51, indican la ocurrencia de infecciones naturales con *Brucella abortus*.

El ganado vacunado con la cepa RB51 no produce anticuerpos que sean detectados por RB, FC o PCFIA, como ocurre después de la vacunación con la cepa 19. Respuestas de anticuerpos en estos tests fueron medidos después de la vacunación de ganado con RB51 y los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos después de la vacunación con cepa 19(62) .

Todos los animales vacunados con RB51 tuvieron resultados negativos en RB, SAT, FC y PCFIA a las 2,4 y 10 semanas posteriores a la vacunación. Estos resultados indican que el ganado vacunado con RB51 no produce anticuerpos que puedan ser detectados por los tests convencionales que son actualmente usados para el diagnóstico de brucelosis en el ganado. Todos los estudios realizados determinaron que la cepa RB51 no produce anticuerpos detectables por SAT, RB, FC y PCFIA(154) . La falta de respuesta al PCFIA es también importante, porque este procedimiento automatizado puede analizar grandes números de muestras en la determinación (screening) de brucelosis en rebaños. La inhabilidad de esta cepa para la producción de anticuerpos normalmente detectables por otras técnicas se atribuye, probablemente, a que la cantidad del antígeno O de LPS es baja o casi nula. Estudios previos demuestran que esta cepa se elimina más rápido que la cepa 19 cuando es inoculada en igual concentraciones de bacterias. Esta posibilidad parece diferir, por que las vacas que han sido vacunadas con la cepa RB51 con adyuvante de Freund también pueden fallar en la producción de anticuerpos contra la cadena O de LPS. Sumado a esto, las vacas vacunadas con RB51 con concentración semejante de bacterias, que animales vacunados con la cepa 19, han resultado protegidas del aborto frente a una descarga con cepa 2308 y tienen una respuesta inmune mediada por células similar a lo que ocurre en los animales vacunados con la segunda vacuna. Por lo tanto, a pesar de su corta persistencia, la cepa es antigénica porque induce una respuesta mediada por células y una inmunidad protectora contra la cepa 2308.

Por todo lo aquí expuesto, esta vacuna sería una buena candidata para ser el reemplazo de la cepa 19 en la prevención de la brucelosis bovina y un aumento en la eficiencia en la identificación de los métodos serológicos y la remoción de los animales infectados de los rebaños.

Samartino y colaboradores(155) realizaron un estudio con esta cepa para determinar si la misma se transmite por cohabitación siendo negativo el resultado al igual que la cepa 19.

2.12.10 Otras vacunas:

* Vacuna PB

* *B. abortus* 7-26; 16/4; cepa 08; 112; cepa 104M; cepa 2; cepa 82; 19/63; 19/58; 4004/1; B-1.

* *B. melitensis* 10/5; H-12.

* *B. suis* 64; cepa 58; cepa 61. (1)

2.13 CONTROL Y ERRADICACIÓN

2.13.1 Erradicación

Se entiende por erradicación la eliminación total del agente causal de una enfermedad, en este caso, la *Brucella abortus*.

Para cualquiera de estas 2 acciones (control y/o erradicación) hay que tener en cuenta: la tasa de prevalencia de la infección, los factores socioeconómicos y culturales de la población; para esto se cuenta con:

- * Pruebas diagnósticas y eliminación de reactores positivos;
- * Vacunación;
- * Combinación de vacunación con eliminación de reactores.

La brucelosis es una enfermedad erradicable, tal como lo demuestran las experiencias de varios países.

El comité de Expertos en Brucelosis de la FAO/OMS determina una serie de puntos a tener en cuenta para iniciar una campaña(123) :

- 1) Conseguir respaldo oficial, al más alto nivel,
- 2) Crear un comité intersectorial,
- 3) Designar un Director para el Programa Nacional,
- 4) Movilizar recursos y asignarle al Programa los que este necesite,
- 5) Revisar las reglamentaciones vigentes,
- 6) Proponer pautas de acción,
- 7) Poner en práctica el programa: con una cobertura, tecnología y recursos humanos apropiados,
- 8) Garantizar el fácil acceso al diagnóstico, provisión de antígenos, vacunas y asesoramiento técnico,
- 9) Garantizar la participación de la comunidad, en especial los ganaderos; sus familias,
- 10) Educación a los veterinarios, mediante cursos, charlas, videos y a los productores por los medios de difusión oral, escritos y audiovisuales.
- 11) Realizar una evaluación periódica.

Para pensar en la erradicación la prevalencia, debe ser aproximadamente, el 3%. Al encarar un plan con este fin, se debe tener en cuenta:

- Tipo de explotación.
- Número de animales en el establecimiento.
- Flujo centrífugo o centrípeto (ventas o compras).
- Organización de los Servicios Veterinarios Oficiales y Privados.
- Existencias de leyes y reglamentaciones sanitarias que apoyen las actividades de erradicación.
- Compensación adecuada a los productores (indemnización directa, compensación por préstamos especiales, etc.).
- Posibilidad de contar con un buen sistema de vigilancia epidemiológica.
- Examen sanitario y apoyo a la comunidad.

En cuanto a la comunidad, el primer beneficiado será el productor agropecuario.

Otro de los pilares debe ser la educación sanitaria:

- Información sobre la enfermedad en los seres humanos y en los animales.
- Lograr una motivación de los ganaderos para que participen.
- Brindar información sobre el riesgo de contraer la enfermedad a: Médicos Veterinarios, matarifes, ordeñadores, etc.).
- Difundir la información de la Vigilancia Epidemiológica para evitar la reinfección una vez que se logre la erradicación.

Los justificativos de la campaña de erradicación pueden ser: sanitarios o económicos.

No solo la enfermedad en el humano, incapacidad física y pérdida de mano de obra, sino también "la grave disminución de alimentos muy necesarios, en especial, proteínas de origen animal, fundamentales para la salud y el bienestar del hombre".

La única forma de definir la verdadera prevalencia es hacer una encuesta estadísticamente significativa. Sin embargo, teniendo en cuenta, que la encuesta solo sirve de base para la acción futura, los gastos involucrados no siempre se justifican. En la mayoría de los casos es posible determinar la prevalencia como una situación inicial de una campaña que se ha puesto en marcha. Hay que utilizar la información disponible para fijar las bases preliminares de la campaña y programas pilotos, lo cual permite aprovechar mejor los recursos disponibles y sirve para el adiestramiento del personal.

La erradicación y/o control se adapta al conocimiento epizootiológico del país(98)

2.13.2 Control

La base de un programa de control es lograr la protección de los animales susceptibles, con el uso de vacunas.

Se debe realizar un muestreo poblacional para determinar la prevalencia de la enfermedad.

Tratar de hacer una vacunación masiva de terneras complementándola con otras medidas.

Desde la primera etapa, se puede estimular la eliminación de reactores positivos y su reemplazo con hembras vacunadas y en el caso de machos sanos (exámenes de semen y serología negativos). Muy importante es el control y registro del sacrificio de los animales positivos, para evitar que la medida sea contraproducente.

Un objetivo a lograr es llegar a tener establecimientos negativos, para luego declararlos libres.

Se debe contar con una vigilancia epidemiológica estricta la cual se realizará, por ejemplo: con PAL y exámenes en matadero.

El fracaso de un plan de control puede producirse, entre otras cosas, por: dificultades en el diagnóstico, en especial cuando se trabaja con animales vacunados; rechazo por parte de los propietarios a la segregación de los reaccionantes; uso de pasturas y comederos comunes; comercio de animales infectados con otro destino distinto a sacrificio; falta de indemnización por sacrificio; falta de legislación.

Logrando el control se puede pensar en un plan de erradicación total de la enfermedad (1)(124) .

El plan de lucha para lograr el control tiene como base;

- Pruebas serológicas sobre muestras representativas, con las que se podrá determinar la situación inicial,
- Protección de la población animal por medio de vacunas eficaces,
- Plan de sustitución paulatino de animales infectados por población protegida
- Medidas complementarias.

Se debe tener en cuenta:

- Estado socioeconómico y cultural del país,
- Censo de la población animal, coexistencia de animales susceptibles,
- Prevalencia de la brucelosis en las distintas especies animales,
- Distribución de zonas infectadas,
- Organización de los Servicios Veterinarios,
- Realidad económica del país y sus posibilidades futuras,
- Tipos de construcciones ganaderas, regímenes de higiene de las mismas,
- Exportación o importación de ganado,
- Costo de un programa de lucha, erradicación o mixto.

Las pruebas de seroaglutinación, PAL y la vacuna cepa 19 son armas suficientes para un plan de lucha(98)(123) .

La evaluación de la marcha de todo programa se puede medir por(124) :

- La reducción del número de abortos, lo que reduce las fuentes de infección
- Número de terneras vacunadas.
- Número de reacciones serológicas.
- Números de casos humanos diagnosticados.

En forma cuantitativa:

- Disminución de la tasa de rebaños infectados.
- Disminución de la tasa general de reaccionantes.
- Número de áreas libres.
- Aumento del número de áreas libres.
- Número de municipios o provincias liberadas.

Para Vasconcellos(21) las posibilidades de actuación profiláctica contra la brucelosis pueden, genéricamente, ser contemplados en los siguientes tópicos:

- 1) A nivel de fuentes de infección: todos los vertebrados que puedan albergar a la brucela y son eliminadores (contaminadores) del medio ambiente
- 2) Vías de transmisión: contemplando todos los mecanismos que los microorganismos pueden utilizar para, a partir de las fuentes de infección, contagiar a un hospedador.
- 3) Susceptibles: todos los nuevos hospederos vertebrados capaces de dar abrigo (por instalación y multiplicación del microorganismo).

2.13.2.1 Medidas Inespecíficas a Nivel de Fuentes de Infección.

Los abortos, las ubres y la orina son fuente de contaminación, eliminando bacterias hasta 15 ó 30 días post parto.

Una vaca que aborta, si no sufre restricciones en el movimiento, elimina y dispersa brucelas por donde ésta se mueva, por ello se debe aislar los animales que han abortado (30 días por lo menos o hasta que se tenga un diagnóstico definitivo). Una mención especial debe hacerse para enfermedades como la Leucosis Viral Bovina, porque si bien la vacunación contra la Brucelosis, con agujas que son usadas en común en varios animales, no dispersaría la enfermedad; el uso de agujas comunes en la extracción de sangre para realizar el diagnóstico serológico si puede transmitir la enfermedad de un animal a otro(125) .

Entre los muchos ejemplos para lograr un establecimiento, área o estado como libre podemos citar los trabajos de Mylrea (126) , González Tomé y col.(130)(131)(132), en los cuales se enumeran las pruebas y métodos usados para tal fin; secuencias de las sangrías; manejo de los reactores y destino de los mismos. En el primer trabajo hace una breve cronología, desde la fecha en que comenzó (estudio de prevalencia por la PAL) hasta el momento en que se declaró libre de brucelosis al territorio del Sur de Nueva Gales transcurrieron 21 años y 18 años de lucha.

García-Carrillo(143) describe el Programa de Erradicación de la Brucelosis en el Estado de California.

Las medidas a tomar ante la presencia de un foco de brucelosis, según Vasconcellos, son 3:

** Sacrificio: se debe aclarar la importancia de esta medida, dando mayor precio a los animales sacrificados, o por medio de incentivos (disminución de impuestos, facilidades para créditos) o alguna otra ventaja a fin de estimular al productor para que ingrese al programa.

** Aislamiento de las fuentes de infección: se deben identificar los animales positivos y negativos, al igual que las crías de vacas positivas (con los consiguientes problemas de manejo) y formar 2 ó más rodeos. Una solución es el aislamiento parcial (medida muy peligrosa). Se debe recordar el contagio intrauterino.

** Tratamiento: no se realiza en animales.

2.13.2.2 Medidas Inespecíficas a Nivel de las Vías de Transmisión

a) Contagio Directo: se actuaría separando rodeos, controlando el semen a usar si se realiza inseminación artificial

b) Contagio Indirecto: se deberá tratar de evitar la ingesta de brucelas (agua de bebida, pasto de potreros donde hay abortos, inseminación artificial).

Por otro lado se debe pensar en todas las medidas higiénicosanitarias para evitar que la brucelosis ingrese al establecimiento, y si ya se halla, evitar que se disperse. Se debe enseñar a los trabajadores rurales el peligro de esta enfermedad y la manera de evitar que se contagien y dispersen las bacterias.

2.13.2.3 Medidas Específicas a Nivel de Susceptibles

La inmunoprofilaxis, nunca debe ser la única medida, siempre debe estar acompañada por un conjunto de medidas. Es más efectiva cuando se realiza como parte de un conjunto de medidas, dentro de un programa que abarque grandes áreas, más que a establecimientos aislados. Lo importante es lograr una buena inmunidad de rodeo, lo que se consigue vacunando el mayor porcentaje de terneras posibles.

Enright et al(129) realizó un estudio para ver como se modificaban los valores de dispersión de la brucelosis entre vacunos, donde los reactores son eliminados y donde los reactores no lo fueron.

Se procedió a la vacunación de todos los animales adultos (más de un año) con 2 a 3x10⁹ UFC de la cepa 19. Los reactores fueron identificados, pero no eliminados, a los 6 meses se les realizó tacto rectal y se procede a la separación del rodeo en reactores y no reactores. Las vacas sin terneros son eliminadas (incluyendo las viejas).

Los animales positivos se encontraron por la realización de las técnicas diagnósticas de RB, Rivanol y FC. En el otro grupo las rectoras fueron inmediatamente separadas del rodeo. La prevalencia inicial, sin la eliminación, es del 3,7%; con la eliminación 16%. No hubo diferencias estadísticamente significativas de nuevas infecciones en los 2 rodeos; los porcentajes de preñez, tampoco difieren significativamente.

La vacuna cepa 19 provee igual protección en los rebaños que retienen sus animales positivos que en los rodeos que no lo hacen. Las reacciones serológicas, realizadas muy seguido, tampoco ofrecerían ningún beneficio. La restricción del movimiento del ganado, al matadero como único destino, puede ser innecesario; en contraste con los productores que mantienen disponibles las vacas y vaquillonas para reemplazo.

Este programa puede ser efectivo en zonas donde los productores puedan mantener sus rodeos aislados o donde todos los rodeos estén infectados y los animales tengan que recorrer largas distancias para la obtención de agua y pasto.

La retención de animales positivos, sólo conviene si los animales son productivamente activos.

Las ventajas de este tipo de manejo son:

- 1) Menor número de tests diagnósticos son necesarios.
- 2) La producción de las vacas es continua.
- 3) La no eliminación de los reactores no hace necesaria la compra de animales de reemplazo para mantener el tamaño del rodeo.

2.14 SALUD PUBLICA

El enfoque que debe hacerse de esta enfermedad tiene que ser poblacional y no individual.

Se define como una antropozoonosis, lo que significa que es transmisible de los animales al hombre(133) .

La definición de zoonosis ha sufrido modificaciones con el tiempo, así por ejemplo:

En 1.950, se dice: "Aquellas enfermedades que se transmiten en forma natural entre los animales vertebrados y el hombre".

En 1.958: "Aquellas enfermedades e infecciones que se transmiten en forma natural entre los animales vertebrados y el hombre".

Actualmente: "Todas aquellas enfermedades e infecciones en que pueden existir relación animal-hombre y viceversa, bien vía directa o a través del medio ambiente, incluidos portadores, reservorios y vectores".

2.14.1 Importancia

La importancia de esta enfermedad en Salud Pública, tiene diferentes aspectos: sanitario (salud), económico y social.

Costo animal: pérdidas que sufren los productores por el contagio de sus animales, decomisos y muertes; como en menor producción.

Costo médico: inversiones que realiza el estado en asistencia hospitalaria, intervención, medicación, etc..

Costo social: disminución en la producción de los trabajadores en función del tiempo de internación, rehabilitación, discapacidad adquirida o la muerte.

La importancia de la brucelosis es, principalmente, económica y social.

2.14.2 Enfoque de riesgo

Se debe identificar los sectores vulnerables por una mayor exposición al riesgo, a partir del cual surgen (al ser los animales domésticos los factores más importantes del contagio), las mayores tasas de incidencia entre las personas que conviven o manejan su producción (productores agropecuarios, personal de mataderos, veterinarios, personal de laboratorio, etc.).

En el reconocimiento en vivo de los animales de abasto, no se comprueban manifestaciones o mayores síntomas de valor diagnóstico presuntivo. Los animales faenados no presentan lesiones características, salvo los estados inflamatorios y pequeños focos en órganos del Sistema Retículo Endotelial y del aparato reproductor.

En esta enfermedad se comprenderá con más facilidad la importancia que tiene un informe oficial previo, efectuado en los establecimientos de producción.

Los animales con brucelosis deben destinarse a conserva, previo expurgo de las posibles lesiones o a decomisos total según las lesiones y más si fuesen extendidas.

La higiene y desinfección del local y del personal son medidas importantes de la profilaxis y deben cumplirse(160) .

El Reino Animal es el reservorio de enfermedades de humano que hace su aparición en función de:

- * Variación de la relación entre el agente causal y el hospedador existente.
- * Desarrollo de medios de comunicación.
- * Rápido aumento de la densidad de la población.
- * Nuevos métodos de producción animal.

Más de 270 millones de habitantes de América Latina corren riesgo frente a más de 50 zoonosis. El 50% de población sufre, por lo menos una enfermedad zoonótica en su vida, siendo las más importantes: brucelosis, tuberculosis bovina, rabia, leptospirosis, encefalitis equina, hidatidosis, cisticercosis y salmonelosis.

2.14.3 Clasificación

La brucelosis, como zoonosis, se puede clasificar de la siguiente manera:

Zoonosis Directa: el contagio debe tener lugar desde un huésped vertebrado hacia otro susceptible.

Zoonosis propiamente dicha: aquellas transmitidas de los animales al hombre y en las que los animales juegan un papel protagónico en la cadena de transmisión.

Desde otro punto de vista el estudio de una zoonosis debe tener en cuenta la ecología de la enfermedad. Existe una profunda relación para el estudio y/o control de una enfermedad: entre el Huésped, Agente y Medio Ambiente, se puede decir que la existencia de una enfermedad es multifactorial.

Para llegar a un Equilibrio Biológico, en las primeras fases de una zoonosis, se denomina: estado enzoótico (los agentes patógenos se van acomodando cada vez más a sus huéspedes específicos y pierde patogenicidad para otras especies).

Estado epidémico: elevados índices de morbimortalidad

Estado de silencio: evolución subclínica y las formas inaparentes son sólo detectables por laboratorio, al desaparecer esta fase puede ocurrir una fase epidémica (que suele ser el resultado de cambios ambientales o reemplazo de la población inmunizada).

Se debe tener en cuenta la presencia de portadores. En brucelosis, se definen así a los sujetos capaces de conservar un germen patógeno o de asignarle una sobrevivencia larga y hacer posible la difusión de dicho germen, sin sufrir este portador alteraciones patológicas, al menos aparentemente.

2.14.4 La brucelosis como zoonosis y su control

Debe realizarse un diagnóstico lo más temprano que se pueda; tratar de romper la cadena infecciosa y eliminación eficaz de reservorios. Para esto debe conocerse:

- * Situación epidemiológica de la enfermedad.
- * Obtener una relación costo/beneficio del control.
- * Tener conocimientos de los mecanismos de control.
- * Debe existir una decisión política y de las Instituciones relacionadas con la Salud Pública, para llevar a cabo un plan de control.
- * Deben existir posibilidades presupuestarias.

La prevención se puede realizar adoptando todas las medidas para lograr la inmediata protección del ser humano y de los animales, frente al contagio. Se debe procurar cortar toda comunicación entre los individuos enfermos o portadores con individuos receptores(133) .

El control se logra con el bloqueo gradual de las fuentes de contagio y la eliminación progresiva de los reservorios de un agente patógeno, con lo cual se logra que la enfermedad deje de ser un problema sanitario, económico o social, disminuyendo la incidencia apreciablemente y manteniendo a la enfermedad en condiciones de que no se disperse indiscriminadamente.

La erradicación es la eliminación total del agente patógeno. Estos programas son limitados por el tiempo, con el logro de tasas de incidencia y prevalencia cero y gastos de capital no recurrentes.

Los responsables de una campaña de control o erradicación de una enfermedad crónica del ganado de un país, necesitan tener un conocimiento mínimo del nivel de prevalencia de animales positivos, para lograr un planeamiento eficiente, en lo que se refiere al procedimiento, presupuesto y recursos humanos. Comparar un estado sanitario posterior a la campaña inicial, es la base para evaluar los resultados de la misma. A nivel nacional, no es útil, por ser un estimador global, promedio de valores muy dispares.

En general la situación es muy variable: diferentes tipos de explotación, concentraciones de ganado y razas que se crían.

Para la realización de la campaña se necesita estimar la magnitud del daño, con una información desagregada a un nivel que permita al trabajador de terreno crear esas estimaciones. Es muy útil a nivel establecimientos, nivel partido, a nivel municipio o de grupos de municipios.

Desde el punto de vista de Salud Pública se la considera como una Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA). Es un síndrome originado por la ingestión de alimento y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o a grupos de poblaciones.

2.14.4.1 Infecciones alimentarias:

Son las ETA producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados por agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros órganos o sistemas.

Según el Código de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) novena edición, la brucelosis se halla bajo el siguiente código:

023.0 Brucelosis por *Brucella melitensis*.

023.1 Brucelosis por *Brucella abortus*.

La ETA producida por las brucelas, genera una manifestación de signos y síntomas de una infección general (fiebre, escalofríos, malestar, dolores).

El período de incubación (latencia) es superior a las 72 horas.

La enfermedad en el humano se llama: Brucelosis.

Los agentes etiológicos y las fuentes de infección: *Brucella abortus*, *melitensis* y *suis*. Tejidos y leche de animales infectados.

Periodo de incubación y latencia: 7 a 21 días.

Signos y Síntomas: Fiebre, escalofríos, sudores, debilidad, malestar, cefalea, mialgia y artralgia, pérdida de peso.

Alimentos implicados: Leche cruda y queso de cabra.

Factores que contribuyen a un brote de ETA: Leche sin pasteurizar, ganado infectado por brucelosis.

Criterio para confirmar un brote de ETA en función de los resultados de laboratorio o antecedentes epidemiológicos.

Aislamiento de patógenos: *Brucella* spp. en la sangre de los enfermos.

Aumento del título: Aumento del cuádruple o más del título de aglutinación entre muestras de sangre tomadas durante la enfermedad aguda y 3-6 semanas después del comienzo de la misma(135)(137)(139) .

Esta enfermedad aparte de ser una zoonosis es importante porque afecta la economía pecuaria.

El efecto sobre la producción animal, disminuyendo la producción de leche, por el número de abortos, lo que se traduce en miles de litros de leche y kilos de carne que no llegan al consumo humano (aumentando la crisis alimentaria).

El otro problema de la brucelosis, para la medicina humana y veterinaria, radica en que es una enfermedad infectocontagiosa, de múltiple sintomatología, mucha difusión y manifestación insidiosa tanto en el humano, como en los animales.

Gravita sobre la economía, la política y el bienestar social de cada país. Esto debe encararse con educación sanitaria preventiva; y cuando la enfermedad esta presente con antibioticoterapia, régimen higienicosanitario dietario, tónicos y vitaminas hace que los enfermos se recuperen en un alto porcentaje de casos. La incapacidad puede ser parcial o total sobre la capacidad laboral, con largos periodos de convalecencia; la muerte se produce en un 5% de los casos (1)(139) .

Las complicaciones que puede presentar un enfermo con brucelosis son:

- * Neurológicas: con encefalitis o meningitis
- * Óseas: espondilitis; osteítis; artritis.
- * Hepáticas.
- * Genitourinarias: orquitis y epididimitis, relativamente frecuentes
- * Cardiovasculares: endocarditis y tromboflebitis poco frecuentes, pronóstico muy grave.
- * Alérgicas, dermatitis.
- * Respiratorias: bronquitis, neumonías y pleuresía.
- * Gastrointestinales y oftálmicas: poco frecuentes.(1)

La brucelosis es una antropozoonosis de distribución casi mundial, existe una estrecha relación entre la brucelosis animal y humana, pues la primera es origen de la segunda. La brucelosis bovina constituye un problema de la Salud Animal y como zoonosis es un riesgo potencial de infección para la salud de los trabajadores de establecimientos infectados, así como para la población consumidora de leche y derivados de éstos.

Las especies animales domésticas pueden servir como reservorios de la infección.

Hay que resaltar que la presencia de *B. melitensis* en leche de vaca potencializa el riesgo de infección para la población consumidora, pues la prevalencia y severidad de la brucelosis resultante de la ingestión de productos lácteos contaminados parece vincularse directamente al tipo de brucelosis animal; *B. melitensis* es la especie que presenta mayor invasividad y patogenicidad para la especie humana en relación a otras especies del género. Todo lo anterior sugiere la necesidad de difundir medidas zootécnicas y sanitarias generales entre los propietarios y encargados de los establos destinados a la producción de leche fresca y que se debe reconsiderar la categorización sanitaria de la leche cruda como apta para consumo humano(137)(139) .

La brucelosis, como cualquier zoonosis, puede y debe prevenirse en el hombre mediante el control de la enfermedad en los animales. Todas las medidas profilácticas aplicables directamente sobre las personas deberán considerarse como transitorias mientras no se logre la erradicación de la enfermedad en los animales. Hay que establecer o diseñar un plan de Educación Sanitaria. Por otro lado no hay evidencias concretas de infecciones humanas por ingestión de leche contaminada con la cepa 19, esta cepa está constituida por bacterias atenuadas. La misma no está totalmente desprovista de patogenicidad o virulencia, por lo tanto puede infectar al hombre(139) .

En cuanto a la distribución de los enfermos por sexo y ocupación se observó: la mayoría de los casos ocurren en hombres, particularmente, en jóvenes. La mayoría (42%) fueron trabajadores de la carne, y el mayor número se dio en los que trabajaban con carne de cerdo. El 14% fueron granjeros y el 3% fueron veterinarios. En este estudio se observó que la leche fue una de las principales fuentes de infección(27)(28)(142) .

El diagnóstico de certeza se obtiene cuando se aísla la *Brucella* de la sangre, médula ósea u otros tejidos de un paciente humano; sin embargo las brucelas crecen muy lentamente "in vitro", por eso el primer aislamiento puede tardar y el primer diagnóstico puede depender de la serología. La respuesta inmune en el hombre se caracteriza por un alza de las Ig M seguido a las pocas semanas por otro pico de las Ig G. Después del tratamiento, los títulos descienden. Las Ig G caen más rápidamente que las Ig M (que lo hacen en forma gradual). En algunos casos las Ig M pueden persistir por meses o años sin evidencias que la infección persista. La rápida disminución de las Ig G establece el éxito de la terapia, y una falla en la caída o un aumento sorpresivo indica una recidiva. Para el diagnóstico humano se usan las siguientes técnicas: SAT, 2ME, RIA, ELISA, FC y Coombs. La presencia de Ig G indica infección activa(140)(141)

En 1.975, Pandolfo et al., citado por García Carrillo (17); estima que el impacto económico de la brucelosis humana, usando indicadores del estado de cada nuevo paciente, se basó:

a) 7 meses y medio de licencia, b) exámenes médicos y de laboratorios y con tratamiento y obtiene una suma de \$70.000 pesos por cada paciente. Según el aumento de salarios y precios de los años posteriores se estimó en 1.980 que un trabajador de la industria de la carne tenía un costo de alrededor de u\$ 4.000 (por brucelosis) sin contar con los gastos de hospitalización.

Las estimaciones de Pandolfo consideran el número de nuevos casos, alrededor de 8.400/año.

Según Villafañe Lastra, el número de casos reportados oficialmente en el país debe ser, por lo menos, multiplicado por 10 para establecer el número de enfermos. Estas medidas acercan a 20.000 los nuevos casos/año, y de ellos el 30% son trabajadores de la industria de la carne y el 70% son trabajadores del agro:

6.000 trabajadores ind. carne x 4.000 u\$ 24.000.000

14.000 trabajadores agro x 3.000

u\$s 42.000.000

66.000.000

Teniendo en cuenta el alto costo de las compensaciones a trabajadores y juicios laborales, ahora frecuentes, las pérdidas producidas por brucelosis humana están aumentando considerablemente(17) .

Según Ramacciotti(139) la brucelosis en la Argentina está ampliamente difundida.

Porcentaje de infección brucélica en la República Argentina

Mortalidad antes de los antibióticos.....8 %

Infección de origen profesional.....46,6%

Infección de origen alimentario.....22,0%

Infección interhumana.....0,2%

Infección difícil de comprobar.....31,6%

El primer informe por aislamiento bacteriológico hecho en seres humanos en la República Argentina, es el que realiza en el año 1.930 el Dr. Fernández Ithurrat en la Provincia de Mendoza, y el primer diagnóstico serológico es el que realiza el Dr. Fornasio en la Provincia de Córdoba.

2.14.5 Profilaxis en el hombre:

Se debe pensar en las medidas de erradicación. Para uso humano se están probando distintos tipos de vacunas. Se debe hacer hincapié en las medidas de higiene y protección para todas las personas que están en riesgo de contraer la enfermedad. En los mataderos: el personal de mayor riesgo es el que está en contacto con las ubres y órganos genitales (útero) y ganglios linfáticos de animales infectados. El útero de animales infectados se debe eliminar sin abrir. Los órganos internos y la sangre presentan graves riesgos de infección en la fase de bacteriemia.

2.14.6 Tratamiento:

Si se logra un diagnóstico precoz, en el período agudo de la enfermedad , siendo el tratamiento apropiado, y realizándose por completo, casi el 100% de los casos curan.

2.14.6.1 Tratamiento en la fase aguda(170) :

a) Dosis diarias de 600 a 900 mg. de RIFAMPICINA combinado con 200 mg. diarios de DOXICICLINA, por 6 semanas; este tratamiento se usa en Europa.

b) 2 grs.. diarios de TETRACICLINA por 6 semanas, con un gramo de ESTREPTOMICINA por una semana.

c) 2 grs.. diarios de TETRACICLINA por 3 ó 4 semanas y ESTREPTOMICINA 1 gramo por día durante 2 semanas. Con este tratamiento el porcentaje de recaídas es menor o igual al 1%. Un tratamiento con TETRACICLINAS sola u otras drogas que no sean la ESTREPTOMICINA, el porcentaje de recaídas es mayor al 10%.

En niños TRIMETROPIMSULFAMETAZOL se usa en lugar de la DOXICICLINA porque esta droga tiñe los dientes.

2.14.6.2 Brucelosis crónica:

Ningún tratamiento ofrece todas las garantías, es necesario repetir los esquemas de combinación por varios períodos y complementarlos con otros antibióticos efectivos, drogas y tratamientos sintomáticos.

El problema de la curación espontánea de la brucelosis es muy discutida. En los animales, depende, en la mayoría de las veces, del germen actuante, de la especie animal afectada, de la resistencia individual del animal y de la virulencia de la cepa empleada.

Las brucelas se hallan hoy completamente adaptadas a la especie humana. Colonizan, crecen y se multiplican sin dificultades en nuestro organismo. La receptividad del hombre para con ellas no puede ser más acogedora, pues a menudo las oculta y las tolera en un mesénquima durante largos años(140)(141) .

2.14.7 Naturaleza de la infección:

Las brucelas son parásitos endocelulares, por lo tanto, los agentes bactericidas son más efectivos cuanto mayor sea su poder de penetración en las células. La acción bactericida o bacteriostática es más efectiva cuando las brucelas están en sangre.

2.14.8 Fuentes de infección:

Esta se produce por la exposición a terneros recién nacidos o fetos abortados y tejidos placentarios. Una vaca infectada elimina numerosas brucelas en el parto o aborto que pueden persistir en el campo por períodos considerables; su supervivencia está afectada por la luz solar, altas temperaturas y sequías; bajo condiciones favorables la sobrevivencia suele ser de tres a cuatro meses en el medio ambiente. La infección humana se puede producir por la contaminación de heridas de la piel, visibles o no, inhalación de aerosoles, contaminación de

conjuntiva u otras mucosas y el consumo de productos lácteos no pasteurizados. El riesgo de infección para los que no están en contacto con los animales es pequeño(140) .

Otra posible fuente de infección es la sangre usada en las transfusiones, tal como lo demuestra el informe elaborado por Pérez Bianco et al(161) , realizado en el Instituto de Investigaciones Hematológicas, sobre la sangre de donantes de los bancos de sangre, en el cual se puede observar.

PROVINCIA	DONANTES	%	(+)	%
Buenos Aires	171596	19,5	816	0,47
Capital Federal	223986	25,4	1045	1,20
Catamarca	7974	0,9	474	5,94
Córdoba	219270	24,9	1598	0,73
Corrientes	29664	3,4	739	2,49
La Rioja	5983	0,7	79	1,32
Mendoza	86127	9,8	1741	2,02
Neuquén	14011	1,6	343	2,45
Río Negro	7127	0,8	51	0,72
San Juan	10329	1,2	319	3,09
Santa Fe	104931	11,9	1065	1,01
Total	880998	100	8270	0,94

2.14.9 La brucelosis desde el punto de vista económico.

La estimación de las pérdidas es fundamental para la evaluación económica de los programas de Salud Animal, ya que los beneficios que se obtengan con su ejecución se medirán en función de las pérdidas evitadas.

Las pérdidas que origina la brucelosis se pueden dividir en dos grandes grupos: pérdidas directas e indirectas.

Las pérdidas directas son consecuencia inmediata de la enfermedad y pueden ser de 2 clases: permanentes: que son irreversibles (muerte, esterilidad) y se cuantifica por el valor de mercado del animal muerto o estéril; y temporales: disminuye la producción por un lapso determinado. Se puede cuantificar por la producción no obtenida más los costos de recuperación del animal, si este no alcanza la producción de sus compañeros se le debe agregar la diferencia en la producción.

Las pérdidas temporales o permanentes son diferentes según afecten a un animal capital o a un animal de producción. Un animal afectado pierde su valor como reproductor (animal capital) y el valor es de un animal de carne. El daño a la actividad está dado por el precio de reposición de un animal en iguales condiciones, menos su valor como animal de carne. La estimación de las pérdidas por crías no obtenidas (abortos) se ve dificultada por la existencia de otras enfermedades y por que incluye el valor potencial del animal de pedigree. Puede hacerse en función del costo en que se haya incurrido para gestar la hembra y para criarla posteriormente. Otra forma es asignarle a la cría no nacida el valor para carne que tendría que haber tenido si hubiera nacido; si es un animal de pedigree su precio sería el de mercado para este animal al nacer.

Las pérdidas indirectas las sufre el productor como la comunidad por la presencia de la enfermedad (cierre de mercados, menores precios de venta, prohibición de comercialización)(147) .

Entre las pérdidas directas se pueden citar:

- 1) abortos: 10 al 35% de vacas infectadas abortan
- 2) menor producción de leche: cada vaca enferma disminuye su producción un 20% por una mastitis intersticial y puede llegar a un 50% la pérdida de leche si se produce un aborto temprano.
- 3) Terneros que nacen débiles y que cuando sobreviven crecen más lentamente que los normales
- 4) Infertilidad: permanente o temporal, que alargan el período entre partos (más de 63 días).
- 5) Lesiones articulares, que disminuyen el precio del animal, pudiendo en algunos casos llegar a aconsejar su sacrificio o eliminación del rodeo.
- 6) La diferencia que existe en el precio de un vaca como reproductora y su valor como carne.

Las pérdidas indirectas son:

- 1) Problemas de manejo estacional de las pariciones por la eliminación de las vacas positivas.
- 2) Interferencias en los procesos de selección y mejoramiento animal.
- 3) Enfermedad en los humanos que tiene un componente económico por las horas de trabajo perdidas, medicamentos y compensaciones.

2.14.10 Influencias sobre el comercio:

Los países que han erradicado la brucelosis de sus rodeos, exigen el control de aquellos que les suministran animales o sus subproductos. Se les puede exigir el certificado de libre de brucelosis.

Australia ha calculado que el mayor beneficio de su campaña radica en la protección a sus exportaciones.

2.14.11 Relación costo/beneficio de los programas contra la brucelosis.

Un programa es altamente rentable cuando la relación es de 10/1.

Canadá implementó un programa cuya relación fue de 5/1. Otro ejemplo es el de Checoslovaquia, cuyas pérdidas por esta enfermedad ascendían a 100 millones de coronas hasta 1.959; en 1.964 se diagnosticó el último positivo. El costo total del programa fue de 250 millones, en tres años el programa se pagó solo. Nueva Zelanda implementó un programa; la Tasa Interna de Retorno fue 10,3% sobre el costo del programa(1)(143) .

En 1.935 Goodbar y Oulton calcularon que en la Provincia de Córdoba se perdían, aproximadamente 26 millones de dólares por Brucelosis. En 1.956 Morán estimó que la prevalencia de la brucelosis bovina alcanzaba al 12,6%, el 15,5% para la porcina y la caprina era del 22,6% por lo cual las pérdidas eran de 42 millones de dólares.

En 1.960 Cedro calculó en 37 millones de dólares, aproximadamente, las pérdidas en rodeos lecheros solamente. En 1.962 este mismo autor estima que las pérdidas en la Producción Caprina eran de 3 millones de dólares.

En 1.966, Bacigalupo et al(142) estiman que las pérdidas totales por brucelosis animal en el país eran de 138 millones de dólares.

Las pérdidas humanas se pueden considerar como lo hizo Pandolfo, quien estimó que un enfermo de brucelosis necesitaba 4.000 dólares, sin gastos de hospitalización (7 meses y medio de licencia, exámenes de laboratorio y clínicos y tratamiento), 20.000 nuevos casos por año (el 30% individuos relacionados con la industria de la carne y el 70% relacionados con el sector agropecuario) lo que suma 66 millones de dólares por año, esto sin contar los juicios laborales y las compensaciones(17) .

Los economistas y productores subestiman las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad. Las mermas en la producción de terneros pueden llegar al 40% y la producción láctea sufre una merma de hasta el 25%. A éstas hay que sumarle otras que no se expresan numéricamente, por ejemplo la reposición de vientres, problemas de esterilidad, amachorramiento, trastornos reproductivos, uso antieconómico de pasturas y forrajes por animales no productivos, desmejoramiento y desprestigio de nuestro ganado(5) . Se ha establecido que uno de cada cinco animales debe ser reemplazado por infertilidad temporal o permanente; también es un obstáculo para la selección, siempre los infectados son los de mayor producción o machos altamente seleccionados. El sacrificio entorpece la selección. El programa de erradicación de California tuvo una relación de costo/beneficio de 7,7/1 (143) .

En la República Argentina se han publicado muchos trabajos sobre las pérdidas económicas directas que la enfermedad ocasiona en el rodeo nacional, pero en ninguno se ha tenido en cuenta las pérdidas indirectas que se generan por las trabas comerciales que se aplican en el comercio internacional de animales y de sus productos.

El impacto económico dimensionable que ocasiona, actualmente, la brucelosis asciende a \$40.853.790, cerca del 56% de las pérdidas anuales se deben a mermas en las crías, un 27% por menor producción de leche y el 14% restante por costos de reposición.

Pérdidas de crías por aborto

$$PC = (V \times Mo \times 0,15) \times Pt = \$22.950.000$$

PC= Pérdidas por crías

V = Números de vientres

Mo= Tasa de morbilidad: 6%

0,15= Se estima que el 15% es la proporción de vientres que abortan

Pt= Precio del ternero

Pérdidas en la Producción de Leche por abortos

$$PLA = (Vo \times Mo \times 0,15 \times L) \times PI = \$ 5.661.012$$

PLA= Pérdida leche por aborto

Vo = Vacas en lecheras en ordeño

Mo = Tasa de morbilidad: 6%

0,15= Proporción de vientres que abortan

L = Producción anual promedio de litros por vaca

PI = Precio de la leche

Pérdidas por menor producción de leche

Se considera que el 85% de las vacas enfermas no abortan, pero disminuyen un 20% su producción láctea.

$$PML = (Vo \times Mo \times 0,15 \times 0,20 \times L) \times PI = \$ 6.415.814$$

PML = Pérdida menor producción láctea

Vo = Vientre en ordeño

Mo = Tasa morbilidad: 6%

L = Producción por año promedio de leche por vaca

Pl = Precio de leche por litro

Pérdidas por incremento en la reposición.

PAR = $(V_o \times M_o \times 0,15) \times PV =$ \$ 5.826.964

PAR = Pérdidas por incremento en la reposición

V_o = Vientres en ordeño

M_o = Tasa de morbilidad

0,15 = Proporción de enfermas que abortan

PV = Precio de una vaca en ordeño

Los valores para efectuar los cálculos se obtuvieron de la Dirección de Producción Ganadera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Detalle:

		Período
Precio kilo de ternero a invernada	\$ 0,81	enero/set. 94
Precio litro/leche (con 3,2% de G.B.)	\$ 0,165	set.93/agosto 94
Valor vaca ordeño	\$ 500	setiembre 94
Vacas totales de tambo	2.378.905	1.992
Vacas en ordeño	1.294.881	1.992
Litros/vaca/año	2.949	
Días de lactancia	220	
Pérdidas económicas anuales discriminadas		
Pérdidas	Costo	Porcentaje
Crías por aborto	\$ 22.950.000	56,17%
Pérdidas de Litros	\$ 11.076.826	27,11%
Por incremento en la reposición	\$ 5.826.964	14,26%

Estos datos fueron suministrados por el SENASA(6).

2.15 DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Una enfermedad se dice que tiene una presentación endémica cuando: 1) está en función normal de una presentación o 2) tiene una presentación constante la enfermedad en una población determinada. Está determinado por la presencia de síntomas clínicos o anticuerpos circulantes.

Tiene una presentación epidémica cuando tiene un nivel superior al nivel esperado (nivel endémico).

Se denomina pandemia, a una epidemia de amplia difusión que afecta a una gran parte de la población.

Una enfermedad de presentación esporádica es aquella que tiene una presentación en forma irregular y fortuita. Es de presentación local(146)

2.15.1 Morbilidad: proporción de animales que enferman en un lugar y tiempo. No es bien conocida. Se expresa en términos de prevalencia o incidencia.

2.15.2 Incidencia: medida de ataque. Número de casos nuevos de la enfermedad que ocurren a una determinada población durante un periodo. Es una manera dinámica de estimar el riesgo de enfermar.

$I =$ casos nuevos de brucelosis durante un período de tiempo
promedio de la población durante dicho período

La brucelosis humana se notifica por incidencia.

La enfermedad animal se notifica por prevalencia.

2.15.3 Prevalencia: casos que existen en un momento dado
población de ese momento.

Las enfermedades crónicas (Brucelosis) se miden por su prevalencia, datos expresados en porcentaje.

La incidencia puede permanecer constante durante un período, así como la duración de la misma durante el período. La prevalencia, prácticamente, es igual a la incidencia por la duración. Estos cálculos pueden expresar que la epidemia comienza, que llega a su pico máximo o que comienza a declinar.

Un indicador positivo de un programa de brucelosis animal es el descenso de la incidencia en los humanos.

2.15.4 Mortalidad: número de defunciones por períodos en relación con la población existente donde la enfermedad ocurre. Se expresa por medio de tasas. En los humanos los valores de las tasas son muy pequeñas. No es de uso práctico. En los animales prácticamente no existen.

2.15.5 Letalidad: número de defunciones relacionados con el número de enfermos. Se expresa como porcentaje. En la brucelosis humana los datos varían según los distintos autores, oscilando entre 0,5 a 2%. En los animales no se conocen datos a cerca de la letalidad.

2.15.6 Tipos de onda:

Una vaca que disemina la enfermedad:

- 1) Este animal tiene un aborto o un parto aparentemente normal, con eliminación abundante de brucelas al medio ambiente (membranas fetales y fluidos)
- 2) 5 vacas en contacto abortan entre las 12 y 16 semanas más tarde
- 3) 12 y 24 semanas después del primer aborto a las vacas "nativas" se les produce una "tormenta" de abortos. De 80 vacas, 41 abortaron(1) .

2.15.7 Variabilidad de una prueba diagnóstica (PD) (estimación)

Toda prueba diagnóstica depende de dos puntos:

- 1) Repetibilidad o Precisión, la que está determinada por:
 - * Condiciones de la muestra y del individuo
 - * Condiciones del laboratorio
 - * Variabilidad interobservador
 - * Variabilidad intraobservador
- 2) Exactitud o Validez, dependiendo de:
 - * Repetibilidad
 - * Sesgo

2.15.7.1 Factores que influyen la Sensibilidad (S) y la Especificidad (E) a Nivel Rodeo de una Prueba Diagnóstica.

La Especificidad a Nivel Rodeo tiene como componentes a:

- # Sensibilidad a nivel individual
- # Especificidad a nivel individual
- # Tamaño de la muestra
- # Criterio de rodeo positivo

La Sensibilidad tiene estos mismos factores más:

- # Prevalencia del rodeo

La Sensibilidad se define como: Capacidad de una Prueba Diagnóstica (PD) para identificar rodeos infectados como infectados.

La Especificidad la podemos definir como: Capacidad de una Prueba Diagnóstica (PD) para identificar rodeos libres de infección como libres.

La capacidad discriminatoria de una Prueba Diagnóstica se mide mediante:

Sensibilidad: Es la capacidad de una P.D. para identificar como positivo a un individuo enfermo.

Especificidad: Es la capacidad de una P.D. de identificar como negativo a un individuo no enfermo.

		Enfermedad		
+		a	b	a+b
	si		no	
	Prueba diagnóstica			
-		c	d	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d =n

S= a
a+c

$$E= d$$

$$b+d$$

Del cuadro anterior se deduce que:

- el valor a: verdadero positivo
- el valor b: falso positivo
- el valor c: falso negativo
- el valor d: verdadero negativo

Otro dato que es necesario conocer son los Valores Predictivos que se definen de la siguiente manera:

2.15.7.2 Valor Predictivo Positivo: Es la probabilidad de que un individuo esté realmente enfermo, cuando el resultado de la P.D. ha sido positivo (VPP).

2.15.7.3 Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad que un individuo esté realmente no enfermo cuando el resultado de la P.D. ha sido negativo (VPN).

Numéricamente estos datos se obtienen de la siguiente manera:

$$VPP= \frac{a}{a+b}$$

$$VPN= \frac{d}{c+d}$$

Los factores que más influyen al:

VPP: Prevalencia y Especificidad

VPN: Sensibilidad y Prevalencia

Todos los test usados para la certificación de que un animal está libre de una enfermedad presenta un problema inherente a su técnica y es por eso que proporción resultados que pueden ser Falsos Positivos o Falsos Negativos, los cuales nos pueden llevar a un error que puede resultar muy costoso. Hay 4 posibilidades de el estado sanitario de un animal:

		Verdadero estado		Total
		infectado	no infectado	
Test diagn.	reactor	a	b	(a+b)=R
	no reactor	c	d	(c+d)=N
	Total	(a+c)= Y	(b+d)= S	(a+b+c+d)=T

Usando las categorías del cuadro anterior es posible calcular los valores de prevalencia, prevalencia aparente, sensibilidad, especificidad y sus valores complementarios.

El resultado de un test puede ser positivo o negativo. La probabilidad de que este test negativo sea de un animal verdaderamente sano se denomina: Valor Predictivo Negativo.

$$H/N = \frac{(1-p)E}{(1-p)E + P(1-S)}$$

donde:

H= b+c, N= c+d, P= prevalencia real, E= especificidad,
S= sensibilidad

El problema se presenta cuando hay que determinar la probabilidad de que una reacción negativa sea de un animal verdaderamente enfermo.

$$I/N = \frac{P(1-S)}{P(1-S) + (1-P)E}$$

donde:

I= a+c, N=c+d, P=prevalencia verdadera, E y S= especificidad
sensibilidad

El calculo de estas 2 formulas depende de la

2.15.8 PREVALENCIA Y SENSIBILIDAD DEL TEST

La probabilidad de incluir un animal enfermo en la selección

El riesgo aumenta con el tamaño de lote.

$\text{Prob} = [c > 1/N] = 1 - \text{Prob} [c = 0/N] = 1 - [\text{PVN}]^n$

donde:

c= animales no reactivos

N= c+d

PVN= valor predictivo negativo

n= tamaño del lote

En el desarrollo de estos temas, se ha indicado como por sobre o debajo del rol conocido que tiene la prevalencia de la enfermedad y la sensibilidad de los correspondientes test diagnósticos, el tamaño de la muestra (grupo) influye en el riesgo de que un animal infectado pueda ser seleccionado inadvertidamente. Estos análisis pueden aplicarse a cualquier proceso de selección, el cual depende de un sistema de test que no es el 100% sensitivo en la determinación de animales infectados.

Este análisis puede ser aplicado a cualquier situación semejante, independiente, de la enfermedad considerada o los métodos de diagnósticos usados(145)(147) .

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tamaño de la muestra:

Algunos elementos para tener en cuenta(147) :

- 1) El rango de error que se está dispuesto a aceptar entre el valor "real" y la estimación de la muestra:.
- 2) La confianza que se deposita en el intervalo de estimación del valor "real" confeccionado a partir de los resultados de la muestra.
- 3) Una aproximación "a priori" de la variación de la medida que se estudia.

Para el estudio de la prevalencia de reaccionantes se considera aceptable que el tamaño de la muestra permita cumplir con las 2 primeras condiciones enumeradas en los siguientes valores:

- 1) Que el rango de error admisible no sea mayor al 20% de la prevalencia.
- 2) Que ese rango de error tenga una confianza del 95%.

Para calcular el tamaño de la muestra: adecuado que cumplan con esas condiciones, es necesario tener una estimación, aproximada, de la prevalencia que se espera encontrar, ya que de ello depende la medida de variación.

Para la realización de este trabajo se consideró que la prevalencia "estimada" en los rodeos era del 30% y la prevalencia entre los animales era del 10%(17).

3.1.1 Error estándar de una proporción(146)(147)

Existe entre el dato obtenido por muestreo y el universo o población total una relación; por que no se puede trabajar con la totalidad del universo, sino con una parte o fracción del total. La diferencia entre la muestra y el universo, se denomina "error por muestreo" que puede deberse a la variabilidad de la población o al tamaño de la muestra. Este error por muestreo se puede medir estadísticamente por medio de una constante llamada error estándar (ES).

$$ES = \sqrt{x(1-x)/n}$$

Trabajando con un grado de significación del 95% (2ES), el resultado se expresa como el promedio mas/menos 2ES, por lo que se puede deducir que la tasa de prevalencia de la brucelosis bovina en la población de tal lado se encuentra entre.... y

En el ganado bovino, para estimar la prevalencia aparece otro factor distintivo: la Producción Lechera y la Producción de Carne.

En la primera producción existe una mayor concentración y promiscuidad, mayor duración de la vida productiva lo cual la coloca en posición desventajosa frente a las enfermedades crónicas debido a una mayor exposición al riesgo, esto obligará a desdoblarse la información requerida a dos estratos perfectamente definidos.

La estratificación, en este caso sería de utilidad, ya que la separación se hace a partir de una característica (tipo de explotación) que es relevante en relación al atributo estudiado (prevalencia de una enfermedad infecciosa crónica).

Las estimaciones de prevalencia hechas habitualmente por muestreo, como toda la información que se obtiene por esta técnica, permite generalizar tácitamente los resultados a la población de la cual fue estimada.

La prevalencia de una enfermedad crónica, sería una subdivisión de la muestra referida a las diferentes áreas geográficas o administrativas de interés, en las que estarían indicadas los diferentes tipos de explotación (cría o leche).

Se debe puntualizar que la cantidad de individuos que entran en un muestreo prácticamente, no depende de la población a estudiarse. Así, como el número de animales requerido para un estudio de prevalencia a nivel país (total), sería aproximadamente el mismo, que el necesario para un estudio de prevalencia en cualquiera de las áreas antes mencionadas, manteniendo una validez semejante el dato suministrado por el muestreo. Lo mismo puede decirse para el caso de la estratificación por tipo de explotación(147).

3.1.2 Intervalo de Confianza

El intervalo de confianza que desea confeccionarse, cuya confianza se expresa habitualmente como porcentaje, indica el siguiente concepto: dada una proporción "real" P (desconocido), si se toman repetidas muestras (en la práctica esto no se hace), los estimadores "p" de la muestra caerán dentro del intervalo de "confianza" que se ha fijado. Esta "confianza" determina la amplitud determinada.

3.1.2.1 Determinación de los límites del intervalo de confianza para P.

La amplitud del intervalo de confianza queda fijado por el grado de confianza, porque a cada uno de ellos corresponde un factor por el que hay que multiplicar al E Sp. Estos múltiplos del E Sp se suma y restan al valor "p" teniendo de esta manera los límites del intervalo.

Grado de confianza	Factor (aproximado)
99%	2.6
95%	2.0
90%	1.65

3.2 Técnicas de laboratorio empleadas:

Estas se describen en el anexo 1.

3.2.1 Prueba con Antígeno en placa tamponado (BPA) (Angus y Barton, 1.984). (1)(85)(157).

Esta prueba se usa como tamiz, es altamente específica y sensible. La cantidad de suero que debe usar es muy poca. Por el bajo pH (3,8 - 4) del antígeno, hace que esta prueba detecte solamente a las Ig G1, siendo las inespecíficas (Ig M), inhibidas(21).

Los test RB y BPA son usados en lugares donde la prevalencia es baja y como pruebas de vigilancia epidemiológica; en planes de erradicación.

Esta prueba, usada en bovinos infectados, junto con FC es más sensible que SAT.

Las condiciones ambientales pueden afectar su sensibilidad.

Se ha observado que puede presentar falsos positivos si los animales han sido vacunados con otros antígenos(12) .

Esta técnica se usa por que no presenta falsos negativos(148) .

3.2.2 Prueba con antígeno de Rosa de Bengala(1)

Esta es una prueba rápida, sencilla y económica, es usada como prueba tamiz(76). Muestras negativas a RB son, generalmente, negativas a FC (78)(79)(80).

Moyer et al(84) no recomienda el uso del SAP como prueba tamiz, y si recomienda RB o la lenta en tubo, para este fin y luego otro test confirmatorio.

La temperatura ambiental es un factor a tener muy en cuenta al realizar esta prueba.

El antígeno son células de brucelas teñidas con Rosa de Bengala y suspendidas en una solución bufferada con un pH 3,65; este pH previene la aglutinación de anticuerpos aglutinantes no específicos(79)(80) . Detecta la infección de manera más temprana que el SAT e identifica más eficientemente que animales excretan activamente brucelas de su organismo en comparación al SAT. En las áreas donde la erradicación de brucelas es casi completa, RB es muy sensible.

3.2.3 Prueba de Wright o Seroaglutinación en Tubos (SAT).

En comparación con la de placa, esta prueba es menos afectada por los factores ambientales, errores en la manipulación del suero y reacciones inespecíficas.

Es uno de los test más ampliamente usado para el diagnóstico o campañas de erradicación.

La sensibilidad del antígeno depende de la concentración celular y estado de disociación. Las condiciones de realización deben estar normalizadas. Los antígenos muy diluidos son hipersensibles, dando por resultado falsos positivos, los antígenos muy concentrados producen el efecto contrario (66) .

Tanto esta prueba como la de placa no detectan la totalidad de los animales infectados, por eso, cuando la prevalencia es baja, se realizan otras pruebas más sensibles. Dos pruebas en tubo, con intervalo de 60 días, pueden detectar el 99,5% de los animales infectados.

En este trabajo se consideró todo título de 50 UI o mayor como positivo dado que en ningún momento se tuvo la seguridad de que los animales muestreados fueran correctamente vacunados (en edad y en la forma adecuada). El Manual de Procedimientos del SENASA(163) considera a estos animales:

- SOSPECHOSOS títulos 1/100, cuando a 2ME son negativos (machos mayores de 6 meses y para hembras no vacunadas).

Cuando se trata de hembras vacunadas entre los 3 y 10 meses y el examen se realiza a partir de los 18 meses:

- POSITIVOS cuando los animales tienen títulos $\geq 1/25$ y 2 ME $\geq 1/25$.

- POSITIVOS cuando los animales tienen títulos 1/200 y 2ME negativos.

En estos dos últimos casos los animales analizados son BPA positivos.

3.2.4 Prueba de aglutinación con 2 Mercaptoetanol (Anderson, 1964).

Siempre es conveniente realizarla junto con la aglutinación en tubo, para interpretar la diferencia entre ellas (1). En animales vacunados mayores de 18 meses de edad y en machos mayores de 6 meses, cualquier título es considerado positivo.

La solución de 2-ME 0,1M, la cual reduce los puentes de disulfuro de las Ig M, impidiéndoles reaccionar, y se produce una aglutinación selectiva de los anticuerpos Ig G. Las Ig M inespecíficas son , sensibles al 2-ME (52)(66).

Esta prueba es excelente como complementaria, y los sueros que se someterán a ésta, son los positivos a las pruebas tamices (48) .

3.2.5 Prueba con Rivanol (Anderson, R.M. y col. 1962).

Se trata al suero con Rivanol (lactato de 2-etoxi 6,9, -diamino - acridina), el cual hace que las albúmina y macroglobulinas (19 S) precipiten. El sobrenadante, proveniente de una centrifugación, es sometido a una prueba de aglutinación en placa; en esta prueba se detectan exclusivamente, isotipos Ig G (γ)(52) . Esta reacción se hace en 2 partes; en la primera se somete el suero a la acción de la solución de Rivanol y en la segunda parte la mezcla de la solución con el suero, se la somete a la acción del antígeno de Rivanol.

3.2.6 Prueba de Fijación de Complemento

Es una de las técnicas más sensibles y específicas. Se trabaja con reactivos titulados y se aplica sobre sueros seleccionados, como positivos, con otras pruebas más sencillas. Detecta isotipos Ig G1, Ig M es menos activa en esta prueba y la Ig G2 no Fija el Complemento.

Con esta prueba se inactivan los anticuerpos inespecíficos y se pueden detectar los enfermos crónicos.

Se obtienen menos falsos positivos, detecta enfermedades crónicas, y es ocasionalmente, negativo en las infecciones recientes. Por su forma de realizar, algo complicada, es más deseable como test definitorio (12) .

Se realizó la técnica en frío.

3.2.7 Antígenos.

En esta tesis se trabajó con antígenos elaborados y normalizados en el CICV INTA-Castelar según normas internacionales. Los antígenos usados fueron Rosa de Bengala, BPA, Wright (usado también para las pruebas de 2 ME y FC), el antígeno de Rivanol (93) .

3.3 Zonas estudiadas:

En la presente tesis se trabajó en tres zonas diferentes del país, una de la provincia de Buenos Aires, Partido de Tandil, y las dos restantes son de la Provincia de Córdoba: una es de Coronel Moldes y la otra en la zona de Serrano - Jovita.

El Partido de Tandil se halla en el Sur Este de la Pcia de Bs. As., posee una extensión total de 493.000 has., está dividido en 16 circuitos. La población de ganado bovino es de 325.902 animales, los cuales se distribuyen en 1.546 establecimientos, de los cuales 165 son tambos. El muestreo fue realizado de forma

completamente aleatoria, al azar; tomando como base el padrón de establecimientos rurales del Plan Aftosa, el mismo se depuró, excluyendo del mismo las categorías de novillos y terneros/as.

Se procedió al sorteo de los establecimientos a muestrear, realizando un listado de establecimientos con sus respectivos suplentes para el caso de que hubiese algún problema. Estos se eligieron del padrón original, los que fuesen más parecidos a los Titulares, en cantidad de animales y tipo de explotación.

La cantidad mínima se estimó en 80 establecimientos y 30 animales por establecimiento, en caso de no alcanzar el número de animales se sangrarían a todos los animales.

Lo real obtenido fue 91 establecimientos muestreados y 35 animales como promedio por establecimiento.

Este muestreo incluyó 2.771 animales como total, de los cuales 117 fueron toros, 1.163 vaquillonas y 1.491 vacas (Gráfico 1).

Describiendo a los establecimientos según la producción a la que pertenecen se halló: que 20 se dedican a la cría; 25 son tambos, 32 son mixtos y a 14 no se los pudo identificar en cuanto a su producción (Gráfico 2).

En cría se muestrearon 506 animales, en los establecimientos en que no se pudo establecer cual era la producción se analizaron 401 animales, en tambo 797 animales y en los establecimientos en que la producción era mixta fueron testeados 1.067 animales (Gráfico 3).

Los animales fueron seleccionados al azar.

Las muestras fueron acondicionadas en la ciudad de Tandil y el suero fue enviado al CICV INTA-Castelar donde se procedió al análisis. El suero se remitió congelado, y en el INTA permaneció congelado hasta su procesamiento.

Coronel Moldes, Departamento de Río Cuarto se encuentra en la región natural de los pastizales pampeanos, está limitando con la región del bosque y médanos pampeanos puntanos (región semiárida)(164) . Es una de las zonas tamberas más importantes de Córdoba, después de San Francisco y Villa María.

En esta zona se trabajó con una Cooperativa de Tambos. Todos los animales son Holando Argentino, y se muestrearon en su gran mayoría vacas en ordeño, solo un pequeño porcentaje fueron vaquillonas y en los tambos en que tenían toros estos fueron sangrados. Esta Cooperativa cuenta con 100 tambos asociados, con una producción total de aproximadamente 2.025.100 litros y en kilos de grasa 72.300. Esta entidad recibe leche de Bulnes, Sampacho, Malena, Carolina, San Basilio, Los Jagüeles, Fragueyro, Tosquita.

En esta zona se muestrearon 2.545 animales, distribuidos en 37 tambos. 12 fueron toros (0,5%); 2.005 vacas (78,8%) y 528 vaquillonas (20,7%) (Gráfico 4).

La zona de Jovita - Serrano está en el sur de Córdoba; Jovita se halla en el Dpto Gral. Roca y Serrano se halla en el Dpto. Presidente Roque Saenz Peña, ambas localidades se hallan muy cerca del límite de Buenos Aires (Este) y La Pampa (Sur). Aquí se trabajó con una Cooperativa recién fusionada, una pertenecía a Colonia El Árbol (Jovita) y la otra de Serrano. Tiene 100 productores. Es una zona mixta, se realiza agricultura, tambo, invernada de novillos Holando Argentino y en el límite de la Pcia. se hace cría. Esta Cooperativa tiene un porcentaje del 35% de los tambos positivos a la prueba del Anillo en Leche. Se trabajó en vacas de ordeño y en muy pocos casos en vaquillonas.

Se estudiaron 981 animales, 8 toros (0,8%) y 973 vacas (99,2%). Los cuales pertenecían a 28 tambos (Gráfico 5).

La metodología del trabajo en la Pcia. de Córdoba fue similar a la usada en Tandil. Del listado de productores se procedió a realizar un sorteo al azar de los tambos a muestrear, y cada tambo se muestreó un promedio de 30 animales.

3.4 Rutina de trabajo:

Se realizaron las técnicas BPA, Rosa de Bengala, Wright, 2 Mercaptoetanol, Rivanol y Fijación de Complemento a todos los sueros recibidos en el CICV INTA-Castelar

Todos los datos obtenidos fueron archivados en los programas de computación Lotus, Splash. Una vez obtenidos todos los datos fueron procesados en el Programa Epi Info Versión 6(166) .

Los animales que fueron muestreados son machos enteros mayores de 6 meses, vaquillonas y vacas. Que fueron previamente definidos de la siguiente manera:

Machos: todo animal (de este sexo) mayor de 6 meses de edad y no castrado en el momento de la extracción de sangre.

Vaquillonas: toda hembra mayor de 18 meses, que no haya parido por segunda vez.

Vacas: toda hembra que haya parido más de 2 veces.

La sangre se extrajo por venipunción de la vena coccígea o en algunos casos, de la yugular. Se recolectaron entre 5 y 10 CC.. de sangre por muestra. Luego se procedió a la centrifugación de la misma para la obtención del suero.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PARTIDO DE TANDIL

4.1.1 Establecimientos reactores:

Se consideró establecimiento reactor cuando tiene por lo menos un animal reactor para alguna de las pruebas diagnósticas empleadas.

De los 91 establecimientos muestreados, tuvieron animales que reaccionaron a las diferentes pruebas: BPA hubo 75 (82,41%); a Wright (con títulos de 1/50 o más) hubo 39 (42,85%) establecimientos, y 44 establecimientos (48,35%) tuvieron animales positivos a Rosa de Bengala (Gráfico 6).

En relación a las pruebas complementarias, 32 establecimientos (35,16%) fue positivo a 2ME y a Rivanol ; y 24 establecimientos (26,37%) fue positivo a FC (Gráfico 7).

Los intervalos de confianza, trabajando con el 99% de significación quedan demarcados por los valores de $2ES \pm \%$ obtenido; así se puede observar:

BPA: $2,6\sqrt{82,41 \times 17,59/91} = 10,38$; por lo tanto el IC queda conformado por los valores 72,03% y 92,79%, lo que significa que la prevalencia de la brucelosis bovina, en los establecimientos del partido de Tandil se halla comprendida entre los valores anteriormente citados; trabajando con un 99% de significación.

Wright: $2,6\sqrt{42,85 \times 57,15/91} = 13,49$; el IC tiene como límites 29,36% y 56,34%; lo que significa que la prevalencia de la brucelosis bovina, en los establecimientos del partido de Tandil, se halla entre el 29,36% y 56,34%, con un 99% de significación.

Rosa de Bengala: $2,6\sqrt{48,35 \times 51,65/91} = 48,35$; obteniendo así los límites, 34,73% y 61,97%; lo que significa que la prevalencia de los establecimientos del Partido de Tandil, con animales reactores a RB, se halla entre los límites anteriormente citados, trabajando con un 99% de significación.

Para las pruebas complementarias se trabajó con el 95% de significación:

2 ME y Rivanol: $2\sqrt{35,16 \times 64,84/91 \pm 36,26}$; así se obtiene los límites 25,15% y 45,17%, lo cual significa que la prevalencia de la brucelosis bovina en los establecimientos de Tandil se halla entre el 25,15% y el 45,17%, trabajando con un 95% de significación.

Fijación de Complemento: $2\sqrt{26,37 \times 73,63/91 \pm 26,37}$; los límites quedan entre los siguientes valores: 17,13% y 35,61%. Lo que indica que la prevalencia de la brucelosis bovina en los establecimientos de Tandil se halla entre el 17,13% y el 35,61%, trabajando con un 95 de significación.

4.1.2 Resultados de animales en forma individual

Del total de animales del Partido de Tandil que fueron muestreados los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

4.1.3 BPA

De los 2771 animales resultaron reactores a esta prueba 451 (16,28%), de los cuales 49 eran de establecimientos de cría, 99 eran de tambo; 73 de establecimientos cuya producción no se estableció y 230 de establecimientos mixtos. Los negativos resultaron 2319 (83,71%) y una sola muestra no fue procesada por el envase en que se recibió estaba abierto (Gráfico 8).

La prevalencia de animales reactores a BPA se saca de manera similar (con 99% de significación), $2ES \pm \%$ de animales positivos; $2ES = 2,6\sqrt{16,28 \times 83,71/2770} = 1,82$

El IC queda demarcado por los siguientes valores: 14,46% y 18,1%, lo que indica que la prevalencia de brucelosis bovina para los animales susceptibles del partido de Tandil se halla entre estos valores; trabajando con un 99% de significación.

Analizados por sexo hubo 103 (88,03%) toros negativos y 14 (11,96%) reactores; 1282 (86,04%) vacas negativas y 208 (13,96%) reactores, el suero que faltaba era de esta categoría y en la categoría de vaquillonas 934 (80,31%) reaccionaron en forma negativa y 229 (19,69%) en forma positiva. Los toros son el 4,22% de la muestra, las vacas el 53,81% y las vaquillonas el 41,97% (Gráfico 9).

4.1.4 Rosa de Bengala:

De los 2771, se analizaron por esta técnica 2767 sueros; resultando 148 (5,35%) reactores, 2619 (94,65%) negativos. Hubo 4 (0,14%) muestras que no se analizaron porque la cantidad de suero no alcanzó (Gráfico 10). Con estos datos sacamos el ES, 2ES (trabajando con el 99% de significación) y el intervalo de confianza:

$$ES: \sqrt{5,35 \times 94,65/2767} = 0,43$$

$$2ES = 2,6 \times 0,43 = 1,19$$

IC= 4,16% y 6,54%

La prevalencia de la brucelosis bovina, en la población susceptible del Partido de Tandil, se encuentra entre el 4,20% y el 6,58%, con un 99% de significación.

Los reaccionantes por sexo fueron: toros 2 (1,71%) y 115 (98,29%) negativos; en la categoría vacas hubo 70 (4,71%) y 1417 (95,29%) negativas y sin poder analizar 4 muestras; de las vaquillonas hubo 76 (6,53%), 1087 (93,47%) negativas (Gráfico 11).

4.1.5 Wright:

Se consideraron animales reactivos aquellos con títulos de 1/50 o mayores.

De los 2771 sueros remitidos 11 no se pudieron estudiar; resultando 301 (10,91%) reactivos y negativos 2459 (89,46%). De los toros analizados, hubo 6 (5,13%) reaccionantes, en la categoría vacas 153 (10,57%) y en la categoría vaquillonas 142 (14,83%), estos porcentajes son tomados en base a cada categoría (Gráfico 12).

Según la fórmula del ES= $\sqrt{10,91 \times 89,09 / 2760} = 0,59$; trabajando con el 90% de significación debemos considerar 2ES, por lo tanto $1,65 \times 0,59 = 0,97\%$; el intervalo de confianza para la prevalencia de la brucelosis bovina, en la población susceptible del partido de Tandil se halla entre el 9,94% y el 11,88%.

Analizados por la producción de los establecimientos de donde son originarios los animales resultan reaccionantes: 39 (7,76%) animales de la cría y 465 (92,26%) negativos; 92 (11,61%) animales de los tambos y 700 (88,38%) resultaron negativos; 38 (9,52%) animales de los establecimientos donde la producción no se pudo establecer y 361 (90,48%) resultaron negativos y en los establecimientos mixtos hubo 141 (13,24%) reaccionantes y 924 (86,76%) negativos (Gráfico 13).

No se pudieron analizar 2 muestras del sector cría, 5 muestras de los tambos, 2 muestras de los establecimientos cuya producción no se identificó y 2 muestras de los establecimientos de producción mixta.

4.1.6 Comparación entre pruebas.

4.1.6.1 BPA y Rosa de Bengala

Fueron comparados 2267 sueros; resultando 146 positivas a las 2 pruebas y negativas para ambas reacciones 2314; resultando positivos a BPA y negativas a RB 305 y no hubo sueros que resultaron positivos a Rosa de Bengala y negativos a BPA. Con estos datos se sacaron los datos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, estos valores son:

	BPA	Rosa de Bengala
Sensibilidad	100%	96,8%
Especificidad	88,4%	87%
Valor Pred. Posit.	32,4%	28,1%
Valor Pred. Negat.	100%	99,8%.

Epi Info 6 (162)

4.1.6.2 Rosa de Bengala y Wright:

De la comparación de 2767 muestras, reaccionaron a ambas pruebas 128; sólo reaccionaron a Wright 189 muestras, no existiendo positivos a RB y negativas a Wright y hubo 2470 muestras negativas a las 2 técnicas.

Con estos datos se obtienen los siguientes valores:

	RB	WRIGHT
Sensibilidad	92,9%	91,8%
Especificidad	100%	96,4%
Valor Predictivo Positivo	40,4%	35%
Valor Predictivo Negativo	100%	99,8%

Epi 6

4.1.6.3 BPA y Wright:

Se compararon 2770 muestras, reaccionaron a ambas pruebas 228; 223 lo hicieron solamente con BPA; 92 lo hicieron con Wright únicamente y 2227 negativas para ambas pruebas. Se debe recordar que el título considerado para Wright es de 1/50.

Con estos datos se obtienen las siguientes medidas de concordancia con un intervalo de confianza del 95%:

	BAP	Wright
Sensibilidad	100%	98,6%
Especificidad	95%	94%

Valor Predictivo Positivo	100%	95,9%
Valor Predictivo Negativo	96,3%	95,4%
		Epi 6

4.1.7. Pruebas diagnósticas complementarias

4.1.7.1 2 Mercaptoetanol:

Todo animal cuyo suero reaccionó con título igual o mayor a 25 UI se consideró como positivo.

Reaccionaron 115 animales (4,20%) y negativos 2649 (95,91%); no se pudieron analizar 9 sueros (Gráfico 14). Con estos valores sacamos el ES; 2ES (trabajando con el 99% de significación) y el IC:

$$ES = \sqrt{4,19 \times 95,81 / 2762} = 0,38$$

$$2ES = 2,6 \times 0,38 = 0,99$$

$$IC = 3,21\% \text{ y } 5,19\%$$

Lo cual nos indica que la prevalencia de la brucelosis bovina, en la población susceptible del Partido de Tandil, se encuentra entre el 3,21% y el 5,19%

Discriminados por sexo hubo 1 toro fue positivo (0,85%) y 116 negativos (99,15%). En las vacas hubo 58 positivas (3,98%) y 1423 negativas (96,02%), los 9 sueros faltantes pertenecen a este grupo; y en las vaquillonas 56 positivas (4,81%) y 1107 (95,18%). Del total de animales positivos (4,2%), los toros representaron el 0,10%, las vacas el 50,86% y las vaquillonas el 48,27% (Gráfico 15).

De los 91 establecimientos testeados, hubo por lo menos un animal reactor con títulos iguales o mayores a 25, en 32 (35,16%) (Gráfico 16).

Sacando el ES, 2ES y el IC para los establecimientos (con 90% de significación):

$$ES = \sqrt{35,16 \times 64,84 / 91} = 5,00$$

$$2ES = 2 \times ES = 2 \times 5,00 = 10,01$$

$$IC = 25,15\% \text{ y } 45,17\%$$

La prevalencia de campos con animales reactores a brucelosis bovina en el Partido de Tandil, se halla entre el 25,15% y el 45,17%, con el 95% de significación.

4.1.7.1.1 Cantidad de animales positivos según la explotación a la que pertenecen

En el Partido de Tandil se analizaron animales de la explotación cría, tambo, mixta. Hubo campos donde la actividad productiva no se pudo establecer, a estos animales se los agrupó dentro la categoría "Sin Identificar" (Gráfico 17).

Cría

De los 506 animales pertenecientes a este tipo de explotación; hubo 21 positivos (4,17%), 483 negativos (95,83%) y 2 sin analizar porque el suero no alcanzó.

Para obtener el IC, debemos obtener el 2ES:

$$ES = \sqrt{4,17 \times 95,83 / 504} = 0,89$$

$$2ES = 2,6 \times 0,89 = 2,31$$

$$IC = 1,86\% \text{ y } 6,48\%$$

Esto significa que la población susceptible del partido de Tandil, dentro de la explotación cría, tiene una prevalencia de brucelosis bovina, entre el 1,86% y el 6,48%, con 99% de significación.

Tambo

De este tipo de explotación se recibieron 797 sueros, resultando positivos 34 (4,34%), negativos 750 (95,66%) y 13 no se pudieron analizar.

Con estos datos obtenemos, ES, 2 ES y el IC

$$ES = \sqrt{4,34 \times 95,66 / 784} = 0,73$$

$$2ES = 2,6 \times 0,73 = 1,90$$

$$IC = 2,44\% \text{ y } 6,24\%$$

Esto significa que la prevalencia de brucelosis bovina en la población susceptible, de la explotación tambo, en el Partido de Tandil se halla entre el 2,44% y el 6,24%, con un 99% de significación.

Mixtos

De este tipo de explotación se analizaron 1067, resultando positivos 46 (4,32%) y negativos 1019 (95,68%). No se pudieron analizar 2 muestras.

$$ES = \sqrt{4,32 \times 95,68 / 1065} = 0,62$$

$$2ES = 2,6 \times 0,62 = 1,61$$

IC = 2,71% y 5,93%

La prevalencia de la brucelosis bovina en la población susceptible de los establecimientos de producción mixta del Partido de Tandil se halla entre el 2,71% y el 5,93%, con un 99% de significación.

Sin identificar la producción

Se recibieron 401 muestras, 1 no se pudo analizar, fueron positivas 14 muestras (3,5%) y fueron negativas 386 (96,5%).

$$ES = \sqrt{3,5 \times 96,5 / 400} = 0,92$$

$$2ES = 2 \times 0,92 = 2,39$$

IC = 1,11% y 5,89%

La prevalencia de la brucelosis bovina en los animales susceptibles de este tipo de establecimientos del Partido de Tandil, se halla entre el 1,11% y el 5,89%, con un 99% de significación.

4.1.7.1.2 Prevalencia en establecimientos según la actividad

Se considera establecimiento positivo a aquel que tiene por lo menos un animal reactor positivo (Gráfico 18).

Cría

De los 20 establecimientos analizados en esta tesis, que pertenecían a esta actividad, 6 (30%) resultaron positivos y 14 (70%) negativos.

$$ES = \sqrt{30 \times 70 / 20} = 10,25\%$$

$$2ES = 2 \times 10,25\% = 20,5\%$$

IC = 9,5% y 50,5%

La prevalencia de brucelosis bovina en establecimientos que se dedican a la cría en el Partido de Tandil, se halla entre el 9,5% y el 50,5%, con un 95% de significación.

Tambo

Se recibieron muestras pertenecientes a 25 tambos, de los cuales fueron positivos 10 (40%) y los 15 restantes (60%) negativos.

$$ES = \sqrt{40 \times 60 / 25} = 9,80$$

$$2ES = 2 \times 9,80 = 19,6\%$$

IC = 20,4% y 59,6%

Significa que la prevalencia de la brucelosis bovina, en los tambos del Partido de Tandil, con una significación del 95% esta entre el 20,4% y el 59,6%.

Mixtos

De los 32 establecimientos que se recibieron para analizar pertenecientes a este tipo de producción, 12 (37,5%) resultaron positivos, y los restantes (62,5%) negativos.

$$ES = \sqrt{37,5 \times 62,5 / 32} = 8,89$$

$$2ES = 2 \times 8,89 = 17,78$$

IC = 19,72% y 55,28%

Se puede decir que la prevalencia de la brucelosis bovina en el Partido de Tandil, en los establecimientos de producción mixta se halla entre el 19,72% y el 55,28%, con una significación de 95%.

Establecimientos Sin Identificar

De los 14 establecimientos que se agruparon, 4 fueron positivos (28,57%) y 10 fueron negativos (71,43%)

$$ES = \sqrt{28,57 \times 71,43 / 14} = 12,07$$

$$2ES = 2 \times 12,07 = 24,14$$

IC = 4,43% y 52,71%

La prevalencia de la brucelosis bovina, en este tipo de establecimiento, en el Partido de Tandil, con un 95% de significación se halla entre el 4,43% y el 52,71%

4.1.7.2 Rivanol:

Los animales cuyo suero reaccionaron a esta prueba, se consideraron positivos con títulos iguales o mayores a 25 UI.

Del total de los sueros procesados 110 resultaron positivos (3,99%), 2646 negativos (96,01%) y 15 no se procesaron por carecer de los mismos (Gráfico 19); con estos valores sacaremos el ES, 2ES y el IC (con 99% de significación):

$$ES = \sqrt{3,99 \times 96,01 / 2756} = 0,37$$

$$2ES = 2,6 \times 0,37 = 0,96$$

$$IC = 3,03\% \text{ y } 4,95\%$$

Significa que la prevalencia de animales positivos, dentro de la población susceptible, a la brucelosis bovina en el Partido de Tandil se halla entre el 3,03% y el 4,95%, trabajando con el 99% de significación.

Hubo un toro positivo (0,9%), 55 vacas que reaccionaron en forma positiva (50%) y 54 vaquillonas (49,1%) (Gráfico 20).

Los establecimientos con animales reactivos suman 33 (36,26%) (Gráfico 21).

La prevalencia de campos reactivos es la misma que para 2 Mercaptoetanol.

Los resultados de animales por tipo de explotación a la que pertenecen y de establecimientos positivos por tipo de explotación es la misma que para el 2ME (Gráficos 17 y 18).

4.1.7.3 Fijación de Complemento

Se consideró todo suero con títulos de 1/10 o mayores como positivo.

La FC es una de las técnicas de mayor especificidad para el diagnóstico de la brucelosis animal, en esta tesis se hallaron 84 reactivos (3,03%), se consideró todo título igual o mayor a 1/10 (Gráfico 22). Usando la fórmula del $ES = \sqrt{3,03 \times 96,97 / 2770} = 0,33$ y el IC (con 99% de significación) =

$$2ES = 2,6 \times 0,33 = 0,85$$

$$IC = 2,18\% \text{ y } 3,88\%$$

Esto significa que la prevalencia de la brucelosis bovina, en la población susceptible del Partido de Tandil, se halla entre el 2,27% y el 3,89% con un 99% de significación.

4.1.7.4 Comparación entre pruebas definitivas

4.1.7.4.1 Test de 2 Mercaptoetanol vs. Fijación de Complemento.

Hubo 84 sueros que reaccionaron a las 2 técnicas, 32 fueron negativas a FC y positivas a 2 ME; 1 suero fue negativo a 2ME pero positivo a FC y negativos para ambas pruebas diagnósticas 2645. Con estos datos se obtienen valores de especificidad, sensibilidad y V.P.P y V.P.N. para ambas pruebas. (Intervalo de confianza del 95%).

	Fijación Complemento	2Mercaptoetanol
Sensibilidad	98%	98%
Especificidad	100%	99,8%
V.P.P.	98,8%	92,7%
V.P.N.	98,8%	98,3%
		EPI 6

Como se puede observar por estos datos ambas pruebas son muy buenas tanto en especificidad y Valores Predictivos, tanto positivos como negativos.

4.1.7.4.2 Test de Rivanol vs. Fijación de Complemento:

En estas 2 pruebas hubo 81 sueros positivos para ambas; 29 fueron negativas a FC pero positivas a Rivanol; 3 fueron negativas a Rivanol pero positivas a FC y 2643 negativas a ambas pruebas. De estos valores se desprenden los siguientes datos, (medida de asociación y un intervalo de confianza del 95%):

	Fijación Complemento	Rivanol
Sensibilidad	97,8%	97,9%
Especificidad	99,9%	99,6%
V.P.P.	96,4%	89,2%
V.P.N.	98,9%	98,4%
		Epi 6

DISCUSIÓN

Tomando los datos suministrados por SENASA (6) la prevalencia en distintas zonas de la provincia de Bs. As oscila entre 3,4% y el 12%. En los campos de cría determinó una prevalencia del 7,2%. El CEDIVE (156) determina una prevalencia del 76,56%. En estos trabajos no se aclara la metodología de trabajo ni forma de muestreo. En esta tesis se obtuvo una prevalencia a nivel individual del 3,99% para Rivanol, 4,2% para 2-Mercaptoetanol y del 3,03% para Fijación de Complemento. Estos niveles de prevalencia están muy cerca del valor aconsejado para intentar la erradicación, que se considera el 3% (121).

No hubo diferencias entre la cantidad de vacas y vaquillonas reactivas.

Existe un porcentaje muy bajo de toros serológicamente reactivos, pero no debemos olvidar que pueden existir toros que son negativos serológicamente pero eliminan brucelas por semen y orina, contaminando el ambiente (166). El contagio por parte del toro a las vacas susceptibles no se ha demostrado en experimentos

controlados, se sugiere que las proteínas catiónicas aisladas del mucus cervical proveen una primera barrera de defensa al útero contra la invasión de agentes patógenos. El semen usado en Inseminación Artificial puede ser un riesgo en los programas de mejoramiento, de ahí la importancia de control(12) .

La mayor prevalencia se observó en los establecimientos cuya producción es tambo; esto se explicaría porque, en los mismos hay una mayor hacinamiento de animales, con edades, sexos y estados fisiológicos diferentes; lo que favorecería que cualquier agente causal de enfermedades actúe sobre organismos estresados. Todos los factores como: diferentes medidas de manejo, sanitario, alimenticio, ambiental, etc. disminuyen las defensas(34) .

En la producción lechera el tipo más común de transmisión es la directa (1)(12)(24)(57)(151) , al contaminarse el medio ambiente; como por ejemplo con el uso de corrales comunes para la parición y durante la espera para el ordeño; lugares sucios con materia fecal y orina; convivencia de animales convalecientes de abortos, son entre otros, los factores de dispersión y permanencia de la brucelosis en este tipo de producción(1)(12) . La vía de entrada de la bacteria es por vía inhalatoria, exposición de las conjuntivas, contacto directo de la piel, inoculación intramamaria (máquinas de ordeño que no funcionan correctamente), tracto reproductivo y vía congénita (1)(12)(152)(153) . Otro factor a tener en cuenta son las moscas y ectoparásitos como posibles transmisores de esta enfermedad(25)(26)(151) .

El contagio a otras especies animales que no son huéspedes habituales de la *Brucella abortus* tiene gran importancia cuando se evalúan medidas de acción a tomar en un programa de control y a su vez estos animales pueden estar en contacto con el ser humano transmitiendo esta zoonosis(24) .

Teniendo en cuenta el tiempo de supervivencia de esta bacteria en el medio ambiente(1) , en algunos lugares o con algunos materiales está muy bien protegida y el estrecho contacto de los animales con estas sustancias contaminadas o lugares infectados del tambo; se comprende porque la mayor tasa de prevalencia en esta producción.

El uso de bacterinas comerciales puede producir, en los animales, una elevación de títulos que algunas veces pueden ser inespecíficos(166) .

A esto debemos sumarle el tamaño de los rodeos, a mayor número de animales mayor es la probabilidad de diseminar la enfermedad(12) .

En cuanto a la cría, se debe tener en cuenta la raza que está presente en la explotación analizada, porque las razas índicas tienen un periodo mayor de persistencia de títulos serológicos post vacunales que las razas europeas y criollas; y el diagnóstico puede ser positivo a 2 ME y FC hasta 198 días post vacunación para la segunda prueba y 224 días para la primera prueba. En cuanto a RB pueden persistir por más de un año los títulos residuales de una vacunación. Lo mismo ocurriría con hembras de raza indica vacunadas con dosis reducida(101) .

En este tipo de explotación, las grandes extensiones, la poca densidad animal por ha., el poco contacto animal-animal, los factores ambientales mas exigentes (temperatura, humedad, pH del suelo, luz solar, etc.), hace que la prevalencia en esta producción sea menor.

En la producción mixta se debe cuidar la compra de animales (origen de los mismos, estado sanitario del lugar de donde provengan), al tener diferentes categorías en el establecimiento no se debe descuidar a las categorías en edad de vacunar contra la brucelosis, ni desatender a las hembras en su momento más susceptible a contraer esta enfermedad (pubertad), mantenerlas en otro potrero de las vacas adultas, el parto de todas las hembras se debe realizar en potreros destinados a tal efecto.

Hubo un campo de los que la producción no se pudo identificar en el que los datos muestran una prevalencia de animales positivos a las distintas pruebas muy elevados: 60% a BPA; 48,48% a Rosa de Bengala, 54,54% a SAT, 48,48% a Rivanol, 2ME y en Fijación de Complemento, en este campo hay toros, vaquillonas y vacas, la infección está activa. Buscando información complementaria se descubrió que es un establecimiento que acopia animales para venderlos después, esto es un problema para un programa de control y/o erradicación pues algunos de estos animales pueden ir a campos de cría

Comparando las pruebas tamices (BPA y RB) da por resultado una mayor eficacia al usar el BPA, una de las pocas pruebas diagnósticas que tiene el 100% de sensibilidad, la especificidad es similar para ambas pruebas y el valor predictivo negativo es muy bueno para ambas pruebas, lo que nos asegura que los animales "no reactores" están realmente sanos. Estos resultados obtenidos, concuerdan plenamente con González Tome et al.(85) en cuanto al uso del BPA como prueba tamiz, para el diagnóstico de esta enfermedad, dada su alta sensibilidad.

Por otro lado se observó que hubo 2 sueros que resultaron negativos a RB pero fueron positivos a 2-Mercaptoetanol y Rivanol, en ambos casos con títulos de 25, por lo cual quedarían en el establecimiento 2 animales que por técnicas complementarias se descartan. Este es un inconveniente serio para la elección de una prueba tamiz(79)(80) . Siendo la brucelosis una zoonosis directa, es de suma importancia hacer conocer a todo el personal que está en contacto con animales o sus subproductos, de las características de la enfermedad, profilaxis y tratamiento precoz. Es de gran importancia para minimizar los riesgos de contagio extremar las medidas de higiene ambiental y personal(13) .

Es muy conveniente hacer grupos interdisciplinarios donde haya distintos especialistas para tratar este tema y otras zoonosis. Hacer un entrenamiento con bioquímicos y médicos para llegar a un diagnóstico eficaz de la brucelosis humana.

Otro factor importante para tener en cuenta es la Inspección de Productos Alimenticios, sobre todo en zonas rurales donde no hay Inspectores o hay venta de productos sin la autorización correspondiente, por ejemplo venta de leche cruda, quesos frescos, etc.

Un aspecto muy importante, pero difícil de cuantificar son las pérdidas indirectas que sufre el productor, entre las cuales no sólo está el cierre de mercados, menor precio de su ganado, etc., sino también el costo de mantener un vientre improductivo un año más, la contaminación del campo que será fuente potencial de contagio para otros animales.

4.2 JOVITA - SERRANO (PROVINCIA DE CÓRDOBA).

En esta zona se estudiaron 981 animales (8 toros y 973 vacas), los cuales se hallaban distribuidos en 28 tambos.

4.2.1. Animales reactivos a BPA:

Se analizaron 977 muestras; no hubo toros reactivos y hubo 152 (15,55%) vacas reaccionantes; resultando negativas 825 (84,44%) (Gráfico 23).

El intervalo de confianza para esta prueba (con 99% de significación) da por resultado: $2 ES = 2.6\sqrt{15,55 \times 84,44 / 977} = 3,02$; es decir que la prevalencia de reactivos a BPA en la población susceptible de Jovita - Serrano se encuentra entre el 12,53% y el 18,57%.

4.2.2 Tambos con animales reactivos a BPA:

De los 28 tambos estudiados, 6 (21,43%) no poseía ningún reactor a esta prueba y 22 (78,57%) tenían uno o más reactivos a esta prueba (Gráfico 24).

El intervalo de confianza para los tambos con animales reactivos a BPA (99% de significación): $78,57 \pm 3,58$; lo cual significa que la prevalencia de tambos con animales reactivos a BPA se encuentra entre 74,99% y 82,15% en las localidades de Jovita - Serrano.

4.2.3 Reactivos a la Prueba de Rosa de Bengala

Los sueros analizados por esta técnica fueron 965, de los cuales fueron reactivos 83 (8,60%), resultaron negativos 882 (91,40%) y no se analizaron 16 muestras por falta de suero (Gráfico 25).

Discriminados por sexo no hubo toros reaccionantes, y 83 (8,60%) vacas resultaron reactivas y 882 (91,40%) fueron negativas. 16 muestras no se analizaron por carecer de suero (Gráfico 26).

La tasa de prevalencia, para reactivos a RB, se halla entre los valores obtenidos con la siguiente fórmula: $2 ES = 2 \times \sqrt{8,60 \times 91,40 / 965} = 1,81$; lo que significa que la prevalencia para esta enfermedad en la población susceptible está entre el 6,79% y el 10,41% (con 95% de significación).

4.2.2.1 Tambos con animales reactivos a RB

Hubo 14 tambos positivos a esta prueba (50%)(Gráfico 27) y los 14 restantes no presentaron animales reactivos.

Para los tambos la tasa de prevalencia con una significación del 99% nos indica que: $2,6\sqrt{50 \times 50 / 50} = 18,38$; es decir, que la probabilidad que los tambos tengan animales reactivos a esta prueba en Jovita - Serrano se halla entre el 31,62% y el 68,38%.

4.2.4 Reactivos a la prueba de Wright:

Se consideró como animal positivo a todo aquel que tuviera 50 UI o más de título.

En el grupo de los toros no hubo ningún reactor.

89 (9,14%) vacas reaccionaron y 877 (90,04%) fueron negativas; no se pudieron analizar 7 muestras (Gráfico 28).

Con estos datos y con la fórmula de $ES: \sqrt{x \cdot q / n}$ y con un 95% de significación (2ES) obtenemos el intervalo de confianza para los reactivos a la prueba Lenta en Tubos: $9,14 \pm 1,84$ es decir que la prevalencia se halla entre 7,3% y 10,98%.

4.2.5 Tambos con animales reactivos a Wright:

Hubo 12 (42,86%) establecimientos sin animales reactivos a esta prueba. Los restantes 16 (57,14%) tuvieron por lo menos un animal reactor a esta prueba (Gráfico 29).

El intervalo de confianza para los tambos con animales reactivos a Wright (99% de significación), lo obtenemos de analizar la siguiente fórmula $2ES; 2,6\sqrt{57,14 \times 42,86/28} = 24,32$; lo que nos indica que la cantidad de tambos con animales susceptibles se haya entre el 32,82% y el 81,46%.

4.2.6. Comparación entre pruebas.

4.2.6.1 BPA y Rosa de Bengala:

Hubo 825 animales que no reaccionaron a ninguna de las pruebas; 54 que reaccionaron a BPA pero fueron RB negativos; 83 fueron positivos a BPA y también lo hicieron a RB, no hubo sueros que fueron positivos a RB y negativos a BPA.

Con estos datos se obtienen lo siguientes:

	BPA	RB
Sensibilidad	100%	94,5%
Especificidad	93,9%	92,0%
Valor Predictivo Positivo	60,6%	51,9%
Valor Predictivo Negativo	100%	99,4%

Epi 6

4.2.6.2 Wright y BPA:

Hubo 86 que reaccionaron a estas 2 pruebas; 60 muestras fueron reactivas a BPA pero no a Wright; no hubo muestras que reaccionaran a Wright y negativas a BPA y 825 muestras fueron negativas para ambos test. De estos valores se obtienen los siguientes datos (medidas de asociación y un intervalo de confianza del 95%):

	BPA	Wright
Sensibilidad	99,9%	98%
Especificidad	99%	97%
Valor Predictivo Positivo	100%	94,7%
Valor Predictivo Negativo	93,2%	91,3%

Epi 6

4.2.6.3 Rosa de Bengala y Wright:

Hubo 66 sueros que reaccionaron a ambas pruebas, negativas a ambas pruebas 861 muestras; hubo 7 muestras que reaccionaran a RB pero negativas a Wright y 16 muestras fueron reactivas a Wright pero negativas a RB.

Analizando estos datos obtenemos los siguientes valores:

	Wright	RB
Sensibilidad	90,5%	87%
Especificidad	99,2%	98,3%
Valor Predictivo Positivo	90,4%	80,7%
Valor Predictivo Negativo	98,2%	97,0%

Epi 6

4.2.7 Animales positivos a Rivanol:

Todos los animales que presentaron algún título se los consideró positivos.

Los sueros sometidos a esta prueba resultaron con títulos positivos 86 (8,80%), negativos 891 (91,20%) y no se pudieron analizar 4, lo que da un total de 981 animales (Gráfico 30).

En los 8 toros analizados no hubo positivos a esta prueba; en las 969 vacas, resultaron con títulos positivos 86 animales (8,88%) y sin títulos 883 (85,96%) animales (Gráfico 31)

El error por muestreo nos indica que el ES es igual a $\sqrt{8,80 \times 91,20/977} = 0,91$, como trabajamos con el 95% de significación tenemos 2 ES es decir = 1,82; lo que indica que la prevalencia a brucelosis en animales susceptibles se encuentra, en Jovita - Serrano, entre el 7,06% y el 10,62%.

4.2.7.1 Tambos con animales positivos a Rivanol

Estos animales con títulos positivos pertenecían a 14 (50%) tambos, de los 28 establecimientos estudiados (Gráfico 32).

Para determinar la prevalencia de tambos con animales positivos, los valores son los siguientes (con 99% de significación): $2,6\sqrt{50 \times 50/28} = 24,57$; es decir, que la prevalencia de tambos con animales positivos a Rivanol se halla entre 25,43% y 74,43%

4.2.8 Animales positivos a 2 Mercaptoetanol:

Se consideraron positivos todos los animales que presentaran títulos iguales o mayores a 1/25.

De los 981 animales, 3 no se pudieron analizar, de los restantes 978, 87 (8,89%) reaccionaron en forma positiva, hubo 891 (91,10%) muestras negativas. (Gráfico 33).

El error estándar lo obtenemos con los siguientes datos: $\sqrt{8,89 \times 91,10 / 978} = 0,91$, pero como trabajamos con el 95% de significación, debemos multiplicar al ES por 2; lo que nos da un valor de 1,82; por lo tanto, la tasa de prevalencia para la brucelosis bovina en la población susceptible de la zona de Jovita - Serrano se encuentra entre el 7,08% y el 10,72%.

4.2.8.1 Tambos con animales positivos a 2 Mercaptoetanol

Todos los animales positivos pertenecían a 14 (50%) tambos de los 28 estudiados (Gráfico 34).

Con estos datos se obtiene el intervalo de confianza, con 99% de significación; por lo cual se puede decir que la prevalencia de tambos con animales positivos a la brucelosis bovina en la zona de Jovita - Serrano se haya entre el 25,43% y el 74,43%.

4.2.9 Animales positivos a Fijación de Complemento:

Resultaron positivos a esta pruebas 78 (7,98%) sueros, todos ellos pertenecieron a vacas, no existiendo ningún toro positivo (Gráfico 35).

Trabajando con un 99% de significación, al error estándar lo debemos multiplicar por 2 (2ES) así obtenemos: $2,6 \sqrt{7,98 \times 92,02 / 978} = 2,62$; y podemos decir que la prevalencia de la brucelosis bovina en la población susceptible se halla entre 5,36% y 10,6%.

4.2.9.1 Tambos con animales positivos a Fijación de Complemento

Todos estos animales pertenecían a 14 (50%) tambos de los tambos muestreados (Gráfico 36).

Para los tambos el intervalo de confianza se obtiene con los siguientes valores, (con el 99% de significación)= $2,6 \text{ ES} \pm 50\%$; lo cual nos indica que, los tambos con animales positivos a la brucelosis bovina se halan entre el 25,44% y el 75,44%.

4.2.10 Comparación entre pruebas complementarias

4.2.10.1 Comparación entre 2 Mercaptoetanol y Fijación de Complemento:

Resultaron positivos a las 2 pruebas 78 muestras, no hubo muestras positivas a F.C. y negativas a 2 Mercaptoetanol, hubo 8 muestras positivas a 2 Mercaptoetanol y negativas a F. C. y resultaron negativas a ambas pruebas 891 muestras, con estos datos se obtienen los siguientes valores:

	F. C.	2 Mercaptoetanol
Sensibilidad	96%	95%
Especificidad	100%	99,5%
Valor Predictivo Positivo	100%	94,2%
Valor Predictivo Negativo	99,1%	98,2%
		Epi 6

4.2.10.2 Comparación entre FC y Rivanol:

Resultaron positivas a las 2 pruebas diagnósticas 78 muestras, positivas a Rivanol pero negativas a FC 8 muestras, no hubo sueros positivos a FC y negativos a Rivanol y 891 muestras fueron negativas a ambas pruebas.

Con estos datos se obtienen los siguientes datos de medidas de asociación con un intervalo de confianza del 95%:

	FC	Rivanol
Sensibilidad	100%	94,2%
Especificidad	99,1%	98,2%
Valor Predictivo Positivo	90,7%	82%
Valor Predictivo Negativo	100%	99,5%
		Epi 6

Con los datos obtenidos en este trabajo se hace el siguiente resumen, en cantidad de animales positivos a las pruebas diagnósticas y la cantidad de tambos con animales reactivos:

Prueba	Animales	IC	Tambos	IC
BPA	152(15,55%)		12,53-18,57 22(78,57%)	74,99-82,15
SAT	89 (9,14%)		7,30-10,98 12(42,86%)	32,82-81,46
RB	83 (8,60%)		6,79-10,41 14(50%)	31,12-68,38
Riv	86(8,80%)		7,06-10,12 14(50%)	25,43-74,43

2ME	87(8,89%)	7,08-10,72	14(50%)	25,43-74,43
FC	78(7,98%)	5,36-10,60	14(50%)	25,43-74,43

DISCUSIÓN

Se observa que la cantidad de establecimientos con animales reactivos a estas tres pruebas diagnósticas complementarias es muy superior al planteado en la hipótesis, con la que se trabajó en esta tesis (30%).

Los datos presentados en este trabajo (pág. 14) muestran un porcentaje de tambos sospechosos para la Prueba del Anillo en Leche muy inferior a estos datos.

La cantidad de animales reactivos para estas pruebas no difiere mucho de lo planteado inicialmente (10%).

Con esta prevalencia, la erradicación sería posible; iniciando el programa con el saneamiento con medidas combinadas: vacunación de todas las terneras entre los 3 y 10 meses, diagnósticos serológicos y la erradicación de los animales reactivos con el consiguiente reemplazo con animales con sanidad garantizada y la vigilancia epidemiológica a través del PAL (121).

Al iniciar el estudio en esta Cooperativa, la mayoría de los productores con los que se trabajó, indicaron que hacía mucho tiempo que no les sangraban los animales para hacer un diagnóstico serológico de brucelosis, una de las razones expuestas para la no realización de esta práctica sanitaria fue la desaparición de la bonificación por sanidad que cobraban.

Una práctica que se pudo observar es la crianza en común de terneras y vaquillonas compradas en distintos orígenes, para luego ir a distintos tambos de la zona; se mezclan animales de distintas edades (púberes, pre púberes y terneras), siendo las edades prepúberes y púberes donde son más susceptibles a contraer la infección (12); distintas condiciones corporales y estado sanitario (desparasitaciones, vacunaciones, etc.).

Al ser una Cooperativa recién formada por fusión de 2 preexistentes hubo y hay actualmente gran movimiento de animales entre tambos, y muchos de los tambos se intentan agrandar comprando animales de otras zonas donde hay mejor genética y como no controlan los productores a los animales al ingresar a los tambos, pueden diseminar la enfermedad. Muchos compran sus animales en ferias concentradoras donde hay convivencia de animales de distintas zonas y con distintos destinos.

La introducción de animales sin ningún tipo de control, pueden llevar al establecimiento brucelas (u otros patógenos); en algunos casos un biotipo de brucela que es muy virulenta y quiebra la inmunidad conferida por la vacunación(168)(169).

Según lo observado pocos productores tienen alguna precaución con las vacas que abortan (eliminación del rodeo), no se deshacen del feto (entierro), al dejarlo en el campo las moscas y otros insectos se alimentan de estos restos, transformándose en potenciales vectores de esta enfermedad(25). No hay lazaretos o corrales para las pariciones.

Consultando a los productores sobre si vacunaban a las terneras, todos lo afirmaron.

En esta zona la Inseminación Artificial no es una práctica común, recién ahora se está imponiendo.

Algunos tambos venden una parte de la leche de los ordeños diarios en forma directa al público, lo que ocasiona un gran peligro para los mismos, por ser esta enfermedad una zoonosis que se considera una Toxoinfección alimentaria(135).

Se observó el uso de vacas amas (viejas, problemas de patas, abortadoras, etc.) para la cría de terneros, si bien estos animales pueden contaminar a los animales que están criando, esta contaminación es temporaria(12).

Es común la convivencia de otras especies de animales (cerdos, canes, ovinos, caprinos, pájaros) junto con los bovinos; estas especies se alimentan de los restos producidos por los bovinos (comidas en los comederos, en el piso de los tambos), los cerdos hozan la materia fecal de los bovinos en busca del maíz; cuando hay un aborto bovino, los cerdos y perros los comen; los ovinos y caprinos pastorean y beben agua en común con las vacas que recientemente abortaron, si bien la brucelosis bovina es producida principalmente por *B. abortus*, los cerdos y cabras la padecen por *B. suis* y *B. melitensis*, estos actúan diseminando la *B. abortus* entre los bovinos(12).

Las características de la explotación tambera en cuanto a humedad, temperatura, etc.; favorecen la presencia de la brucela.

En esta zona las temperaturas ambientales son elevadas en verano y muy frías en invierno, lo que dificulta la supervivencia de *B. abortus* en el medio ambiente(1)(12), no obstante los valores de prevalencia obtenidas en este estudio, los factores ambientales no influyen notablemente en el control de esta enfermedad.

En esta Cooperativa existe un alto porcentaje de tambos que son Anillo en Leche Positivo (35%), estos datos concuerdan con los datos de la serología presentados en este trabajo, por lo que el uso de PAL como prueba de vigilancia epidemiológica es un método muy eficaz (18)(22)(69).

En este caso hubo 4 sueros que fueron negativos a Rosa de Bengala, pero 3 reaccionaron en forma positiva a 2ME (títulos de 1/25) y 4 fueron positivos a Rivanol con los mismos títulos

4.3 CORONEL MOLDES (PROVINCIA DE CÓRDOBA)

Aquí se trabajó con 2545 animales, repartidos en 37 tambos.

4.3.1 Reactores a BPA:

Del total de animales muestreados hubo 14 que no se analizaron por carecer de suero, resultando reactores 212 (8,38%) y negativos 2319 (91,62%)(Gráfico 37).

Para eliminar los errores por muestreo o los errores por el tamaño de la muestra se deberá sacar el ES $(\sqrt{8,38 \times 91,62 / 2531}) = 0,55$; pero como trabajamos con un 99% de significación al ES lo debemos multiplicar por 2,6; dándonos 1,43 y con este valor podemos definir el intervalo de confianza para la población susceptible que variará entre el 6,95% y el 9,81%.

No hubo toros reactores a esta prueba, dentro de la categoría vacas, se analizaron 1991 sueros, de ellos 126 (6,33%) resultaron reactores y de 528 vaquillonas, hubo 86 (16,29%) reaccionantes (Gráfico 38).

4.3.1.1 Tambos con animales reactores a BPA

Los 212 animales positivos a esta prueba estaban distribuidos en 30 (81,08%) tambos (Gráfico 39).

El ES para este estudio nos da como resultado: $\sqrt{81,08 \times 18,98 / 37} = 6,45$; como trabajamos con una significación del 99% debemos multiplicar al ES por 2,6 = 16,77; el intervalo de confianza, queda definido por el 64,31% y el 97,85%.

4.3.2 Animales reactores a Rosa de Bengala:

De los 2545 animales muestreados reaccionaron a esta técnica 119 (4,70%), resultaron negativos 2413 (95,30%) y 13 muestras no se analizaron (Gráfico 40).

Con la determinación de 2 ES sabremos entre que porcentajes se halla la máxima probabilidad del valor de prevalencia a la brucelosis bovina (con 99% de significación): $1,09 \pm 4,70$; la prevalencia a la brucelosis bovina en la población susceptible se halla entre el 3,61% y el 5,79%.

Analizados por sexo, los reaccionantes se dividen de la siguiente manera: no hubo toros reaccionantes; 65 (3,26%) vacas de 1996 muestras analizadas y de las 524 vaquillonas analizadas hubo 54 (10,31%) reactoras (Gráfico 41).

4.3.2.1 Tambos con animales reactores a Rosa de Bengala

Hubo 15 (40,54%) tambos sin reactores a esta prueba y 22 (59,46%) con reactores (Gráfico 42).

La prevalencia en los tambos se halla entre el 38,47% y el 80,45%, con una significación del 99%.

4.3.3 Animales reactores a Wright:

Para esta prueba se consideró animales reactores a todos los que poseían títulos de 50 UI o más.

Resultaron 335 animales (13,16%) reactores, siendo negativos 2210 (86,84%)

El intervalo de confianza (con un 99% de significación) para los animales reactores a Wright queda definido por la siguiente fórmula: $(2,6 \sqrt{13,16 \times 86,84 / 2531}) = 1,75$; desarrollando la fórmula el intervalo queda definido entre los valores de 11,41% y el 14,91%.

4.3.3.1 Tambos con animales reactores a Wright

Los animales reactores a esta prueba se hallan distribuidos en 30 (81,08%) tambos (Gráfico 43).

El intervalo para los tambos es igual al que nos da el BPA, porque el porcentaje de tambos con animales reactores es igual para esta prueba.

4.3.4 Comparación entre pruebas.

4.3.4.1 Comparación entre BPA y RB:

Se compararon estas 2 técnicas; reaccionando a ambas pruebas 112 muestras; no hubo muestras negativas a BPA y reactoras a RB; hubo 89 muestras que reaccionaron a BPA y negativas a RB y 2313 muestras negativas para ambas pruebas.

Con estos valores se obtienen las siguientes medidas de asociación y un intervalo de confianza del 95%.

	BPA		RB
Sensibilidad	100	%	98%
Especificidad	97%		97%
Valor Predictivo Positivo	100%		95,9%
Valor Predictivo Negativo	96,3%		95,4%
			Epi 6

4.3.4.2 Wright y BPA:

Reaccionaron a ambas pruebas 128 muestras, 189 muestras Wright no lo fueron a BPA; no hubo muestras positivas a BPA que fueran negativas a Wright y negativas a ambas pruebas 2787 muestras.

Estos datos nos dan una medida de asociación y un intervalo de confianza del 95%:

	BPA	WRIGHT
Sensibilidad	100%	96,4%
Especificidad	92,9%	91,8%
Valor Predictivo Positivo	40,4%	35%
Valor Predictivo Negativo	100%	99,8%
		Epi 6

4.3.5 Pruebas complementarias

4.3.5.1 Animales positivos a Rivanol:

De las 2545 muestras remitidas no se analizaron 17 muestras por carecer de volumen par realizar la prueba; hubo 91 (3,60%) muestras positivas, y fueron negativas 2437 (96,40%) (Gráfico 44).

El intervalo de confianza (con 99% de significación) da un valor de 2,64% y el 4,56%.

De todas las muestras analizadas que resultaron positivas, 50 (2,61%) fueron de vacas y de vaquillonas 41 (7,76%) (Gráfico 45).

4.3.5.1.1. Tambos con animales positivos a Rivanol

Hubo 20 (54,05%) tambos con animales negativos a esta prueba y 17 (45,95%) con animales positivos (Gráfico 46).

El intervalo de confianza para los tambos da por resultado; valores extremos 29,56% y 62,34%.

4.3.5.2 Animales positivos a 2 Mercaptoetanol:

A esta prueba hubo 91 (3,58%) sueros que fueron positivos a esta prueba y 2454 negativos (96,42%)(Gráfico 47).

El intervalo de confianza queda con valores extremos, trabajando con un 99% de significación; 2,58% y 4,54%; entre estos valores se halla la prevalencia a la brucelosis bovina en esta zona de la Pcia. de Córdoba.

No hubo toros positivos a esta técnica. Hubo 50 (54,95%) vacas y 41 (45,05%) vaquillonas que fueron positivas (Gráfico 48) del total de animales positivos.

4.3.5.2.1 Tambos con animales positivos a 2ME

Los tambos que poseían uno o más animales positivos a esta prueba sumaron 17 (45,95%) y hubo 20 (54,05%) con animales negativos (Gráfico 49).

El intervalo para los tambos con animales positivos es el mismo que para Rivanol.

4.3.5.3 Fijación de Complemento:

Del total de muestras analizadas, 87 (3,56%) resultaron positivas; considerando como positiva a toda muestra que presente un título de 1/10 o mayor y 2444 negativas (96,56%) y sin analizar 14 (Gráfico 50).

La prevalencia, con el 99% de significación, se halla entre el 2,46% y el 4,38%.

Analizando por sexo, no hubo toros positivos; en las categoría vacas hubo 50 (2,52%) y en las vaquillonas hay 37 (7,10%) positivas (Gráfico 51).

4.3.5.3.1. Tambos con animales positivos a FC

Los animales positivos estaban distribuidos en 17 tambos (45,95%) (Gráfico 52).

La prevalencia entre tambos está dentro del intervalo de confianza determinado por los siguientes valores: 29,56% y 62,34%.

4.3.6 Comparación entre Pruebas Complementarias

4.3.6.1 Comparación entre Rivanol y F.C.

Hubo 76 sueros positivos a las 2 pruebas, 2 sueros positivos a Fijación pero no a Rivanol; 15 sueros fueron positivos a Rivanol pero no a F.C.. y 2435 negativos para ambas pruebas. Con estos datos se obtienen los siguientes valores:

	F. C.	Rivanol
Sensibilidad	97,4%	90,2%
Especificidad	99,4%	99,0%

Valor Predictivo Positivo	83,5%	73,9%
Valor Predictivo Negativo	99,9%	99,7%
		Epi 6

4.3.6.2 Comparación entre Fijación de Complemento y 2 Mercaptoetanol:

85 sueros resultaron positivos para ambas pruebas, 1 suero resultó positivo a FC pero no a Mercaptoetanol, 14 sueros resultaron positivos a 2 Mercaptoetanol pero no a FC y 2436 fueron negativos a ambas pruebas.

De estos datos se obtienen los siguientes valores, con un intervalo de confianza del 95%.

	F.C..	2 Mercaptoetanol
Sensibilidad	98,8%	92,8%
Especificidad	99,4%	99,0%
Valor Predictivo Positivo	85,9%	77,1%
Valor Predictivo Negativo	100%	99,7%
		Epi 6

Resumiendo los datos obtenidos de animales reactivos positivos a las distintas pruebas y cantidad de establecimientos de donde provenían:

Prueba	Animales	IC	Tambos	IC
BPA	212 (8,38%)	6,95-9,81	30 (81,08%)	64,31-97,85
SAT	335 (13,16%)	11,41-14,91	30 (81,08%)	64,31-97,85
RB	119 (4,70%)	3,61-5,79	22 (59,46%)	38,47-80,45
Riv	91 (3,60%)	2,64-4,56	17 (45,95%)	29,56-62,34
2 ME	91 (3,58%)	2,58-4,54	17 (45,95%)	29,56-62,34
FC	87 (3,42%)	2,46-4,38	17 (45,95%)	29,56-62,34

DISCUSIÓN

Este trabajo basado en la detección serológica, arroja datos diferentes a los presentados oportunamente en la Pcia. de Córdoba que indicaban el 10,74 y el 19,87% de tambos sospechosos para la Prueba del Anillo en Leche (6)(18).

La enfermedad está muy difundida, no tanto a nivel de animales, cuya prevalencia individual, cercana al 3% estaría indicando que no sería muy difícil intentar el control y erradicación.

Cuando se esta en la etapa de erradicación, toman importancia los animales que son hijas de hembras positivas y resultan persistentemente infectadas, esta infección no puede ser prevenida por la vacunación, la infección puede ocurrir en el útero o por leche proveniente de hembras infectadas(12)(30). Esta infección es más frecuente de lo que anteriormente se creía y en el curso de la enfermedad el diagnóstico temprano es dificultoso y esto puede presentar serias dificultades para la eliminación de la brucelosis bovina de estos rodeos(12).

En las vacas la *Brucella abortus*, se acantona en diversos órganos; uno de ellos es la glándula mamaria y allí sobrevive dentro de los macrófagos de esta glándula. Una de las posibles explicaciones para esto es por la inhibición de la vía oxidativa que tienen los macrófagos; las reacciones oxígeno dependiente de los neutrófilos bovinos son los responsables de la actividad bactericida de estas células contra la *Brucella abortus*. Las cepas lisas, son más resistentes que las rugosas a la destrucción por oxidación realizada por los neutrófilos. Otra posible explicación de la sobrevivencia de la *Brucella abortus* que le permite replicarse en los macrófagos de la glándula mamaria inhibiendo la fusión de estas células(45). De esto se desprende que las medidas higiénicas para el ordeño, tratamiento de mastitis y otras actividades relacionadas con la ubre de un animal enfermo son indispensables; y el consumo de este producto debe realizarse después de ser pasteurizado.

En esta Cooperativa no hay mucho movimiento interno de animales, los tambos no tienden a incorporar más animales con el fin de agrandarse y aquellos que por una razón u otra desaparecen, venden los animales a otros productores, no influyendo la compra de animales de otras zonas. Cuando estas se realizan se efectúan en el campo, siendo muy pocos productores que acuden a las ferias.

La presencia de un alto número de establecimientos infectados favorece que los animales que se hallan allí o que ingresen se contaminen en forma directa o indirecta (1)(12)(24)(150).

Si bien las terneras, que son vacunadas están protegidas, al permanecer en medios muy contaminados se pueden enfermar; ya que la cantidad de bacterias existentes en el medio ambiente podría superar las defensas otorgadas por la vacuna. Según los datos presentados por Alexander et al.(23) la cantidad de bacterias eliminadas al medio ambiente después de un aborto son muy grandes como afectar la sanidad de un rodeo. Al criar animales púberes en campos contaminados es muy factible el contagio(12)(21)(35). Recordemos que uno de los factores que afectan la virulencia de esta bacteria es el tamaño del inóculo(1). La *Brucella abortus* penetra al organismo por diferentes vías (digestiva, piel, mucosas, etc.); todavía no se ha demostrado el contagio por aerosoles en los

bovinos, esto si se ha demostrado en el ser humano de allí el peligro para el que manipula animales o subproductos de animales enfermos (12)(27)(28) .

Existe una correlación positiva entre el número de vacas infectadas que paren o abortan en un campo con el número de vacas que subsecuentemente desarrollaran brucelosis(169) . Una exposición después de un periodo que va entre 2 y 6 meses de la vacunación probablemente resulte en animales detectados a los 12 meses de la vacunación. A medida que la exposición se aleja más de la vacunación los riesgos de enfermarse son menores.

Datos obtenidos en esta Cooperativa indican que los Médicos Veterinarios tienen función estrictamente clínica; no asesoran ni participan en decisiones de tipo empresarial. El manejo preventivo sanitario, en algunos casos no existe. Sólo se realiza alguna desparasitación (estacional) y a los animales algunas veces se les coloca algún complejo vitamínico mineral inyectable.

Hay convivencia de otras especies animales, las cuales pueden contagiar a los bovinos por distintas razones: una de ellas es que son especies que se enferman con otras especies de brucelas (*B. melitensis* y *suis*) las cuales pueden infectar a los bovinos. A su vez estas especies pueden estar contaminadas con *B. abortus* y eliminar estos agentes al medio y enfermar a los bovinos(12).

En esta zona se ha observado que está aumentando el número de animales salvajes lo que podría influir sobre los datos de prevalencia, haciéndolos aumentar si estos están en contacto con restos de abortos y luego actuarían como vectores(12)(168). Estos animales no solo son fuente de contaminación para el bovino, sino también para el ser humano(168).

5 CONCLUSIONES

La brucelosis bovina es una enfermedad erradicable, como lo ha sido en otros países, y a nivel nacional, en algunos establecimientos. Sin embargo, está mucho más difundida a nivel establecimiento que lo que debería estarlo, a pesar de que la vacunación es obligatoria desde más de 15 años en el país.

Esto demuestra que deben extremarse las medidas de manejo a fin de tratar de eliminar la dispersión de la enfermedad dentro y entre los rodeos, con medidas de vacunación, diagnóstico serológico y eliminación de animales reactivos. La vacunación como única arma no es suficiente y deben sumársele las medidas de control y manejo ya expuestas en el desarrollo de esta tesis.

Debe controlarse la convivencia de los bovinos y otras especies, a fin de evitar el contagio interespecífico.

La vacunación debe realizarse a todas las terneras entre 3 y 10 meses de vida.

Las pérdidas económicas deben ser mayores que las oficialmente reconocidas, pues en ellas no se tiene en cuenta las que ocasiona la enfermedad en cuanto a la pérdida de mercados, ni problemas de Salud Pública.

Debe existir un control estricto a nivel municipal de la venta de productos lácteos y subproductos, pues en muchos casos se consume estos productos sin ningún tipo de control.

Se debe realizar una política de Educación Sanitaria a todo nivel, donde se expliquen los peligros que esta enfermedad acarrea.

ANEXO 1

PRUEBAS DE LABORATORIO

(Adaptado del Manual de procedimientos del SENASA)(163)

Prueba en tubos (Método de Wright)

Se emplea cuando se quiere conocer el contenido de anticuerpos de *Brucella* en el suero, en términos de Unidades Internacionales por 1 ml. (UI).

Detecta la presencia de IgM e IgG.

1) Reactivos para la prueba:

- Antígeno, previamente estandarizado y mantenido en concentración de 4,5% de brucelas. (En la prueba se usa al 0,045%). El que se prepara agregando a 100 ml. de solución salina fenolada 1 ml. de antígeno.

- Solución salina fenolada, la cual se prepara de la siguiente manera: en un litro de agua destilada se colocan 8,5 gr.. de ClNa. y 5 ml. de fenol.

- Suero problema.

2) Elementos necesarios:

- Tubos de 13 x 100 mm.

- Gradillas portatubos.

- Pipetas de 10 ml. graduadas al 1/10 o jeringas automáticas dosificadas de 1 ml.

- Pipetas de Bang (Huddleson).

- Estufa o baño María a 37,5 °C.

3) Técnica:

- a) Se colocan tantos tubos de 13 x 100 mm., en la gradilla, como diluciones a efectuarse.
- b) Con una pipeta de las anteriormente mencionadas, se carga el suero hasta sobrepasar la graduación superior. Con una toalla de papel limpiar el extremo de la pipeta, manteniéndola en posición vertical hasta enrasar la posición 0. Se inserta la pipeta hasta el fondo del primer tubo de una hilera de 4 tubos y dejar que fluya 0,08 ml. de suero; usando la misma técnica se coloca 0,04 ml. en el segundo, 0,02 ml. en el tercero y 0,01 ml. en el cuarto tubo.
- c) Con una pipeta o jeringa automática se agrega a cada tubo 2 ml. de antígeno preparado en punto 1, mezclar bien agitando la gradilla.
- d) La dilución del suero en el primer tubo es 1/25; en el segundo es 1/50, en el tercero 1/100 y en el cuarto 1/200.

4) Incubación:

La prueba se incuba a 37,5°C durante 42 a 48 horas.

5) Lectura:

En días claros se colocan los tubos frente a la ventana, a la altura de la vista. En caso de haber poca luz natural se realiza contra un fondo oscuro, negro opaco, con una luz fuerte que atraviese los tubos.

6) Interpretación:

Las reacciones se clasifican en:

COMPLETAS: identificadas con (+). Es aquella en que el líquido de la mezcla suero antígeno aparece claro y la agitación suave no rompe los grumos.

INCOMPLETAS: identificadas con (I). Es aquella muestra en la que la mezcla suero-antígeno es parcialmente clara y una suave agitación no rompe los grumos.

NEGATIVAS: identificadas con (-). Es aquella en que la mezcla suero-antígeno no aparece clara y una suave agitación no revela grumos.

Antígeno Brucélico Bufferado. BPA. Para prueba serológica tamiz.

1) Instrumental necesario:

- Gradillas para acomodar muestras de sangre.
- Pipetas de 0,2 ml. en graduaciones de 0,01 ml. o especialmente graduadas, pipetas de Bang.
- Caja de lectura de unos 45 cm. de largo por 35 cm. de ancho y 15 cm. de profundidad, provista de una placa de vidrio marcada con 60 cuadrados de 16 cm² (4x4) en seis filas de 10, que se sostiene cerca de la parte superior de la caja para que pueda sacarse y ponerse fácilmente. Esta debe tener iluminación de modo que la luz incida oblicuamente y por debajo, en la mezcla de suero y antígeno. El interior de la caja debe ser negro opaco. La caja estará provista de una tapa para evitar que la muestra se evapore con demasiada velocidad.
- Gotero de antígeno: debe estar calibrado de tal manera que distribuya exactamente 0,03 ml.. Estos deben probarse inicialmente, vertiendo en posición vertical 100 gotas de antígeno en una probeta graduada de 5 ml. Un gotero apropiado debe dar 3 ml. por cada 100 gotas.
- Mezclador para mezclar el suero con el antígeno, se utilizan palillos o un mezclador de alambre grueso doblado en tal forma que cubra una superficie de 15 mm. El mezclador debe ser enjuagado con agua y secado entre cada prueba.
- Heladera (4 a 8 °C) o freezer (-20°C), para almacenar las muestras hasta su procesamiento.
- Centrífuga de 3000 r.p.m. para separar el suero de las muestras de sangre.

2) Ejecución de la prueba:

Previo a la realización de la prueba, la placa, el suero y el antígeno deben estar a temperatura ambiente (18 a 26 °C), unos 40 minutos.

Agitar suavemente el antígeno durante 5 minutos. Si el suero estuviera congelado, descongelarlo y mezclarlo bien, invirtiendo el tubo (o envase) varias veces.

- a) Colocar la placa sobre el aglutinoscopio.
- b) Con una pipeta Bang en posición de 45° y apoyada sobre la placa de vidrio, se depositan 0,08 ml. de suero.
- c) Con el gotero en posición vertical y desde una altura de 3 cm. se deja caer una gota de antígeno (0,03 ml.) sobre el suero.
- d) Se mezcla bien el suero con el antígeno, abarcando una superficie circular de 3 cm. de diámetro.
- e) Se retira la placa de vidrio y se hacen 3 o 4 movimientos rotatorios para homogeneizar bien la mezcla.

- f) Se coloca la placa sobre el aglutinoscopio y se tapa, permaneciendo la luz apagada.
- g) Se efectúa una nueva rotación, pasados 5 minutos.
- h) A los 8 minutos, rotando de nuevo la placa y con la luz encendida, se procede a la lectura.

3) Interpretación:

Las reacciones se clasifican en:

POSITIVAS: cuando se forman grumos, aún siendo finos.

NEGATIVAS: cuando la mezcla suero-antígeno es de turbiedad homogénea.

El reactivo deberá ser mantenido a una temperatura , desde su elaboración hasta su uso, entre 4 y 8°C, evitando su congelación, ya que la misma modifica su sensibilidad.

Prueba del 2-Mercaptoetanol

La prueba se basa en la propiedad de los compuestos químicos con grupos sulfhidrilos como el 2-mercaptoetanol, de inactivar las inmunoglobulinas M.

El Mercaptoetanol es sensible a la luz y al calor; se deteriora rápidamente por exposición al aire. Se debe conservar en frascos color ámbar herméticamente cerrados y en refrigeración.

1) Reactivos:

- a) Antígeno para la prueba de seroaglutinación en tubos SAT.
- b) Solución de Mercaptoetanol (ME) 0,1 Molar.

Se prepara una solución de 2-Mercaptoetanol agregando 7,80 ml. de 2-Mercaptoetanol a 992,20 ml. de sol. de Cl. Na. al 0,85%. No se utiliza salina fenolada. Esta preparación puede conservarse una semana en la heladera y luego debe ser descartada.

2) Preparación del antígeno:

Se utiliza el antígeno de la prueba de aglutinación en tubo diluido al 2% en sol. salina fisiológica (0,09% en la prueba).

3) Equipo necesario:

El mismo que para la prueba de aglutinación en tubo (SAT).

4) Técnica:

En la práctica de rutina la prueba del 2-Mercaptoetanol se realiza simultáneamente con la prueba de aglutinación lenta en tubo.

La técnica del 2-Mercaptoetanol se realiza de la siguiente manera:

- a) Se coloca una hilera de 4 ó 5 tubos de 3 x 100 mm.
- b) Con una pipeta de 0,2 ml. (preferentemente, la pipeta de Bang) se carga suero hasta sobrepasar el límite superior. Con una toalla de papel absorbente se limpia el extremo de la misma y, manteniendo ésta en posición vertical sobre la pared del tubo que contiene la muestra, dejar gravitar el suero hasta que el fondo del menisco en el interior de la pipeta esté nivelado con la graduación tope. Insertar la pipeta hasta el fondo del primer tubo de la hilera, depositar 0,08 ml. de suero y retirar la pipeta. Utilizando el mismo procedimiento, echar 0,04 ml. de suero en el segundo tubo; 0,02 ml en el tercer tubo; 0,01 ml. en el cuarto y 0,005 en el quinto tubo.
- c) Incluir un suero control conocido con actividad aglutinante negativa a la prueba del 2-Mercaptoetanol.
- d) Con una jeringa automática de 2 ml. o con pipeta de 10 ml., agregar 1 ml de solución 0,1 M y mezclar bien agitando la gradilla
- e) Dejar las gradillas con las mezclas durante una hora a temperatura ambiente y agregar a cada tubo 1 ml. de antígeno de tubo diluido al 2% (0,09%) en solución salina fisiológica. Mezclar bien agitando la gradilla y cada tubo por separado.

5) Incubación y lectura:

La prueba del Mercaptoetanol se incuba, se observa y se lee de igual forma que la prueba de aglutinación en tubos. Los tubos deben ser controlados de cerca para verificar el aclaramiento. Ocasionalmente, el tubo de la dilución 1:25 puede estar ligeramente opaco, mientras que los tubos subsiguientes están claros. Si esto sucede la prueba es positiva.

6) Interpretación:

Esta prueba se realiza siempre en forma paralela y simultánea con la prueba de aglutinación en tubo. La diferencia de títulos finales de ambas pruebas se interpreta como la capacidad aglutinante del suero debido a la presencia de Ig M.

La presencia de Ig G se asocia, generalmente, con infección activa, por lo que toda la reacción en esta prueba debe ser considerada como indicativa de infección.

Los animales vacunados ocho o más meses antes de la realización de la prueba suelen tener solamente anticuerpos sensibles al Mercaptoetanol. Los animales reaccionantes a ésta prueba se deben considerar infectados aunque tengan antecedentes de vacunación, siempre que esta haya sido efectuada 8 meses antes.

Los resultados negativos a esta prueba no son excluyentes porque en el periodo inicial de la enfermedad la mayoría de los anticuerpos presentes son del grupo Ig M.

Prueba del Rivanol:

La prueba del Rivanol se basa en la precipitación de la albúmina y las macroglobulinas por la acción del lactato de 2 etoxi-6-9-diamino acridina (Rivanol).

1) Equipos y reactivos necesarios:

- a) Antígeno para la prueba de Rivanol.
- b) Solución de Rivanol al 1%.
- c) Tubos de ensayo 13 x 100 mm.
- d) Pipetas serológicas Bang.
- e) Placa de vidrio dividida en cuadrados de 3,5 cm. de lado.
- f) Caja aglutinoscopio con fondo negro.
- g) Palillos agitadores o agitadores múltiples.
- h) Gotero calibrado para 0,03 ml/gota.
- i) Reloj de laboratorio.
- j) Centrífuga.

2) Técnica:

a) El suero problema, el antígeno y la solución de Rivanol deben estar a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de realizar la prueba.

b) En un tubo pequeño (13 x 100 mm), depositar 0,4 ó 0,5 ml. del suero problema. Agregar 0,4 ó 0,5 ml. de solución de Rivanol y mezclar bien agitando el tubo y dejar a temperatura ambiente no menos de 10 minutos y no más de una hora.

c) Centrifugar las mezclas a 1000g (aproximadamente 2000 r.p.m. en un cabezal de 23 cm. de radio total hasta el extremo del porta tubo), durante 5 a 10 minutos.

d) Con una pipeta serológica Bang, aspirar el sobrenadante y hacer una prueba de aglutinación semejante a la reacción de Huddleson. En una placa de vidrio clara y limpia, depositar cantidades de 0,08; 0,04; 0,02 y 0,01 ml.

e) Agregar una gota (0,03 ml.) de antígeno de Rivanol a cada cantidad de líquido sobrenadante, mezclar con un palillo mondadientes o agitador múltiple, comenzando por la cantidad más pequeña (0,01 ml). Cada dilución debe ser extendida de forma que cubra la superficie indicada para la prueba estándar de aglutinación en placa (18, 21, 24 y 27 mm. respectivamente).

f) Si se usa agitador metálico, enjuagarlo y secarlo bien antes de usarlo en la muestra siguiente.

g) Inclinar la placa imprimiéndole movimientos circulares y haciéndola girar 4 veces. Preparar el reloj para que suene a los 12 minutos.

h) Transcurridos 6 minutos, girar 4 veces la placa en la forma indicada en el punto anterior. A los 12 minutos rotar nuevamente la placa y efectuar la lectura con luz indirecta sobre fondo negro.

3) Interpretación:

Para facilitar las lecturas y la comparación con los resultados en otras pruebas se acepta denominar a las diluciones obtenidas como de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, respectivamente.

El resultado se expresa en función de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

Cualquiera sea el título de reacción, se interpreta como infectado, ya que la prueba solamente detecta anticuerpos del grupo IgG en la misma forma que la prueba del Mercaptoetanol.

El Rivanol puede causar cierta precipitación de inmunoglobulinas IgG, por lo cual el título final puede ser inferior al obtenido con la prueba de Mercaptoetanol.

Técnica de Fijación de Complemento

1) Instrumental y reactivos necesarios

- Tubos de ensayo de vidrio borosilicato, de 10 x 75 mm.
- Erlenmeyers de capacidad: 500 ml y de 1000 ml.
- Pipetas de: 1 ml , 2ml , 5ml y 10 ml.

- Gradillas para tubos de 10 x 75 mm.
- Probetas de: 2000 ml. y de 1000 ml.
- Jeringas de 2 ml. de flujo continuo.
- Otros recipientes de volúmenes varios.
- Freezer (-20°).
- Refrigeradora.
- Centrífuga refrigerada tipo Sorvall RC-3, con cabezal H6- L4.
- Baño María.
- Espectrofotómetro tipo Coleman Junior II, modelo 6/20 con adaptador apropiado.
- Reactivos
- Hematíes de oveja.
- Hemolisina (producida en conejo).
- Complemento de cobayo.
- Buffer Veronal.
- Solución fisiológica.
- Solución Alsever.
- Solución Richardson.

Introducción

La prueba de fijación del complemento se utiliza cada vez más para el diagnóstico de la brucelosis en el hombre y los animales.

El sistema indicador de la prueba está compuesto por hematíes de oveja , suero antihematíes de oveja preparado en conejo y suero fresco de cobayo.

El método que se presenta aquí está basado en la unidad hemolítica 50% tomando como modelo la reacción de Maltaner descrita por Wadsworth. En esta prueba, el complemento se titula según la fórmula de von Krogh para determinar la cantidad necesaria de complemento para obtener un 50% de hemólisis.

La unidad hemolítica del sistema (1 C'H = 1 unidad hemolítica 50% del complemento) es la cantidad de complemento necesaria para lizar el 50% de 67 millones de hematíes de oveja, adecuadamente sensibilizados con suero antihematíes de oveja preparado en conejo (hemolisina) en volumen total de 1ml.

El punto crítico del sistema está en la titulación correcta del complemento y de los demás reactivos que intervienen, para asegurar que las determinaciones se puedan reproducir cada día con exactitud.

Si no hay advertencia expresa en contrario, todas las diluciones se hacen en solución tope isotónica utilizando solución salina tope con veronal y ácido barbitúrico (SVB), con veronal y ácido clorhídrico (SVC) o con ácido bórico (SSB) (ver apéndices , 2 y 3).

La cristalería debe ser lavada con especial esmero; cuidándose de que no queden restos de detergentes. A veces es necesario emplear solución sulfocrómica y enjuagar varias veces las piezas con agua destilada para restituirles su transparencia original. Para evitar que el suero y otros reactivos se sequen en la cristalería, se sumergirán en agua corriente todos los elementos utilizados (tubos, pipetas, etc.) inmediatamente después de su uso.

Estandarización de los reactivos.

Los reactivos del sistema hemolítico (hematíes, hemolisina y complemento) se estandarizan por el método espectrofotométrico en cubetas calibradas de 10 x 75 mm. (medidas interiores) utilizando un espectrofotómetro Coleman Jr. II, modelo 6/20 con adaptador apropiado. Las pruebas diagnósticas de fijación del complemento se hacen en tubos de ensayo comunes de 10 x 75 mm. El volumen final de las reacciones es de 1 ml.. Cuando se omite uno o más componentes, se completan los volúmenes a 1 ml. con solución salina tope.

Estandarización de la suspensión de hematíes de oveja

Úsele sangre de oveja colectada en solución de Alsever no menos de 5 días antes y conservada en refrigeración.

Se filtra la sangre a través de una gasa y se deposita en un tubo de centrífuga graduado de 40 ml..

Por cada 10 ml. de sangre se obtienen, aproximadamente, 2 ml. de hematíes aglomerados, cantidad suficiente para preparar 70 ml. de una suspensión que contenga $6,7 \times 10^8$ hematíes/ml. (equivalente a la suspensión al 2,8%).

Se centrifuga la sangre a 1000 x g. (aproximadamente 2000 RPM en centrífuga con cabezal de 30 cm.) durante 5 min.. Se descarta el sobrenadante, tratando de arrastrar los leucocitos que forman una capa amarillenta en la parte superior de la columna de hematíes. Se resuspende los hematíes en sol. salina tope y se repiten los lavados 4 veces.

La centrifugación del 4º lavado se hace por 10 minutos a 1000 x g.. Se determina el volumen de la columna de glóbulos y se calcula la cantidad de sol. salina tope necesaria para hacer una suspensión al 3% aproximadamente.

Se colocan 0,2 ml. de la suspensión de hematíes en 2 cubetas de 10 x 75 y se agrega a cada una 2,8 ml de agua destilada. Una vez lisados los hematíes, se leen las densidades ópticas contra blanco de agua destilada. Cuando se emplea el mismo instrumento, el método espectrofotométrico permite obtener los mismos resultados en pruebas repetidas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la densidad óptica (DO) de la oxihemoglobina varía mucho según el instrumento que se emplee, aún tratándose de la misma marca y modelo. Cualquier densidad óptica recomendada en la literatura debe ser usada solamente como guía. Cada laboratorio deberá determinar experimentalmente la DO para su propio instrumento.

Estandarización de la hemolisina

La hemolisina (suero antihematíes de oveja) es una mezcla de anticuerpos de alto (1000000) y baja (165000) peso molecular. Las hemolisinas con preponderancia en anticuerpos de alto peso molecular tienen mayor capacidad para sensibilizar los hematíes para la acción del complemento. Aquellas con predominio de anticuerpos pequeños son menos eficaces.

Las hemolisinas se preparan inmunizando conejos con hematíes de ovejas lavados, o con estromas de hematíes de oveja. La hemolisina preparada según el último procedimiento suele tener alta actividad hemolítica y títulos de aglutinación bajos, por lo que se prefiere este método. Para titular la hemolisina se prefiere el método de la meseta, que mide la cantidad de hemólisis producida por varias diluciones de hemolisina en presencia de una cantidad limitada de complemento.

La titulación de la hemolisina se debe hacer cada vez que se prepara un nuevo lote de la dilución 1:100 y cada vez que se usa un nuevo lote de células de ovejas. Cuando los resultados se grafican en papel aritmético milimetrado, la curva mostrará, si hay una concentración suficiente de hemolisina, que las cantidades crecientes de hemolisina no producen aumentos significativos del porcentaje de hemólisis, lo que constituye una meseta. La primera porción de esta meseta representa la cantidad de hemolisina suficiente para una sensibilización óptima de los hematíes de oveja.

Preparación de hematíes sensibilizados para las titulaciones de complemento y antígeno y para la prueba diagnóstica.

A un volumen de hematíes al 2,8%, se le agrega un volumen de la dilución óptima de hemolisina y agítese en torbellino rápidamente.

Se deja incubar durante 15 minutos a 25 °C.

Titulación del complemento (en cantidades triples)

El complemento debe titularse cada vez que se realiza la prueba. Para la titulación, se procede en la forma siguiente:

- 1) Se preparan los hematíes sensibilizados.
- 2) Se rotulan 11 tubos de serología y se colocan en una gradilla.
- 3) Se prepara una solución de complemento 1:40 y de ella, una dilución 1:400. Se debe usar SVB fría y mantener la dilución 1:40 en refrigeración.
- 4) Se agregan los reactivos en las cantidades y el orden que sigue:

	Titulación		Hemól.Comp. Bco								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sol.tope	1,95	1,80	1,65	1,50	1,35	1,20	1,05	1,40	1,4	1,4	2,4
SVB fría											
Comp. Dil 1:40		-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Comp. Dil 1:400		.45	.6	.75	.9	1.05	1.2	1.35			
Hematíes sensib	.6	.6	.6	.6	.6	.6	.6	.6	.6	.6	.6

A) Mezclar bien e incubar 30 minutos a 37 °C

B) Enfriar en baño de agua fría

DO	.02	.12	.24	.32	.38	.44	.45	.46	.45
	3	2		6	5				
% de Hemol.	5	27	53	72	85	97	00	00	00
Rel. Y/(100-Y)	.05	.37	1.15	2.52	5.7				

5) se agitan los tubos y se colocan en el baño María a 37 °C por 30 min.. Se agitan nuevamente a los 15 minutos de incubación.

6) Se sacan los tubos del baño y se sumergen en agua fría para detener la reacción.

7) Se centrifugan a 1000 x G durante 5 minutos (preferiblemente en centrífuga refrigerada a 4 °C).

8) Se transfieren los sobrenadantes a cubetas 10 x 75 mm. y se hacen las lecturas de la DO en un espectrofotómetro Coleman Jr.

9) Se determina el porcentaje de hemólisis en cada tubo relacionando su DO con la DO de los tubos de hemólisis total (tubos 8,9 y 10).

10) Se calcula la relación Y(100-Y). Se colocan los valores obtenidos sobre el eje horizontal de un papel logarítmico doble (2 x 2) y sobre el eje vertical, las cantidades correspondientes de complemento al 1:400 utilizado. Se descartan los valores correspondientes a porcentajes de hemólisis inferiores al 10% o superiores al 90%.

11) Se unen los puntos por medio de una recta y se traza una línea horizontal en el punto que esta línea intercepta la vertical "1" (10) de papel. Se lee la cantidad de complemento gastado, la que corresponde a una unidad hemolítica 50%.

12) En las pruebas diagnósticas se emplean 5 unidades.

13) Se determina la pendiente de la línea. Para ello, se mide 10 cm. desde cualquier punto de la línea hacia la derecha. Sobre el extremo derecho de los 10 cm. se traza una vertical y sobre ella se mide la distancia hasta las curva de titulación (recta sobre el papel logarítmico). Este valor debe ser de alrededor de 2 cm. (de 1,80 a 2,20 cm.), lo que equivale a una pendiente del 20%.

Las pendientes mayores del 20% se deben generalmente a error técnico, exceso en la concentración de hemáties o la fragilidad de éstos.

Titulación del Antígeno

Para titular el antígeno se hacen diluciones seriadas de un suero inmune específico contra diluciones seriadas del antígeno. El volumen total en cada tubo es de 1 ml..

Luego de la titulación con las diluciones expresadas , se puede hacer un ajuste más fino estrechando la relación entre las diluciones límites satisfactorias.

En la práctica se procede de la forma siguiente:

a) Se colocan 0,2 ml. de cada dilución de sueros en los tubos previamente rotulados.

b) Se agregan 0,2 ml. de cada dilución de antígeno a los tubos correspondientes que contienen las diluciones del suero y a los controles del complemento. En el lugar del antígeno, se agregan 0,2 ml. de SVB a los controles del suero. Se agregan los volúmenes apropiados de SVB a los controles del complemento. se agitan los tubos y se dejan reposar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.

c) Se agregan 0,4 ml. de complemento frío que contenga 5 C'H50 a cada tubo con el suero y el antígeno. Se agregan los volúmenes de complemento apropiados a los controles de complemento.

d) Se agitan bien todos los tubos y se colocan en la heladera de 15 a 18 horas.

e) Se sacan los tubos de la heladera y se preparan células sensibilizadas.

f) Se agregan 0,2 ml. de células sensibilizadas cada uno de los tubos de la prueba se incuban en baño María durante 30 minutos, agitando una vez a los 15 minutos.

Se centrifugan, durante 15 minutos a 600 x g, todos los tubos que no presenten lisis y se lee la DO óptica en el espectrofotómetro y/o por comparación con los patrones de hemólisis.

h) La dilución óptima de antígeno es definida como aquella dilución que produce lecturas de nivel máximo de fijación con el antisuero específico. En la interpretación de cada titulación de antígeno, es conveniente trazar una línea - conocida como la curva de dilución óptima - que una los puntos finales de 30% de hemólisis (interpolando, si es necesario) de cada dilución de antígeno que no tenga actividad anticomplementaria.

Cada lote de antígeno debería ser titulado con sueros de títulos altos y bajos de anticuerpos. En la práctica se ha observado que para el diagnóstico de la brucelosis, una dilución de 1:300 del antígeno para la prueba en tubo de buenos resultados y que los distintos lotes están siempre alrededor de dicho valor (antígeno particulado de concentración final 0,015%).

Prueba Diagnóstica

- 1) Se prepara una dilución 1:5 del suero en SVB en cantidad suficiente para la prueba y los controles. Se inactiva el suero en esta dilución durante 30 minutos a 60°C.
- 2) Después que la dilución del suero se ha enfriado a la temperatura ambiente, se preparan diluciones mayores del suero en razón 2 (por lo general hasta completar cuatro diluciones). Los sueros hiperinmunes requieren diluciones mayores.
- 3) Se transfiere 0,2 ml. de cada dilución a los tubos de prueba y controles correspondientes.
- 4) Se agregan 0,2 ml. de la dilución óptima d antígeno a los tubos correspondientes de dilución de suero y a los controles de complemento. El antígeno debe ser fresco preparado en SVB fría.
- 5) Se agregan 0,2 ml. de SVB en lugar del antígeno a los controles de suero, y los volúmenes correspondientes de SVB a los controles de complemento.
- 6) Se preparan con SVB fría la dilución de complemento que contenga 5 C'H50 en 0,4 ml.. Se mezcla muy suavemente para evitar la formación de espuma y se agrega inmediatamente 0,4 ml. a los tubos de la prueba y al control de 5 C'H50 del complemento. Se agrega 0,2 ml. a los controles de 2,5 unidades y 0,1 ml. a los controles de 1,245 unidades.
- 7) Se agitan manualmente las gradillas de tubos para mezclar el complemento. Se incuba la prueba y los tubos de control a 4 - 6 °C durante 15 - 18 horas.
- 8) Se prepara el control de los hematíes de oveja colocando 0,8 ml de SVB en un tubo seco.
- 9) Se saca la prueba de la heladera y se agrega 0,2 ml. de células sensibilizadas a todos los tubos, incluyendo el control de células rojas. Se agitan los tubos para asegurar la suspensión uniforme de las células y se incuba en baño María 37 °C durante 30 minutos (agitar a los 15 minutos).
- 10) Se sacan las gradillas del baño María y se enfría en baño de agua helada, se centrifugan todos los tubos que no muestren lisis completa.

Resumen de los resultados

- 1) Se leen los controles de complemento por comparación con los patrones de hemólisis. Si los controles de SVB no están dentro de los límites aceptables, los resultados de la prueba no son válidos.
- 2) El suero se registra como anticomplementario, si los controles de la dilución menor del suero muestran menos del 75% de hemólisis. Cuando se encuentra actividad anticomplementaria del suero es necesario tomar una nueva muestra para esta prueba. Si se ha probado la actividad anticomplementaria del suero en las dos primeras diluciones, el laboratorista no tiene otra elección que informar el suero como anticomplementario. En los casos especiales en que se establecen fuertes diferencias entre los títulos de fijación y de actividad anticomplementaria, se pueden informar como positivos con la reserva de que el título es aproximado.
- 3) Si todos los controles son satisfactorios, se leen los tubos de la prueba por comparación con los patrones del 20, 30 y 40% de hemólisis. El punto final de las titulaciones de suero es la dilución más alta que muestre el 30% o menos de hemólisis.

Si bien las pruebas diagnósticas son leídas o como positivas o negativas a cualquier dilución, los valores numéricos que se dan a continuación pueden ser usados para registrar los resultados en las diluciones de sueros.

Porcentaje de hemólisis (preferido)	Valor numérico (tradicional)
0	4
30	3
50	2
75	1
90	±
100	-

- 4) En los métodos usuales para informar los resultados de la prueba se aplica cualquiera de estas procedimientos.

Recomendación

Se considera conveniente que esta técnica sea utilizada en aquellos establecimientos sin manifestaciones clínicas de la enfermedad, con un bajo porcentaje de reaccionantes y donde exista una permanencia de títulos 1/25 (25 UI) a la prueba de 2 Mercaptoetanol, en un número reducido de animales.

ANEXO 2 GRÁFICOS

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 GARCIA- CARRILLO, C; LUCERO, N.E.. Enfermedades de los Bovinos. Brucelosis Bovina. Heditorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, 1.993.
- 2 O.M.S. Clasificación Internacional de Enfermedades, 9a Edición. 1.975. Washington D.C., Organización Panamericana de la Salud. (Publicación Científica, 353) 1.978.
- 3 DE KRUIF, P.. Los cazadores de Microbios. pp.258. Editorial Claridad. Buenos Aires, 1.938.
- 4 SYFRES, B.. "Historia y distribución de la Brucelosis en el mundo". Rev. Inst. Nac. Hig., 7:(1-2): 37-39, 1974.
- 5 CEDRO, V.C.F.; CISALE, H.O.; CACCHIONE, R.A.; de BENEDETTI, L.M.E.. Brucelosis. Algunos aspectos de la Brucelosis bovina. Rev. Invest. Ganaderas. 10:349-368, 1.968.
- 6 MANETTI, J.C.. Brucelosis. Diagnóstico de Situación y pérdidas económicas. SENASA. Programa de lucha contra la brucelosis. Diagnóstico de situación.
- 7 CORBEL, M.J.. Report of the ICBS Subcommittee on Taxonomy of Brucella. Inst. J. Syst. Bacteriol. 38:450. 1.988.
- 8 JACQUES, J; OLIVIER-BERNARDIN, V. y DUBRAY, G.. Induction of antibody and protective responses in mice by Brucella O-polysaccharide-BSA conjugate. Vaccine, Vol.9 pp. 896-900. December, 1.990.
- 9 ENRIGHT, F.. Brucellosis. In Bacterial Pathogenesis. Thoen ed. 1.993.
- 10 Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis (1.986). Sexto Informe. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos, 740.
- 11 SAMARTINO, L.E. y ENRIGHT, F.M.. Pathogenesis of abortion of Bovine brucellosis. Comp. Immun. Microbiol. infec. Diseases. Vol.16,Nº2, pp.95-101, 1.993.
- 12 NICOLETTI, P.. The Epidemiology of Bovine Brucellosis. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. Vol.24,pp.69-98. 1.980.
- 13 EAGLESOME, M.D. and GARCIA, M.M.. Microbial Agents Associated with Bovine Genital Tract Infections and Serum. Part I. Brucella abortus, Leptospira, Campylobacter fetus and Tritrichomonas foetus. Veterinary Bulletin, Vol.62, Nº8, pp.743-910, August, 1.985.
- 14 CORBEL, M.J.. Recent Advances in the Study of Brucella Antigens and their Serological Cross-Reactions. Veterinary Bulletin. Vol. 55, Nº12, pp.927-942. December, 1.985.
- 15 STEVENS, M.G.; HENNAGER, S.C.; OLSEN, S.C. and CHEVILLE, N.F. Serologic Responses in Diagnostic Test for Brucellosis in Cattle Vaccinated with Brucella abortus 19 or RB 51. Journal of Clinical Microbiology. Vol.32, Nº4, pp.1065-1066, Apr. 1.994.
- 16 LAMB, V.L.; JONES, L.M.; SCHURIG, G.G. and BERMAN, D.T.. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Bovine Immunoglobulin Subclass Specific Responses to Brucella abortus lipopolysaccharides. Infection and Immunity. Vol.26, Nº1, pp.240-247, October, 1.979.
- 17 GARCIA-CARRILLO, C.. Animal and Human BRUCELOSIS in the Americas. O.I.E. pgs.29, 1.990.
- 18 COLLA, C.D.. Relevamiento de Brucelosis en tambos de la Provincia de Córdoba. Dpto. San Justo. Mediante la Prueba del Anillo en Leche Ring Test. Ciencia Veterinaria, Nº19, pp.5-8. Marzo 1.993.
- 19 SPATH, E.J.A.; GONZALEZ, R.N.; GONZALEZ de RIOS, L.; CONDRON, R.J.; NOGUES, E.M.; GUGLIELMONE, A.A.; KUNE, G.I.; BROADBENT, D.W.; HABICH, G.E.. Estudios sobre Sanidad Animal en el N.O. Argentino. V Brucelosis, Tuberculosis, Tricomoniasis y Vibriosis en Tambos de Tucumán y otras características sanitarias y de explotación de estos. Gaceta Veterinaria. pp. 504-518. 1.979.
- 20 BAKOS, E.. Evolución del porcentaje de animales reaccionantes a brucelosis en la Provincia de Chaco. Su relación con la vacunación obligatoria. Vet. Arg. Vol. VIII. Nº76, pp.400-404. Agosto de 1.991.
- 21 VASCONCELLOS, S.A.; HONMAITO, F; CORTES, J.D.A. Bases para A Prevencao Da Brucelose Animal. Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, Vol.11, Nº1, pp.25-36, 1.987.
- 22 SZYFRES, B. y DUREN, A.. Investigación sobre la presencia de Brucella en la leche de abasto de la Ciudad de Azul, Argentina. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, pp.391-395, Mayo, 1.966.
- 23 ALEXANDER, B.; SCHNURRENBERGER, P.R.; BROWN, R.R.. Numbers of Brucella abortus in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows. Veterinary Record, 108:500, 1.981.
- 24 FORBES, L.B.. Brucella abortus infection in 14 farms dogs. JAVMA. Vol.196, Nº6. pp.911-916, March 15, 1990.
- 25 CHEVILLE, N.F.; ROGERS, D.G.; DEYOE, W.L.; KRAFSUR, E.S.; CHEVILLE, J.C.. Uptake and excretion of Brucella abortus in tissues of the face fly (Musca autumnalis). Am. J. Vet. Res., Vol. 50, Nº8, pp.1302-1308. August, 1.989.
- 26 GODOY, A.M.; PERES, J.N.; BARG, L.; COSTA, J.O.. Ixodidae como reservatorio de brucelose animal. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Nº37, pp.369-375, 1.985.
- 27 COMMUNICABLE DISEASE CENTER ZONOSSES SURVEILLANCE. BRUCELOSIS. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service Annual Brucellosis. Summary, 1.965. August, 1.966.
- 28 NATIONAL COMMUNICABLE DISEASE CENTER ZONOSSES. Surveillan-ce. Brucellosis. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Bureau of disease Prevention and Environmental Control. Annual Brucellosis Summary, 1.966. June, 1.967.
- 29 CORDES, D.O. and CARTER, M.E.. Persistence of Brucella abortus infection in six herds of cattle under brucellosis eradication. New Zealand Veterinary Journal, Nº27, pp.255-259, 1.979.
- 30 CRAWFORD, R.P.; HUBER, J.D.; SANDERS, R.B.. Brucellosis in heifers weaned from seropositive dams. JAVMA, Vol.189, Nº5, pp. 547-549, September 1, 1.986.
- 31 DOLAN, L.A.. Latent carriers of brucellosis. The Veterinary Record 106:241-243, March 15, 1.980.

- 32 LAPRAIK, R.D.. Latent bovine brucellosis. *Veterinary Record*, 111:578-579, December 18/25, 1.982.
- 33 WINTHROP, C.R.; BROWN, R.R.. STRINGFELLOW, D.A.; SCHURRENBERGER, P.R.; SCANLAN, C.M.; SWANN, A.I. Bovine brucellosis: An investigation of latency in progeny of culture-positive cows. *JAVMA*, Vol.192, N°2, pp.182-186, January 15, 1988.
- 34 CONFER, A.W.; HALL, S.M.; ESPE, B.H.. Transient enhancement of the serum antibody response to *Brucella abortus* strain 19 in cattle treated with levamisole. *Am. J. Vet. Res.*, Vol.46, N°12, pp.2440-2443, December 1.985.
- 35 WILKINSON, R.; CARGILL, C. and LEE, K.. Humoral and Cell Mediated Immune Responses in Non-pregnant Heifers Following Infection and Vaccination with *Brucella abortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 18:379-383, 1.988.
- 36 CAMPERO, C.M.; LADDS, P.W.; HOFFMAN, D; DUFFIELD,B.; WATSON, D. and FORDYCE,C.. Immunopathology of Experimental *Brucella abortus* Strain 19 Infection of the genitalia of Bulls. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 24:235-246, 1.990.
- 37 ENRIGHT, F.M.; WALKER, J.V.; JEFFERS, G; DEYOE,B.L.. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus* infected bovine fetus. *Am. J. Vet. Res.*, Vol.45, N°3, pp.424-430, March, 1.984.
- 38 KLESZIUS, P.H.; KRAMER, T.T.; SWAN, I.A.; CHRISTENBERRY, C.C.. Cell-Mediated Immune Response After *Brucella abortus* S19 Vaccination. *Am. J. Vet. Res.* Vol.39, N°5, pp.883-886, May, 1.978.
- 39 SUTHERLAND, S.S.. Immunology of bovine brucellosis. *The Veterinary Bulletin*. Vol.50, N°5, pp.359-368, May 1.980.
- 40 WYCKOFF III, J,H, and CONFER, A.W.. Immunomodulation in cattle immunized with *Brucella abortus* Strain 19. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 26:367-383, 1.990.
- 41 BERTRAM, T.A.; CANNING, P.C. and ROTH, J.A.. Preferential Inhibitions of Primary Granule Release from Bovine Neutrophils by a *Brucella abortus* Extract. *Infection and Immunity*. Vol.52, N°1, pp.285-292, Apr. 1.986.
- 42 KANEENE, J.M.; JOHNSON, D.W.; ANDERSON, R.K.; ANGUS, R.D.; DIETZ, D.E.; MUSCOPLAST, C.C.. Specific Lymphocyte Stimulation in Cattle Naturally Infected with strain of *Brucella abortus* and Cattle Vaccinated with *Brucella abortus* Strain 19. *Am. J. Vet. Res.* Vol.39,N°4. pp.585-589. April, 1.978.
- 43 CONFER, A.W.; HALL, S.M.; FAULKNER, C.B.; ESPE, B.H.; DEYOE, B.L.; MORTON, R.J. and SMITH, R.A.. Effects of Challenge dose on the Clinical and Immune Responses of Cattle vaccinated with Reduced Doses of *Brucella abortus* strain 19. *Veterinary Microbiology*, 10:561-575, 1.985.
- 44 PLACKETT, P.; ALTON, G.G.; CARTER, R.B. and CORNER, L.A.. Failure of a Single Dose of *Brucella abortus* Strain 19 Vaccine to Protect Cattle When Given Early in Calfhood. *Australian Veterinary Journal*. Vol.56, pp. 409-412. September, 1.980.
- 45 HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M.. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am J Vet Res*, Vol. 49, N°7, pp.1.092-1.097, July 1.988.
- 46 MACH, J.P. and PAHUD, J.J.. Secretory Ig A a Major Immuno-globulin in Most Bovine External Secretions. *The Journal of Immunology*. Vol.106, N°2, pp.552-563. February 1.971.
- 47 BEH, K.JV.. Quantitive Distribution of *Brucella* Antibody amongst Immunoglobulin Classes in Vaccinated and Infected Cattle. *Rev. vet. Sci.* 17:1-4,1.974.
- 48 MALAMUT, J.C.. Brucellosis bovina: Diagnóstico e Interpretación. *Vet. Arg.* Vol. IV, N°32, pp.126-133, Abril de 1.987.
- 49 CAMPERO, C.M. y ODEON, A.C.. Respuesta Serológica en terneras vacunadas con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Vet. Arg.* Vol. III, N°29, pp.850-858, Noviembre de 1.986.
- 50 NIELSEN, K. and DUNCAN, J.R.. Antibody Isotype Response in Adult Cattle Vaccinated with *Brucella abortus* S19. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 19:205-214, 1.988.
- 51 PATTERSON, J.M.; DEYOE, B.L.; STONE,S.S.. Identification of Immunoglobulins Associated with Complement Fixation, Agglutination, and Low pH Buffered Antigen test for Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* Vol.37,N°3, pp.319-324, March, 1.976.
- 52 BRINLEY MORGAN, W.J.. The Serological Diagnosis of Bovine Brucellosis. *The Veterinary Record*. Vol.80, N°21, pp.612-620, May 27th, 1.967.
- 53 BRICKER, B.J.; TABATABAI, L.B. and MAYFIELD J.E.. Immunoglobulin G Binding Activity of *Brucella abortus*. *Molecular Immunology*, Vol.28,N°1/2; pp.35-39, 1.991.
- 54 TENDERDY, R.P.; AMEGHINO,E. and RIEMANN. Serological responses of rams to a *Brucella ovis*-vitamin E adjuvant vaccinated. *Vaccine*. Vol.9, pp.273-276. April, 1991.
- 55 CORNER, L.A. and ALTON, G.G.. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Research in Veterinary Science* 31:342-344,1.981.
- 56 COHEN, N.D.; CARTER, G.K.; McMULLAN, W.C.. Fistulous withers in horses: 24 cases (1.984-1.990).*JAVMA*, Vol.201,N°1, pp.121-124, July 1; 1.992.
- 57 SAMARTINO, L.E. and ENRIGHT, F.M.. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strain of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 53, N°3, pp.359-363. March, 1.992.
- 58 BOLTON, W.D.; DURRELL, W.B.; WADSWORTH, J.R.; MURRAY, E.W.. A Survey of Abortion in Vermont Dairy Cattle. *JAVMA*, Vol.55, N°3, pp.500-503. August 1, 1.969.
- 59 KIRKBRIDE, C.A.. Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diag. In-vest.* 5:64-68, 1.993.
- 60 KIRKBRIDE, C.A.. Abortive diseases of cattle: their significance and prevalence. *Veterinary Medicine. Small Animal Clinical*, pp. 1151-1155. August 1.979.

- 61 KIRKBRIDE, C.A.; BICKWELL, E.J.; REED, D.E.; ROBE,M.G.; KNUDTSON, W.V.; WOHLGEMUTH,K.A..A Diagnostic Survey of Bovine Abortion and Stillbirth in the Northern Plains States. JAVMA, Vol.162, N°7, pp.556-560,April 1, 1.973.
- 62 TOBIAS, L.; SCHURIG, G.G.; CORDES, D.O.. Comparative behaviors of Brucella abortus strains 19 and RB 51 in the pregnant mouse. Research in Veterinary Science, 53:179-183,1.992.
- 63 MANTRENCAR, A.; NJANPOP, B.M.; YAYA, A.; NJOYA, A. and TULASNE, J.J.. Problems associated with tuberculosis and brucellosis skin-test methods in Northern Cameroon. Preventive Veterinary Medicine. 15:221-229, 1.993.
- 64 BERCOVICH, Z.; LAGERDIJK, W. and BOKHOUT, B.A.. Evaluation of a Delayed - type Hipersensitivity Test for the Diagnosis of Brucella abortus Infection in Cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology. 21:213-218, 1.989.
- 65 CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Antigeno para pruebas de Aglutinacion. BRUCELOSIS. Nota Tecnica N°3 Revision 3, 22 pag., Ramos Mejia, Buenos Aires, 1.969.
- 66 GARCIA-CARILLO, C.. Métodos para el diagnóstico de la Brucelosis. Gac. Vet.32:661-667, Buenos Aires, 1.970.
- 67 CRENOVICH, H. y ZAMORA, A.. Relevamiento de Brucelosis en los rodeos lecheros de la Cuenca Mar y Sierras. Sus conclusiones e implicaciones. Vet. Arg. Vol.V,N°45,pp.425-428, Julio de 1.988.
- 68 CEDRO, V.C.F.; CISALE, H.O.; CACCHIONE, R.A..Investigación de la brucelosis bovina por la prueba del anillo en leche (Ring Test). Control sanitario de la Brucelosis desde las usinas pasteurizadoras. Rev. de Vet. Militar. Dcción. Gral.de Remonta y Vet. Vol.IV,N°16. pgs.18. Enero-Febrero de 1.956. Ejército Argentino.
- 69 CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. BRUCELOSIS. Técnica de Seroaglutinación. Nota Técnica N°2. Rev.1. Org. Panamericano de la Salud. O.M.S.. Ramos Mejía, Buenos Aires. Abril de 1968.
- 70 Mac MILLAN,A.P.; COCKREM, D.S.;. Reduction of non-specific reactions to the Brucella abortus serum agglutination test by the addition of EDTA. Research in Veterinary Science,38:288-291, 1.985.
- 71 GARIN,B.; TRAP, D.; GAUMONT,R.. Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. The Veterinary Record, 117:444-445, October 26, 1.985.
- 72 BOWDEN, R.A. y PENNIMPEDE, E.F.F.. La prueba de Wright para brucelosis en presencia de EDTA disminuye las reacciones inespecíficas. Su aplicación. Rev. Med. Vet.. Vol. 69,N°1, pp.44-48, Bs. As., 1.988.
- 73 ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; Mc PHERSON, G.G.. The serological Diagnosis of Bovine Brucellosis: An Evaluation of the Complement Fixation, Serum Agglutination and Rose Bengal Tests. Australian Veterinary Journal, Vol. 51, pp.57-63, February, 1.975.
- 74 SUTHERLAND, S.S.; LE CRAS, D.V. and ROBERTSON, A.G.. A study of cattle infected with Brucella abortus and which showed aberrant serological reactions. Australian Veterinary Journal, Vol.59, pp.132-135. November, 1.982.
- 75 NICOLETTI, P. and MURASCHI, T.F.. Bacteriologic Evaluation of Serologic Test Procedures for the Diagnosis of Brucellosis in Problem Cattle Herds. Am. J. Vet. Res. Vol.27, N°118, pp.689-694, May 1.966.
- 76 CORBEL, M.J.. Characteriation of Antibodies Active in the Rose Bengal Plate test. The Veterinary Record, pp.484-485, April 22nd, 1.972.
- 77 DAVIES, G.. The Rose Bengal Test. The Veterinary Record, pp.447-449, April 24th, 1.971.
- 78 JACOBO, R.A.. Rosa de Bengala. Técnica de elección para un primer muestreo serológico. Vet. Arg. Vol.II, N°19, pp.870-874, Noviembre de 1.985.
- 79 DI LORENZO, C.L. y PENNIMPEDE. El valor del Test de Rosa de Bengala como prueba tamiz. Vet. Arg. Vol. IV,pp.250-254, Mayo de 1.987.
- 80 CORBEL, M.J. Studies on the Mechanism of The Rose Bengal Plate Test for Bovine Brucellosis. Br. Vet. J. 129:157-166.
- 81 BRINLEY MORGAN, W.J.; Mac KINNSON, D.J.; IAWSON, J.R. and CULLEN, G.A.. The Rose Bengal Plate agglutination test in the Diagnosis of Brucellosis. The Veterinary Record, 85:636-640, 1.966.
- 82 HUNTER, D. AND ALLEN, J.. An Evaluation of Milk and Blood Test Used to Diagnose Brucellosis.The Veterinary Record. 91:310-312. September 23rd., 1.972.
- 83 TIMBS, D.V.; DIGBY, J.G. and DOE, I.. The relationship between the brucellosis and the Complement Fixation test used in the brucellosis Erradication Scheme. New Zealand Veterinary Journal. 26:67-70, 1.978.
- 84 MOYER, N.P.; EVINS, G.M.; PIGOTT, N.E.; HUDSON, J.D.; FARSHY, C.E.; FEELEY, J.C. and HAUSLER JR., W.J.. Compararison of Serologic Screening Test for Brucellosis. Journal of Clinical Microbiology, Vol.25, N°10. pp.1.969-1.972. Oct. 1.987.
- 85 GONZALEZ TOME, J.S.; VILLA, L.J.; del PALACIO, E.; GREGO-RET,R.. El test de Angus y Barton (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la breucelosis bovina. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 70, N°1; pp.34-36, 1.989.
- 86 CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Prueba de Fijación del Complemento para el Diagnóstico de la Brucelosis. GARCIA-CARRILLO, C. Nota Técnica N°24, 30 pgs., 1.981.
- 87 TIMBS, D.V.; MOXHAM, J.W. and LIBERONA, H.E.. The use of automated complement fixation techniques in the brucellosis Erradication Scheme. New Zealand Veterinary Journal 26:52-56, 1.978.
- 88 MacKINNSON, D.J.. The Complement fixation Test in Brucellosis. Bull. Off. Int. Epiz. 60:383-400, 1.963.
- 89 RUPPANNER, R.; MEYER, M.E.; WILLEBERG, P.; BEHYMER, D.E.. Comparison of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Other Tests for Brucellosis, Using Sera from Experimentally Infected Heifers. Am. J. Vet. Res., Vol.4,N°8, pp.1.329-1.332, August, 1.980.
- 90 NIELSEN, K.. The serological Response of Cattle Immunized with Yersinia enterocolitica O:9 or O:16 to Yersinia and Brucellosis abortus Antigens in Enzyme Imunoassays. Veterinary and Immunopathology, 24:373-382, 1.990.

- 91 HECK, F.C.; NIELSEN, K.H.; WILLIAMS, J.D.; CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.. Sensitivity of serological methods for detecting antibody in vaccinated and non-vaccinated Brucella-infected cows. Australian Veterinary Journal. Vol.61, N°8. pp.265-266. August, 1.984.
- 92 Mc CAUGHEY, W.J. and HANNA, J.. A Compararison of Vaginal Tampon test Used in the Erradication of Brucellosis. The Veterinary Record, 93:246-249, 1.973.
- 93 ALTON, G.G.. Standardization of Agglutinating Antigens for the Diagnosis of Brucellosis. Res. Vet. Sci. 12:330-337, 1.971
- 94 ROSE, J.E. and ROEPKE, M.H.. An Acidified Antigen for Detection of Nonspecific Reactions in the Plate Agglutination Test for bovine Brucellosis. Am. J. Vet. Res. pp. 550-555, July 1.957
- 95 CATLIN, J.E.. Trasmision of bovine brucellosis from dam to offsring. JAVMA, Vol.188,N°8, pp.867-869, April 15, 1.986.
- 96 Resolución 1296 del 6 de Noviembre de 1.993 (SENASA).
- 97 GARCIA-CARRILLO, C.. Conceptos sobre el Control de la Brucelosis. Gac. Vet. 34(266):411-426, 1.972.
- 98 SZYFRES, B..Realizaciones y Experimentaciones en la Pro-filaxis de la Brucelosis. Rev. Asoc. Med. Arg. Vol. 78,N°5, pp. 251-256; Mayo 1.964.
- 99 GARCIA-CARRILLO, C.. Efecto de la vacunación antiaftosa con adyuvante oleoso aplicado un mes antes o un mes después que la vacuna B. abortus cepa 19 sobre la inmunidad contra la brucelosis en cobayos. Rev. Med. Vet. Vol.68,N°5. pp.240-244, 1.987.
- 100 TORIONI de ECHAIDE, S; AGUIRRE, D.A.; SPATH, E.J.A.. Respuesta serológica a la vacunación con Brucella abortus cepa 19 en bovinos Bos taurus (Hereford y Criollo) y Bos indicus (Nelore). Rev. Med. Vet. Vol.69, N°1; pp.28-34, 1.988.
- 101 ALTON, G.G.. Recent Developments in vaccination aganist Bovine Brucellosis. Australian Veterinary Journal. 54:551-557, December,1.978.
- 102 CALLIS, J.;BACHRACH,H.; BITTLE, J.; DALRYMPLE,J.; GAMBLE, R.; GLOSSER, J.; MURPHY F.; THIERMANN, A. and THOMPSON, S.. Biotechnology and Its Public Health Implications in Zoonotic Diseases. Cap. 34. pp.377-399. Biotechnonology in Zoonotic Diseases.
- 103 GARCIA-CARRILLO, C. y SZYFRES, B.. Efecto de la vacunación temprana y de la revacunación con Brucella abortus, cepa 19, sobre la respuesta serológica. Rev. Med. Vet. Vol.51,157-173, Bs. As., 1.970.
- 104 CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.; FICHT, Z.A.; WILLIAMS, J.D.. Effects of stage of gestation and breed on bovine responses to vaccination with Brucella abortus strian 19. JAVMA, Vol.199, N°7, pp.887-891, October 1, 1.991.
- 105 EWALT, D.R. and HARRINGTON, J.R.. Isolation of Brucella abortus and Brucella abortus Strain 19, from Cattle. JAVMA, Vol. 174,N°2, pp.172-173. January 15, 1.979.
- 106 CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Brucellosis. Vacuna Brucella abortus, Cepa 19. Nota Técnica N°4, Rev. 1, 9 pgs. Agosto 1.969.
- 107 QUEVEDO, J.M.; CEDRO, V.C.F.; DE BENEDETTI, V.M.E.; ROVERE, R.J; MARANGUNICH,L.; BAGNAT,E. y GIL,R.. Vcunación antibrucélica en bovinos con Brucella abortus Cepa 19 en pellets por vía vaginal. Rev. de Investigaciones Agropecuarias. INTA, Bs. As., Rep. Argentina. Serie 4, Patología Animal, Vol. XI, N° 1, 15 pgs. 1979.
- 108 CEDRO, V.C.F.; QUEVEDO, J.M.; BAGNAT,E.; ZAGO, A. y GIL, R.. Vacunación antibrucélica en bovinos con Brucella abortus Cepa 19. Evaluación del grado de protección de la vacuna frente a la infección experimental. Rev. de Investigaciones Agropecuarias. INTA, Serie IV, Patología Animal, Vol. XII, N°1, pp. 73-82, 1.975.
- 109 BECKETT, F.W. and Mac DIARMID, S.C.. The effect of Reduced Dose Brucella abortus Strain 19 Vaccination in Accredited Dairy Herds. Br. Vet. J. 141:507-514, 1.985.
- 110 CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A.; TEMPLENTON, J.W.; WILLIAMS, J.D.. Effect of stage of gestation on efficacy of Brucella abortus strain-19 vaccination in cattle. Am. J. Vet. Res. Vol.52, N°11, pp.1.848-1.851, November 1.991.
- 111 CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.; WILLIAMS, J.D.. Relationship of days in gestation at exposure and development of brucellosis in strain 19 vaccinated heiffers. Am. J. Vet. Res., Vol.49, N°7,pp. 1.037-1.039, July 1.988.
- 112 GONZALEZ TOME, J.S.; del PALACIO, E.; SAMARTINO, L.E.. Brucelosis bovina: Revacunación de hembras adultas serológicamente negativas con dosis reducida de Brucella abortus cepa 19. Vet. Arg.. Vol.IV, N°34, pp.342-347, Junio de 1.987.
- 113 ALTON, G.G.; CORNER, L.A. and PLACKETT, P.. Vaccination of Pregnant Cows with Low dossed of brucella abortus Strain 19 Vaccine. Austrlian Veterinary Journal, Vol. 56, pp.369-372, August, 1.990.
- 114 ALTON, G.G. and CORNER, L.A.. Vaccination of Heifers with a Reduced dose of Brucella abortus Strain 19 Vaccine Before first Mating. Austrlian Veterinary Journal, Vol. 57, pp.548-550. December, 1.991.
- 115 BARTON, C.E. and LOMME, J.R.. Reduced-Dose in Whole Herd Vaccination Aganist Brucellosis: A Review of Recen Experience. JAVMA, Vol.177,N°12, pp.1.218-1.220.
- 116 JURADO, F.R. y CEDRO, V.C.F.. La Prueba de Seroaglutinación en Brucelosis Animal. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Publicación Miscelánea N° 386. 1.954.
- 117 GARCIA-CARRILLO, C.. Comparisison of B. melitensis Rev 1 and Br. abortus strain 19 as a Vaccine aganist Brucellosis in Cattle. Zbl. Vet. Med. B., 27:131-138, 1.980.
- 118 NICOLETTI, P.. Prevalence and Persistence of Brucella abortus Strain 19 Infections and Prevalence of Other Biotypes in Vaccinated Adult Dairy Cattle. JAVMA, Vol. 78,N°2, pp.143-145, January 15, 1.981

- 119 BOSSERAY, N. and PLOMMET, N.. Brucella suis S2, Brucella melitensis Rev 1 and Brucella abortus S 19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three Brucella species challenge strains in mice. Vaccine, Vol. 8, pp.462-468. October, 1.990.
- 120 XIE XIN. Orally administrables brucellosis vaccine:Brucella suis Strain 2 vaccine. Vaccine, 4:212-216, December, 1.986.
- 121 CHUNG, Y.S.; HALL, W.T.K. and SIMMONS, G.L.. Immunoglobulin Classes in Serum Antibody Reactions in Cattle Following Vaccination with Brucella abortus Strain 19 and Killed 45/20 Vaccines. Australian Veterinary Journal, Vol.56, pp.413-416, September 1.980.
- 122 WOODWARD, L.F. and JASMAN, R.L.. Comparative efficacy of the an experimental S45/20 bacterin and a reduced dose of strain 19 vaccine aganist bovine brucellosis. Am J Vet Res, Vol.44, N°5, pp.907-910, May 1.983.
- 123 CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. BRUCELOSIS. Guía para proyectos de Brucelosis bovina. Nota Técnica N°14, 26pps. O.M.S., Ramos Mejía, 1.972.
- 124 SZYFRES, B.. "Criterios para la planificación y evaluación de programas de control y/o erradicación de la Brucelosis". Rev. Invest. Nac. Hig. 7(1-2):271-278, 1.974.
- 125 LASSAUZET, M-L.; THURMOND, M.C.; JOHNSON W.O.; STEVENS, F. and PICANSO, J.P.. Effect of brucellosis Vaccination and Dehorning on Tramission of Bovine Leukemia Virus in Heifers on a California Dairy. Can. J. Vet. Res. 54:184-189, 1.990.
- 126 MYLREA, P.J.. The origins of bovine brucellosis in New South Wales and its eradication. Australian Veterinary Journal, Vol.68,N°6, pp. 189-192, June, 1.991.
- 127 PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL Y/O ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS BOVINA. Resolución N°73. 4 de Marzo de 1.982. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA).
- 128 INFORME ESTADISTICO. SETIEMBRE OCTUBRE 1.990. SENASA.
- 129 ENRIGHT, F.M. and HUGH-JONES, M.E.. Effects of Reactor Retention on the Spread of Brucellosis in Strain 19 Adult Vaccinated Herds. Preventive Veterinary Medicine. 2:505-514, 1.984.
- 130 GONZALEZ TOME, J.S.; SAMARTINO, L.E.; GREGORET, R.; MUR, E.N.; DEMARIA, J.L.. Brucelosis bovina: Erradicación de la Brucelosis y Mantenimiento de un establecimiento Libre en Zona Endémica. Vet. Arg. Vol. IV. 1987.
- 131 GONZALEZ TOME, J.S.; del PALACIO, E. y SAMARTINO, L.E.. Brucelosis bovina: Eliminación de Reaccionantes al 2 Mercaptoetanol y rápida disminución de la prevalencia brucélica en un rodeo de cría altamente infectado. Vet. Arg. Vol. IV, N°31, pp.71-81, Enero-Marzo de 1.987.
- 132 GONZALEZ TOME, J.S.; del PALACIO; SAMARTINO, L.E.; GREGORET, R.; MUR, E.N.; DEMARIA, J.L.. Brucelosis bovina: Erradicación de la Brucelosis en un establecimiento lechero altamente infectado. Vet. Arg. Vol.IV,N°39, pp.793-799. Noviembre de 1.987.
- 133 LARRIEU, E.; ALVAREZ, E. y CAVAGION, L.. Epidemiología y Control de las Zoonosis. Vet. Arg. Vol. IV,N°35, pp.418-424, Julio de 1.987.
- 134 MALAMUT, J.C.; WALLS, A.; ALBARRACIN, R. y MARENCO, A.. Brucelosis bovina: Vigilancia epidemiológica. Vet. Arg. Vol. III, N°24, pp.331-337; Junio de 1.986
- 135 INPPAZ - GUIVETA. Organización Panamericana de la Salud. 28 pps. y Anexos. 1.993
- 136 LUNA-MARTINEZ, J.E.; JARAMILLO ARANGO, C.G. y LOPEZ-MERINO, A.. Estado de la brucelosis en hatos lecheros en una zona conurbana de la Ciudad de Mexico. Vet. Mex., XXIII, 2:111-116, 1.992.
- 137 GARCIA-CARRILLO, C.. Brucelosis. Curso Homenaje al Prof. Dr. Tomás de Villafañe Lastra. 10-12 de agosto de 1.978, pp.119-127. U.N.C.
- 138 YOUNG, E.J.. Serologic Diagnosis of Human Brucellosis. Analysis of 124 Cases by Agglutination Test and Review of the Literature. Reviews of Infectious Diseases, 13:359-372, 1.991
- 139 RAMACCIOTTI, F.. BRUCELOSIS. Etiología. Epidemiología. Bosquejo clínico. Diagnóstico. Terapéutica. Profilaxis. 3° Edición. 195 pgs. Ediciones Olocco. Córdoba. 1.976.
- 140 CURRIER, R.W.. Zoonosis Update. Brucellosis. JAVMA, Vol.195,N°5, pp.595-597. September 1, 1.989.
- 141 GAZAPO, E; GONZALEZ LAHOZ, J.; SUBIZA, J.L.; BAQUERO, M.; GIL, J. and de la CONCHA, E.C.. Changes in Ig M and Ig G Antibody Concentrations in Brucellosis Over Time: Importance for Diagnoses and Follow-Up. The Journal of Infections Diseases. Vol.59,N°2, pp.219-225. February, 1.989.
- 142 BACIGALUPO, N.; DE BENEDETTI, J.M.; GUICHANDUT, J.J.; GIMENO, E. y MAYER, C.. Evaluación de pérdidas económicas producidas por brucelosis. Bull. Off. int. Epiz, 66:277-285. XXXIV. Session Générale, Rapport N°966, 1.966.
- 143 GARCIA-CARRILLO, C.. BRUCELOSIS. Programa de Erradicación en California. Serie de Monografías Científicas y Técnicas. Centro Panamericano de Zoonosis . 173 pgs. Centro Panamericano de Zoonosis. Ramos Mejía, Bs. As., 1.975.
- 144 THURFIELD, M.. Epidemiología Veterinaria. 3° Edición. Editorial Acribia. 1990.
- 145 STEEL TORRIE. Bioestadística. Principios y Procedimientos. 2° edición. 1° en español. Ed. Interamericana. 1980
- 146 RODRIGUEZ TORRES, J.G.. Guía para Programas de Salud Animal. Centro Panamericano de Zoonosis. Publicación Especial N°6. 16 pgs. Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejía, Bs. As, 1.983.
- 147 CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Procedimiento para estimación de enfermedades crónicas por muestreo. Nota Técnica N°18. Rev. 1 Organización Panamericana de la Salud, 35 pgs., Ramos Mejía, 1.979.
- 148 MARCHEVSKY, N.; HELD, J.R. and GARCIA-CARRILLO, C.. Probability of Introducing Diseases Because of False Negative Test Results. American Journal of Epidemiology. Vol.130, N°3, pp.611-614. 1.989.
- 149 MANUAL MERCK DE VETERINARIA. 2° Edición en español. 1386 ps. Editado por Merck y Co. Inc. Rahway, N. J., U.S.A. 1.981.

- 150 BLOOD, .D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O.M.. Medicina Veterinaria. 5° edición. 1.19 pgs. Nueva Editorial Interamericana. S.A. de C.V. Mexico, D.F..1.983.
- 151 MERCHANT, J.A. y PACKER, R.A.. Bacteriología, Virología Veterinaria. 3a Edición española. 1a reimpresión. 768 pgs. Editorial Acribia. Zaragoza (España). 1.975.
- 152 FORT, M.C.; PEREZ, L.R.; ESAIN, F.H.; DUBIE, D.; IRAOLA, J.C.. Brucelosis y Leucosis Bovina Enzoótica. Prevalencia Serológica en Bovinos de los Dptos. Toay y Capital. Provincia de La Pampa. VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. Libro de Resúmenes, p.227. 8 al 11 de Noviembre de 1.994.
- 153 FORT, M.C.; ESAIN, F.H.; PEREZ, L.R.; GARCIA BOISSOU,L.; CAÑON, M.. Determinacion de IBR, Leucosis Bovina Enzoótica y Brucelosis por la tecnica de ELISA en leche de tambos de las cuencas lecheras de Santa Rosa (La Pampa) y Trenque Lauquen (Buenos Aires). VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. Libro de Resúmenes, pag.226. 8 al 11 de Noviembre de 1.994.
- 154 SAMARTINO, L.; ROSSETTI, C.; GONZALEZ TOME, J.; GREGORET, R.. Respuesta Inmune y Proteccion contra la Brucelosis en Cobayas Vacunadas con la Cepa de Brucella abortus RB51. VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. Libro de Resúmenes, pag.356. 8 al 11 de Noviembre de 1.994.
- 155 SAMARTINO, L.E.; CONDE, S.. Estudios de Transmisibilidad de la Cepa Brucella abortus RB51 en Cobayas Preñadas. VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. Libro de Resúmenes, pag.357. 8 al 11 de Noviembre de 1.994.
- 156 ARISTIZABAL, M. T. y PUCHINI, M. C.. Control de la Brucelosis bovina. Un Desafio Para El Veterinario Rural. Clínica y Produccion Veterinaria. Nº17 pag.2-7, Junio-Julio 1.994.
- 157 INSTITUTO DE SANIDAD GANADERA. Informe Técnico. Antígeno BPA.
- 158 COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN BRUCELOSIS. Organiza-ción Mundial de la Salud. Serie Inf. Téc. Nº464. 1.971.
- 159 ACHA, P.N. y SZYFRES, B.. Zoonosis y Enfermedades Trans-misibles Comunes al Hombre y a los Animales. Publicación Científica Nº 354. Organización Panamericana de la Salud. pp. 6-24. 1.977.
- 160 MAYER, H. F.. Bromatología. Higiene y Control de los Alimentos. Tomo 1. Primera Edicion. pag.238-239. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Noreste. 1.984.
- 161 PEREZ BIANCO,R.; SANTARELLI, M.E. y Miembros de la Sociedad Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. Medicina 53: 491-496, 1993, Buenos Aires.
- 162 DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER,D.; BURTON, A.H.; BRENDEL, K.A.; SMITH, D.C.; DICKER, R.C.; SULIVAN, K.M.; and FAGAN, R.F.. Epi Info, Version 6. A Worl-Processing, Database, and Statistics Program for Public Health on IBM-compatible Microcomputers. April. 1994.
- 163 SENASA. Manual de Procedimientos. Diagnóstico Serológico de la Brucelosis Bovina. (Res. SENASA 1269/93). Departamento de Brucelosis. Gerencia de Laboratorios. Servicio Nacional de Sanidad Animal. Buenos Aires, 1995.
- 164 BAVERA, G.A.. La infección en 6253 vacunos correspondientes a 105 tambos de la cuenca lechera de Coronel Moldes - Córdoba. Rev. Medicina Veterinaria. Vol. 52. Nº4. Julio - Agosto 1971.
- 165 DAVIS, D.S.. Role of Wildlife in Tranmitting Brucellosis. Chapter Twenty-four. Advances in brucellosis Research. Ed. G. Adams. Texas A y M University Press, 1990.
- 166 BAKOS, E.; CITRONI, D. y GALASSI J.. Títulos Anti-Brucella abortus de origen inusual en toros de raza indica. Vet. Arg. Vol. IX, Nº 83. pp. 177-181. Mayo 1992.
- 167 GONZALEZ TOME, J.S.; del PALACIO, E. y SAMARTINO, L..Brucelosis bovina: Brote producido por el biotipo 2 de Brucella abortus. Vet. Arg. Vol.II. Nº 17. pp.657-660. Setiembre 1985.
- 168 CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.; RICHARDSON, B.E.. Correlation of field strain exposure with new cases of brucellosis in six beef herds vaccinated with strain 19. JAVMA, Vol. 192, Nº11. pp.1550-1552. June 1, 1988.
- 169 SMITH, M. and SHERMAN Goat Medicine . Ed. Lea y Febiger 1994.
- 170 ARIZA, J..Antibiotic therapy for human brucellosis. Prevencion of Brucellosis in the Mediterranean Countries. Ed. Plomment Press SC Publishiers, 1992.

[Volver a: Enfermedades de la reproducción](#)