

ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A. I
“GRAL. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”**

**CINÉTICA DE ANTICUERPOS EN TERNERAS
INMUNIZADAS CONTRA *Brucella*, MEDIANTE LA
VACUNA CEPA 19 (B-19)**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Tania Valeria Solís Salas

Sangolquí, 23 de Julio 2008

RESUMEN

Se evaluó la respuesta inmune humoral en 22 hembras Holstein, 1 hembra Jersey, y 3 hembras híbridas (26 animales en estudio), luego de la vacunación con la Cepa 19, utilizando tres pruebas serológicas: iELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto), SAT-EDTA (“Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA) y RB (Rosa de Bengala). Las terneras pertenecen a la Hacienda “El Prado”, propiedad de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicada en la parroquia de Loreto del Cantón Rumiñahui. Dichos animales fueron vacunados entre los 4 y 7 meses de edad con 6×10^{10} gérmenes vivos de *Brucella abortus* Cepa 19. La prueba SAT-EDTA que detecta inmunoglobulinas M (IgM), fue positiva a los 7 días posvacunación y alcanzó títulos máximos a los 14 días. Luego, en el día 35, su concentración en el suero fue reduciendo, pero sin desaparecer, estando presentes hasta el día 217 aproximadamente. Las inmunoglobulinas G (IgG), reconocidas por la prueba iELISA y RB aparecieron casi al mismo tiempo que las IgM (7 – 14 días), y alcanzaron títulos máximos entre los 35 y 56 días posvacunación, estando presentes hasta el día 203, aproximadamente. La vida media de los anticuerpos dependió de la edad de vacunación, así pues en animales jóvenes (Grupo C = 4,17–4,87 meses), el promedio de supervivencia de anticuerpos IgM fue de 85,57 días, mientras que animales con mayor edad (Grupo A = 6,10 a 6,87 meses) presentaron una vida media de 190,909 días. El mismo caso ocurre con los anticuerpos IgG, en los animales jóvenes, el promedio de supervivencia fue de 28,85 días, mientras que en animales de 6,10 a 6,87 meses la vida media de IgG fue de 95 días.

ABSTRACT

The humoral immune response of 22 female Holstein, 1 female Jersey and three hybrids were evaluated (26 study animals), after the vaccination with 19 strain, using three serological tests: iELISA (indirect “Enzyme Linked Immunosorbant Assay”), SAT-EDTA (“Serum Agglutination Test” with EDTA presence) and RB (Rose Bengal). The heifers belong to “El Prado ranch”, property of the Army Polytechnic School, placed in the Loreto parish, Rumiñahui cantonment. Those animals were vaccinated between 4 and 7 months old with 6×10^{10} live germs of *Brucella abortus* 19 strain. The SAT-EDTA test that detects M (IgM) immunoglobuline was positive 7 days after vaccination, and reached the highest titrimetry in the 14th day. Then in the 35th day, the concentration in the serum was reduced, but without disappearing, being present until the 217th day approximately. The recognized G immunoglobulins (IgG) by the iELISA test and RB showed up almost at the same time of the IgM (7 -14 days) and reached the highest titrimetry values between the 35th and 56th days after vaccination, being presented until the 203 day, approximately. The antibodies midlife depended in the vaccination age, thus in young animals (C Group = 4,17– 4,87 months), the antibodies survival average IgM was of 85,57 days, while the oldest animals (A Group = 6,10 to 6,87 months) showed a midlife of 190,909 days. The same case occurs with the IgG antibodies, in young animals, where the survival average was of 28,85 days, while in the animals of 6,1 to 6.87 months the midlife of IgG was of 95 days.

DEDICATORIA

La presente investigación la dedico a todo el sector ganadero con mi más grande anhelo de que la puedan utilizar de la mejor manera posible puesto que si alguien puede beneficiarse, son ellos, los ganaderos.

Tania Valeria Solís Salas

AGRADECIMIENTO

Quiero elevar mis manos al cielo y agradecer primeramente a Dios por haberme dado la fortaleza, la capacidad y el coraje para cumplir este objetivo en mi vida y porque en cada una de las acciones que he realizado he sabido que cuento con su inmensa gracia divina.

A mis padres, quienes siempre encaminaron mi vida y la condujeron por el sendero de la verdad, la libertad y la justicia, a ellos, les debo lo que soy y les doy las infinitas gracias por el esfuerzo que realizaron durante toda mi carrera estudiantil. Su ejemplo es digno de ser seguido. Dios les bendiga.

A mis hermanas, por la confianza, la seguridad y su amor incondicional, ellas que siempre han estado junto a mí animándome en los momentos más difíciles que he vivido.

A mis profesores, compañeros inseparables en nuestras penas y alegrías estudiantiles, porque supieron sembrar lo mejor de sí mismos y guiarnos por el camino de la verdad, del respeto y la solidaridad. Con especial agradecimiento al Dr. Joar García y al Ing.

Diego Vela, maestros de mucha cuantía tanto en lo personal como en lo profesional, para ellos un inmenso reconocimiento por todo el apoyo brindado a mi persona pero sobretodo porque confiaron en mí, gracias por sus enseñanzas, por su guía y orientación y por sus grandes cualidades humanas.

Al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), porque permitieron que realice los análisis y pueda concluir con éxito la investigación, con especial gratitud a su Director, el Dr. Washigton Benítez, quien valoró el trabajo y prestó el apoyo necesario para la realización de la tesis.

Y a mis amig@s y compañeros de aula, porque entre nosotros se ha creado un vínculo imperecedero que no se borrará, sino con la muerte. Tantos momentos vividos no se olvidarán jamás, los llevaré a cada uno de ellos en lo más profundo de mi corazón.

Tania Valeria Solís Salas

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y Justificación

La brucelosis bovina, es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano que afecta principalmente a la ganadería de zonas lecheras, produciendo en el Ecuador, grandes pérdidas económicas estimadas en 40 millones de dólares anuales (MAG – SESA, 2006) y que incidentalmente se transmite al ser humano, constituyendo una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial estimándose que cerca de 500 mil casos de brucelosis en humanos se presentan cada año (OPS – OMS, 2001; PANAFTOSA, 2000).

Esta enfermedad posee gran impacto en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles; en las hembras y en los machos provoca alteraciones testiculares, disminución de la fertilidad, acompañadas

algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo (Rivers *et al*, 2006), estableciendo una barrera para el comercio de animales y de subproductos de origen animal, lo cual afecta la economía de los países que aún no han podido erradicarla, como es el caso de Ecuador.

Pero aún más importante que el aspecto económico en el ámbito pecuario, constituye un importante problema para la salud pública ya que la mayoría de las bacterias pertenecientes al género *Brucella*, son patógenas para el hombre, quien adquiere la infección por el consumo de leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto con material infeccioso (Blasco & Gamazo, 1994).

La forma más viable para disminuir el impacto de esta zoonosis en los humanos, es la disminución de la prevalencia de la enfermedad en los reservorios habituales de la bacteria, a través de la identificación de los animales infectados y en la correcta eliminación de los mismos.

Otra herramienta de gran valor para el control de la enfermedad, es la vacunación, sin embargo, esta vía es bastante controversial en nuestro país, ya que actualmente existen dos vacunas para la inmunización de los animales en lugares de alta prevalencia, la Cepa 19 y RB51; la primera vacuna, es una Cepa estable, que induce altos niveles de protección, pero con un inconveniente, los anticuerpos temporales que produce no se diferencian de los generados por una infección, provocando una interferencia momentánea con el diagnóstico. Por otro lado, la RB51 al ser una cepa mutante rugosa, no presenta la cadena O, por lo tanto no produce anticuerpos y como es previsible, no ocasiona ninguna interferencia en las pruebas clásicas de diagnóstico serológico, pero,

al hablar de la inmunidad que confiere a los animales, existen experiencias que demuestran claramente la inferioridad de RB51 con respecto a la vacuna Cepa 19.

Por estas complicaciones, fue necesario realizar la presente investigación, en la que se pretendió efectuar un estudio científico que demuestre la edad óptima para vacunación en terneras, tiempo de persistencia e intensidad de reacciones cruzadas con las pruebas serológicas de los anticuerpos generados por la vacunación con Cepa 19, así como la edad de revacunación con RB51.

OBJETIVOS

2.1.- GENERAL

Determinar la dinámica de los anticuerpos vacunales contra *Brucella* spp., en terneras primovacunados con cepa 19 (B 19).

2.2.- ESPECÍFICOS

- Determinar la correlación existente entre las pruebas de diagnóstico utilizadas en la investigación.
- Determinar el tipo de anticuerpos generados en el caso de terneras vacunadas con Cepa 19, y su tiempo de persistencia.
- Determinar la vida media de los anticuerpos generados por la vacuna Cepa 19.
- Establecer la edad óptima para vacunación de terneras.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1.- Brucelosis

3.1.1.- Antecedentes Históricos

La trayectoria de la brucelosis en la historia de la humanidad, ha sido tratada por varios autores, quedando muy bien definido. En 1859 Marston publicó la primera descripción precisa de la brucelosis como una entidad independiente. Marston, un cirujano de la Royal Artillery, describió con detalles su experiencia personal con la “Fiebre gástrica remitente del Mediterráneo” durante su estadía en Malta en la guerra de Crimea (Ferber *et al*, 1981; citado por Young, 1997). David Bruce, en 1887 señaló que la Fiebre de Malta del hombre la producía una pequeña bacteria, cuando aisló por primera vez el agente etiológico al cual llamó *Micrococcus melitensis* (García *et al*, 1988; Bofill *et al*, 1996; citado por Rodríguez *et al*, 2005). En 1895, el veterinario danés Bernard Bang identificó a *Bacillus abortus* como el agente causal de abortos contagiosos en el ganado vacuno. En 1905 surge el concepto de zoonosis, cuando Zammit informa que las cabras transmiten la enfermedad al hombre por el consumo de leche infectada (Rodríguez *et al*, 2005). Evans en 1918 comprueba el íntimo parentesco entre el *Micrococcus melitensis* y *Bacillus abortus*, estos resultados junto con los de Meyer y Shaw en 1920 permitió agrupar a estos microorganismos en un solo género bacteriano *Brucella* en honor a Bruce, y denominarlos *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* (Benítez, 1979; citado por Rodríguez *et al*, 2005) En 1914 Traum aisló *B. suis* de cerdas con abortos y en 1966 Carmichael identificó a *B. canis* como causa de abortos contagiosos en perros Beagle (Butler *et al*, 1983; citado por Mandell *et al*, 1997). *B. ovis* (1953) y *B. neotomae* (1957) se aislaron en el carnero y en la rata de la madera, respectivamente, pero ninguna de esas especies es patógena para el ser humano (Young, 1997).

3.1.2.- Distribución Geográfica

Las especies de *Brucella* varían en su distribución geográfica, así pues *Brucella abortus* está presente en todos los países de América Central, siendo la prevalencia de un 4 a 8%

(Moreno, 2002; citado por Rivers *et al*, 2006). En Sudamérica se encuentra en varios países, donde en muchos casos es endémica y un problema sanitario importante, tal es el caso de Ecuador, que en el 2007, reportaron una prevalencia del 16% al 45% en 516 animales muestreados provenientes de 23 haciendas en la provincia de Pichincha, aislando *Brucella abortus* biotipo 4 de muestras de leche (Com. pers, Ron J., 2007).

Brucella melitensis es particularmente común en el Mediterráneo, Asia Central, India, Africa (OIE, 2007) y en algunos países de América Latina en donde se reportó una prevalencia entre el 6% y 15% en cabras y ovejas (Thimn, 1982; citado por Ron, 2003).

Brucella suis biotipo 1 y 3 han sido reportados en algunos países de Sudamérica y México. *Brucella canis* probablemente está presente en la mayoría de países en el mundo entero, sin embargo Nueva Zelanda y Australia, reportan estar libres de este organismo (OIE, 2007).

3.1.3.- Pérdidas Económicas

La brucelosis ha causado y causa grandes pérdidas económicas a la ganadería del país. Sus características epidemiológicas y evolutivas, hacen que tenga un impacto social y económico muy superior al de otras enfermedades, generando pérdidas anuales de casi 40 millones de dólares, equivalente al 2% de la producción ganadera de nuestro país, a lo que habría que añadir el gasto por atención sanitaria y de prestaciones de los Sistemas de Salud (MAG – SESA, 2006).

En el 2000, el Ministerio de Agricultura (MAG) y el servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (SESA), reporta pérdidas directas como indirectas, que afectan gravemente el sector ganadero del país, las cuáles se describen a continuación:

3.1.3.1.- Pérdidas directas

- La gestación no se lleva a término: el 30% a 80% de los animales infectados pueden abortar (OIE, 2007).
- Disminución de la producción láctea (20% - 22%): los abortos y otros problemas de infertilidad aumentan el período entre lactancias y el intervalo entre partos.
- Pérdidas de terneros o dificultad para criarlos: siendo esto de gran importancia en las zonas destinadas a la producción de carne, donde los terneros representan la única fuente de ingreso.
- Se altera la comercialización de productos derivados de los rumiantes: puesto que es una enfermedad sometida a saneamiento ganadero, por lo que las granjas con brucelosis no pueden vender sus productos. Sin embargo, en Ecuador existen fincas que nunca han hecho un diagnóstico de sus animales, aún así venden leche no pasteurizada y sus derivados, sin saber que posiblemente están transmitiendo la enfermedad a las personas que consumen estos productos.
- Disminuye la vida productiva de la vaca.

3.1.3.2.- Pérdidas indirectas

- Los gastos derivados de las campañas de saneamiento y vacunación.
- Indemnización a los ganaderos que sacrifican animales positivos a esta enfermedad, cabe recalcar que en nuestro país no existe esta ayuda económica.
- Control e higienización de la carne, y principalmente de la leche. La pasteurización que se lleva a cabo en los distintos productos lácteos tiene como misión la destrucción de *Brucella* existentes en éstos.

3.2.- El género *Brucella*

3.2.1.- Etiología

Las bacterias del genero *Brucella* suelen presentarse con la forma de coco-bacilos con un tamaño entre 0,5-0,7 micras por 0,6-1,5 micras, de crecimiento lento, no poseen cápsulas, ni forman esporas, son Gram-negativas, no esporuladas, sin flagelos (Blasco & Gamazo, 1994; Castro *et al*, 2005). Es un patógeno intracelular "facultativo", es decir, tiene la capacidad de establecer una infección estable en el huésped (Aréstegui *et al*, 2001).

Las cepas de *Brucella* invariablemente son catalasa - positivas, pero las actividades de oxidasa y de ureasa y la producción de H₂S son variables (Young, 1997). Las bacterias del género *Brucella* están distribuidas en seis especies diferentes: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris* (Cloeckaert *et al*, 2001; citado por Castro *et al*, 2005). En la Tabla 3.1 se encuentran detalladas las especies de *Brucella*, sus hospedadores conocidos y las características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades.

La especificidad de estos patógenos no es absoluta, puesto que *B. abortus* puede infectar a los porcinos y caprinos cuando las mencionadas especies animales se crían juntas. Lo mismo ocurre con *B. suis* y *B. melitensis*; estas infecciones cruzadas tienen poca importancia dentro de la cadena epidemiológica ya que, si desaparece el huésped principal, en las otras especies no se transmite generalmente de un animal a otro, sin embargo, pueden complicar la erradicación definitiva de la enfermedad, por ello aquellos países que controlan la brucelosis bovina se abocan inmediatamente al control de reservorios ya sean animales domésticos o salvajes (Samartino, 2003).

Tabla 3.1: Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.

Especie	Hospedador	Biovariedad	Producción de H ₂ S	Necesidad de CO ₂	Sensibilidad a los colorantes		Aglutinación con sueros monoespecíficos		
					Tionina	Fucsina	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovinos, caninos, hombre	1	-	-	+	+	-	+	-
		2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	Bovinos, caninos, hombre.	1	+	+	-	+	+	-	-
		2	+	+	-	+	+	-	-
		3	+	+	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	+	+	-	-
		5	-	-	+	+	+	+	-
		6	+	+	+	+	+	-	-
		7	-	+	+	+	+	+	-
		8	+		+	+	+	+	-
		9			+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	Cerdos, caninos, hombre	1	-	-	+	-	+	-	-
		2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+		+	+	-
		5	-	-	+		-	+	-
<i>B. canis</i>	Caninos, hombre		-	-	+	-	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	Roedores		+	-	+	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	Ovinos		-	+	-	-	-	-	+
<i>B. maris</i>	Fecas, leones marinos, delfines, ballenas								

Fuente: Castro *et al*, (2005).

3.2.2.- Estructura antigénica de *Brucella*

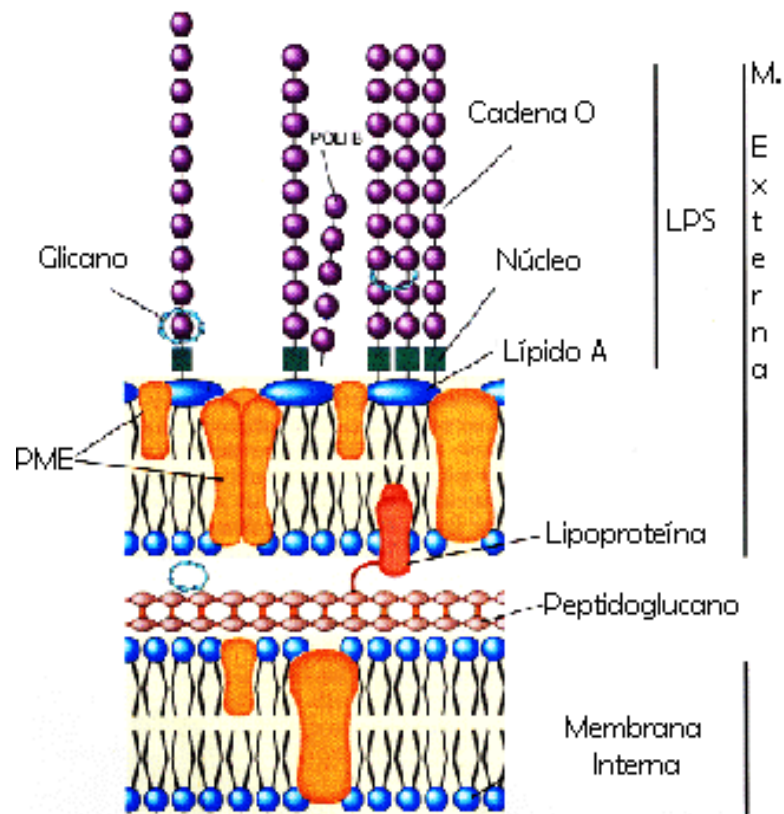
En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS (Ariza *et al*, 1983; citado por Castro *et al*, 2005).

3.2.2.1.- El Lipopolisacárido (LPS)

El principal antígeno de la pared celular de *Brucella* es el lipopolisacárido (LPS) endotóxico, en el cual se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente en el LPS-R (Castro *et al*, 2005). El PSO es el antígeno (Ag) inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta y blanco de anticuerpos (Ac) protectores (Plommet, 1987; citado por Estein, 2006). Por otro lado, el PSO posee epítopes compartidos con otras especies bacterianas como *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Pseudomona maltophilia*, *Escherichia coli*, responsables de reactividad cruzada en las pruebas serológicas que se basan en la detección de Ac hacia este Ag (Díaz *et al*, 2005).

Según Aréstegui *et al*, (2001), otra característica importante del LPS, es que en su extremo terminal, presenta moléculas de manosa que favorecen la adherencia a las células del huésped a través de los receptores de manosa. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa, y este hecho, junto al tropismo por el eritritol, el cual es un azúcar que está presente en tejidos placentarios animales, explica la avidéz de *Brucella* por el útero grávido, provocando abortos en animales infectados.

Gráfico 3.1: Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO).



Fuente: Blasco & Gamazo (1994)

3.2.3.- Resistencia y Supervivencia

Brucella es una bacteria que posee una gran capacidad para sobrevivir y persistir en el ambiente bajo condiciones apropiadas, si se compara con muchas otras bacterias patógenas no esporulantes. A bajas temperaturas y humedades, *Brucella* puede sobrevivir en ambientes diversos por largos períodos (ver Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Supervivencia de *Brucella* en el medio ambiente.

Material	Tiempo de Supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15 – 40 días
Leche a temperatura ambiente	2 – 4 días
Fluidos y secreciones	10 – 30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37° C y pH 7,5	menos de 1 día
Agua a 8° C y pH 6,5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6 – 8 meses

Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Fetos abortados	6 – 8 meses
Heces bovinas	1 – 100 días
Tierra húmeda	66 días
Tierra seca	4 días

Fuente: Castro *et al* (2005).

En contraposición, son bastante sensibles al calor, así una suspensión diluida de *Brucella spp*, se destruye rápidamente al ser sometida a la pasteurización o al exponerla a temperaturas de 60° C por 30 minutos. Sin embargo, una suspensión densa es más difícil de inactivar y se debe de prolongar el tiempo de exposición al calor o someterla a temperaturas más elevadas. *Brucella* es muy sensible a la radiación ionizante y mueren con rapidez al exponerla a la luz ultravioleta (López, 2007).

3.2.4.- Diseminación

La brucelosis bovina se caracteriza por ser una enfermedad de área o comunitaria, es decir, cuando un predio está infectado, lo más probable es que toda el área esté afectada (SAG, 2001). Es por ello que se debe poner énfasis en las diferentes vías de transmisión.

3.2.4.1.- Diseminación entre Rebaños

3.2.4.1.1.- Movimiento de los animales

Es la fuente más importante de transmisión, debido a que:

- Se ingresa animales que estuvieron expuestos o están infectados pero aún son sero-negativos ya que a veces se hace un muestreo del predio y se venden los que están negativos, pero han tenido contacto con los positivos y luego

manifiestan la enfermedad. Esto se debe al período de incubación, el cual es el tiempo transcurrido desde que el animal estuvo expuesto a *Brucella* hasta ser reaccionante a las pruebas diagnósticas, éste puede ser de dos a tres semanas, aunque puede variar según la cantidad de microorganismos y tal vez la vía de inoculación (Young, 1997). La llegada de un animal enfermo al predio, el cual aborta o presenta un parto normal; en cualquiera de dichos eventos, se produce una alta excreción de bacterias al medio ambiente, desde donde se infectan los animales sanos. Algunos experimentos demostraron que se pueden eliminar hasta 1×10^{14} gérmenes por gramo de placenta (Samartino, 2003). Este sistema de transmisión hace que los predios donde existen condiciones de alta densidad animal sean muy susceptibles, por ello la enfermedad se manifiesta con mayor frecuencia en predios lecheros (explotaciones intensivas), que en los que se dedican a la producción de carne (explotaciones extensivas).

- Ingreso de animales que no han sido muestreados por ser muy jóvenes (menores de 18 meses) o simplemente por que no se requirió la prueba, por lo tanto se desconoce si el animal era sero-positivo o no.
- Ingreso de terneras no vacunadas.
- Puede ocurrir también que animales de un establecimiento concurren a alguna exposición o se trasladen a otros campos para engorde y vuelvan infectados (Samartino, 2003).

3.2.4.1.2.- Contacto directo con rebaño infectado

- Se produce en todas las prácticas de manejo que permiten el contacto entre animales de diferentes rebaños, por ejemplo cuando utilizan praderas en común, debido a que la supervivencia de *Brucella* en pastos es de hasta 4 semanas

(Blasco & Gamazo, 1994), tiempo en el cual pueden llegar varios predios e infectarse.

3.2.4.1.3.- Contacto indirecto con rebaños infectados

- ☑ Fundamentalmente se produce por traslado de fetos abortados, placentas u otros materiales infectados, lo cual realizan los perros y otros animales domésticos y silvestres (Samartino, 2003).
- ☑ También se señala el agua de arroyos, canales y pozos (Castro *et al*, 2005) donde pueda caer el patógeno y ser trasladado hacia otros lugares.

3.2.4.2.- Diseminación dentro del Rebaño

Los principales factores que producen la transmisión de la enfermedad de un animal a otro provocando la persistencia de la infección dentro del rebaño son:

- ☑ Ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas. Las vacas tienen además la costumbre de lamer membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos infectados (Rodríguez *et al*, 2005).
- ☑ El instinto de las vacas de lamer los órganos genitales de otras vacas contribuye también a la transmisión de la infección (D' Anatro, 2003).
- ☑ La infección congénita puede también atacar a becerros nacidos de hembras enfermas. La infección ocurre en el útero y puede permanecer latente en la ternera durante toda su vida. Cuando este animal ya es adulto, puede dar pruebas serológicas negativas en su primer parto, pero es el momento en el cual empieza a desechar al microorganismo (Blood *et al*, 1987).
- ☑ Las terneras nacidas de hembras reactivas suelen dar pruebas serológicas positivas durante 4 a 6 meses debido a los anticuerpos calostrales, y después

suelen dar datos negativos aún cuando puede haber una infección latente en una pequeña proporción de estos animales. Estas infecciones latentes en los animales que dan pruebas serológicas negativas son de mucha importancia porque pueden permanecer inadvertidas y finalmente servir como fuente de infección (Blood *et al*, 1987).

- ☑ El pastoreo en áreas infectadas, ya que la capacidad infecciosa de la bacteria puede persistir en los pastos durante 100 días en invierno y 30 días en verano (Blood *et al*, 1987).
- ☑ De la misma manera que la mayor parte de formas de mastitis pueden propagarse durante el ordeño, la infección por *B. abortus* puede diseminarse, pues aproximadamente la mitad de las vacas infectadas, después de abortar o parir, eliminan *Brucella* en la leche durante semanas, meses y años; sobre todo en aquellas salas de ordeño donde la higiene es muy deficiente y que al ordeñar, se dejan caer al piso los primeros chorros de leche (Rodríguez *et al*, 2005).
- ☑ Los machos infectados secretan semen que contiene la bacteria y de esta forma pueden transmitir la infección, pero la mayor probabilidad de propagación se da, cuando se emplea semen de estos animales en inseminación artificial (MAG – SESA, 2000).

3.2.5.- Patogenia

La patogenia es la progresión de la enfermedad dentro de un individuo infectado (García, 2003).

Brucella es un patógeno intracelular facultativo, propiedad que la hace capaz de adherirse, penetrar y multiplicarse dentro y fuera de la célula (Castro *et al*, 2005).

3.2.5.1.- Puertas de entrada de *Brucella*:

3.2.5.1.1- Oral

La vía de penetración más importante, es el tracto gastrointestinal, por la costumbre de las vacas de lamer fetos abortados, terneros recién nacidos y los órganos genitales de otras vacas que contienen gran número de bacterias (Rodríguez *et al*, 2005). También por la ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas con el agente infeccioso. Más del 95% de los casos ocurre por ingestión de material infectado (Acha y Szyfres, 2003; Samartino, 2004; citados por Ortiz *et al*, 2007).

3.2.5.1.2.- Intrauterina

Según Samartino (2003), la brucelosis no es una enfermedad venérea y sólo adquiere importancia si se realiza inseminación artificial. Según el MAG – SESA (2000), los machos infectados secretan semen que contiene la bacteria y de esta forma si se puede transmitir la infección al realizar la monta natural pero muy raras veces.

3.2.5.1.3.- Ocular

Según García (2003), la vía ocular es la puerta de entrada más eficiente, porque se requieren pocos microorganismos para infectar una vaca, por esta razón la vía conjuntival se utiliza como vía de infección experimental, ya que solamente son necesarios 750.000 microorganismos viables intra-conjuntivalmente, para infectar el 90% de las vacas susceptibles.

3.2.5.1.4.- Piel

La vía cutánea, tiene la misma importancia que la vía oral, según varios autores, ya que se pueden producir infecciones mediante las camas infectadas, cuando existen lesiones en las tetillas, en los extremos de los miembros, o en el espacio interdigital que faciliten

la penetración del agente patógeno en capas profundas de la piel (Rodríguez *et al*, 2005).

3.2.5.1.5.- Respiratoria

La transmisión por vía respiratoria, es menos frecuente y tiene lugar, cuando se agrupan los animales, mediante la inhalación de polvo y partículas que transportan los patógenos (Samartino, 2004).

3.2.5.1.6.- Pezón

La transmisión ubre a ubre a través de la máquina ordeñadora es posible, pero de importancia desconocida. Puede suceder en ganado lechero cuando la vaca está eliminando los microorganismos por la leche.

3.2.5.1.7.- Vía congénita o vertical

El 60 al 70 % de los fetos nacidos de madres infectadas nacen infectados, pero la gran mayoría de los terneros se deshacen de la infección en pocos meses (García, 2003)

El concepto de latencia se refiere a terneras nacidas infectadas y permanecen en ese estado hasta que son adultas y así, cuando llegan a la edad de reproducción desarrollan una brucelosis franca.

3.2.5.2.- Factores que influyen en la susceptibilidad

La susceptibilidad es la facilidad con que se contrae la enfermedad.

3.2.5.2.1.- Edad

- Los animales jóvenes tienden a ser más resistentes. Aunque estén expuestos cuando son vaquillas inmaduras, sólo un pequeño porcentaje se infecta.
- El animal sexualmente maduro es el más susceptible, pero se considera resistente a no ser que esté preñado, por la presencia de eritritol.
- El animal más susceptible es la vaquilla sin vacunación y preñada.

3.2.5.2.2.- Preñez

Desde el momento que se cruza una hembra adulta hasta el parto, progresivamente va aumentando su susceptibilidad. Existe una relación directa entre etapa de la gestación y susceptibilidad a la infección (Ortiz *et al*, 2007).

El género *Brucella* tiene predilección a vivir en el útero preñado. La hembra preñada es más susceptible en las etapas tardías de la preñez. El eritritol, producto presente en el útero, estimula la tasa de crecimiento de las bacterias de 3 a 5 veces (Blasco & Gamazo, 1994).

3.2.5.2.3.- Inmunidad o Resistencia

La inmunidad o la resistencia se adquiere por:

- Genética (entre el 10 al 20 % de los vacunos son genéticamente resistentes.)
- Vacunación con Cepa 19 o RB 51.

Las ventajas del aumento de la resistencia son:

- Se requiere una alta dosis para infectar.
- Reduce los abortos y la cantidad de diseminación de *Brucella*.
- Alarga los períodos de incubación.

3.2.5.2.4.- Razas

No se ven diferencias de susceptibilidad entre las razas.

3.2.5.3.- Período de incubación

El período de incubación produce una gran confusión porque es muy variable. Puede ir de 2 a 3 semanas (Young, 2007) o de 5 a 7 días y a veces llegar a varios meses (Acha y Szyfres, 2003), siendo sobre tres años en el caso del “Síndrome de Latencia en la Ternera“. Los animales con preñez avanzada son los que tienen menor tiempo de incubación (Ortiz *et al*, 2007).

El período de incubación depende de:

- **Tamaño de la dosis infectiva:** Una dosis alta determina un período de incubación menor. También se infectan animales vacunados cuando la dosis infectante es muy grande.
- **Estado de gestación:** En estado avanzado de gestación, el período de incubación es más corto porque el útero preñado es el ambiente ideal para el desarrollo de las bacterias.
- **Resistencia:** El período de incubación se hace mayor a medida que existe aumento de la inmunidad.

3.2.5.4.- Dosis infectante

Existe una relación directa entre tamaño de la dosis y la infecciosidad, se señala que 1.460 microorganismos infectan 22% de animales, 246.000 microorganismos infectan

55% de los animales, 146.000.000 microorganismos infectan 90 a 100% de los animales por vía conjuntival.

3.2.5.5.- Progresión de la enfermedad en el animal

3.2.5.5.1.- Penetración

Una vez que la bacteria ha penetrado en el organismo, ya sea por vía oral, conjuntival, dérmica o genital, se ubica fácilmente en las membranas mucosas por la característica de adherencia que posee, propiedad que probablemente le confiere el Lipopolisacárido (LPS). (Aréstegui *et al*, 2001).

3.2.5.5.2.- Permanencia

Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de los macrófagos, hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada, donde permanecen todo el período de incubación (Ortiz *et al*, 2007), causándoles aumento de tamaño difuso, hiperplasia y alrededor de la tercera semana están hemorrágicos (Rodríguez *et al*, 2001; citado por Rivers *et al*, 2006).

3.2.5.5.3 Bacteremia

Entre la tercera y quinta semana, la bacteria sale de los ganglios linfáticos y entra al torrente sanguíneo produciéndose la bacteremia, que se identifica con la elevación de la temperatura corporal y concluye el período de incubación. *Brucella* utiliza el sistema linfático para su propagación y de esta forma colonizar los órganos y tejidos de su predilección como son el útero, la placenta, los tejidos fetales, la ubre, los órganos genitales en el toro (epidídimo y las glándulas sexuales accesorias), bazo e hígado, en

estos se producen alteraciones anatomopatológicas más o menos marcadas (Blasco & Gamazo, 1994).

3.2.5.6.- Localización de *Brucella*

3.2.5.6.1.- En vaca preñada

En la hembra preñada, luego de la bacteremia se produce la localización del microorganismo en el tracto reproductivo (útero y placenta) y los nódulos adyacentes a estos órganos. El útero no se infecta a menos que esté preñado.

3.2.5.6.1.1.- El Aborto

La principal manifestación clínica de la brucelosis es el aborto. La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal de bovinos hace que también proliferen en trofoblastos de la placenta que rodean al feto (Miador & Deyoe, 1989; citado por Rivers *et al*, 2006). El trofoblasto es el encargado de producir en su momento, las hormonas que conducen al parto. Cuando se infecta, produce los mismos productos químicos: cortisol, prostaglandinas, estrógenos. Normalmente dado que el cuerpo lúteo desaparece al 7º mes y aparecen las hormonas del trofoblasto, no se mantiene la gestación y se produce el parto. Es decir la *Brucella* “aprendió” a activar la producción de estas hormonas provocando el aborto (Blasco & Gamazo, 1994; García, 2003).

La muerte fetal se produce por disrupción de la placenta, en el feto se observa edema pulmonar y congestión y hay producción de endotoxinas (García, 2003).

3.2.5.6.2.- En vaca no preñada y en machos.

Después del aborto o el parto normal la bacteria no permanece en el útero, la infección se vuelve crónica y las mismas se localizan en los ganglios, las glándulas mamarias y pueden permanecer en la ubre durante años (Cotrina & Fernández, 1991; Acha & Szyfres, 2003; citados por Ortiz *et al*, 2007). En bovinos machos, la bacteria se localiza en el epidídimo y en las glándulas accesorias.

3.2.5.7.- Eliminación de *Brucella*

3.2.5.7.1.- Ubre

Es el área donde *Brucella* se localiza con mayor persistencia, la eliminación puede ser intermitente o continua y en cantidades distintas, pudiendo oscilar desde menos de 100 hasta 200.000 gérmenes, sin precisar el volumen. La cuantía más alta se registra después del parto y la más débil en la cima de la lactación. En este período pueden estar ausentes de la leche durante días o semanas, para luego de repente volver a aparecer. En el período de secado vuelve a reforzarse su actividad. El contenido de gérmenes de la fracción final del ordeño es más elevada que en las porciones inicial y media. Los cuartos posteriores suelen eliminar mayor cantidad de *Brucella* que los cuartos anteriores (Rodríguez *et al*, 2005).

3.2.5.7.2.- Útero

Es la forma más importante de transmisión de la enfermedad ya que el 80% de *Brucella* se elimina en el momento del aborto o parición (García, 2003).

Las descargas uterinas de vacas infectadas se producen desde aproximadamente 15 días antes del aborto o parto hasta 4 semanas después del mismo, eliminándose 1×10^{14} gérmenes por gramo de placenta (Samartino, 2003).

3.2.5.7.3.- Semen

Los toros con orquitis y vesiculitis son eliminadores muy persistentes de *Brucella* por largos períodos, pero pocas veces infectan a la vaca a menos que exista herida en el tracto vaginal, frecuentemente son estériles. Aunque no es importante en monta natural, pero si se usa el semen infectado en inseminación artificial, se puede infectar el útero.

3.2.6.- Mecanismos de defensa de *Brucella*

Como ya se ha mencionado, *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos (Castro *et al*, 2005), para lo cual han desarrollado estrategias que permitan tal propiedad, las cuáles se nombran a continuación:

- ☑ La presencia de fosfatidilcolina en la membrana externa de la bacteria y los ácidos grasos de cadena larga del lípido A, representa su primera barrera defensiva; gracias a ella, resisten la acción tóxica de sales biliares, glicéridos, así como de enzimas proteolíticas y glicosidasas (Aréstegui, 2001; Blasco & Gamazo, 1994).
- ☑ Para que se produzca la muerte de *Brucella* es necesaria la desgranulación de los neutrófilos (grupo de las primeras células que se activan frente a un cuerpo extraño), con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa; pero se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evitan así su destrucción (Castro *et al*, 2005).
- ☑ Una vez dentro de las células fagocíticas, interfieren en la formación del fagolisosoma, orgánulos donde se localizan la mayoría de los agentes tóxicos bactericidas (Castro *et al*, 2005).

- ☑ Los nucleótidos cíclicos de guanina liberados por *Brucella*, son inhibidores del metabolismo de los macrófagos (Aréstegui, 2001).

3.3.- Diagnóstico

El diagnóstico de certeza se establece aislando al microorganismo. Los métodos serológicos sólo aportan un diagnóstico presuntivo (Castro *et al*, 2005).

3.3.1.- Diagnóstico Directo

Se basa en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en materiales provenientes de animales reaccionantes a las pruebas serológicas, éstas pueden proceder de fetos abortados, ganglios retromamarios, leche, útero grávido o no (D' Antro, 2003).

3.3.1.1.- Hemocultivos

Es un diagnóstico definitivo de la enfermedad, el cual requiere el aislamiento de la bacteria a partir de hemocultivos (Ariza, 2000). La técnica más utilizada para realizarlos es la de Ruiz Castañeda, que consiste en la inoculación de sangre en frascos herméticamente cerrados que contienen, simultáneamente un medio líquido (caldo triptosa) y un medio sólido (agar triptosa). Los cultivos deben mantenerse en incubación un tiempo no menor a 30 días, debido a que las bacterias del género *Brucella* son de lento crecimiento (Castro *et al*, 2005).

Los nuevos sistemas de hemocultivo automatizado, entre los que se destaca el BACTEC 9200, se han mostrado extraordinariamente eficaces. Su capacidad de detección es probablemente mayor que el método de Ruiz Castañeda, ya que permite detectar más del 95% de los cultivos positivos antes del séptimo día de incubación (Ariza, 2000 y Castro *et al*, 2005). Un estudio realizado por Villarroel *et al*, (2000); a las 72 horas de

incubación en BACTEC, obtuvo positividad en su hemocultivo, observando la presencia de coco-bacilos Gram negativos muy pequeños.

3.3.1.2.- Subcultivo

Una vez que se observa crecimiento en los hemocultivos, se procede a realizar un subcultivo en Agar Columbia o Agar chocolate, con atmósfera de 5% a 10% de CO₂.

3.3.1.3.- Identificación

Se lleva a cabo con pruebas bioquímicas de Oxidasa y Ureasa, (Villarroel *et al*, 2000), también se realiza observaciones de las colonias y test de coloración Gram (D' Anatro, 2003).

3.3.1.4.- Tipificación

Las pruebas bioquímicas usadas para la tipificación son: test de catalasa, test de oxidasa, producción de GAS sulfhídrico, rápida actividad de la ureasa, test de indol y crecimiento en medios con inclusión de colorantes. Este tipo de identificación dejaba ciertos interrogantes en la diferenciación con cepas vacunales (Cepa 19) que aunque no es usual puede ocurrir su aislamiento y es necesario identificarlos. Para ello se requiere de pruebas bioquímicas adicionales, como la inclusión de eritritol en el medio, ya que *B. abortus* Cepa 19 no crece en este medio (D' Anatro, 2003).

3.3.2.- Diagnóstico Indirecto

3.3.2.1.- Pruebas de diagnóstico

En vista de que la medicina es una ciencia de probabilidades, es decir, que ante la presencia de un patógeno, no todos los animales se enferman y dentro de los animales enfermos no todos muestran el mismo grado de infección, es necesario identificar adecuadamente a los animales infectados y esto se logra mediante la interpretación adecuada de pruebas de diagnóstico; éstas tienen la ventaja de identificar tales animales sin necesidad de que presenten síntomas clínicos.

Una prueba de diagnóstico es aplicable cuando:

- Es sencilla (fácil de aplicar).
- No sea dañina para el animal ni para la población.
- Que no tenga efectos adversos o que éstos sean mínimos.
- Que sea económicamente factible.
- Pero lo más importante, que identifique a los animales infectados como positivos y a los sanos como negativos.

3.3.2.1.1.- Condiciones de una prueba diagnóstica

3.3.2.1.1.1.- Validez

Es el grado que tiene una prueba diagnóstica para medir lo que tiene que medir. Esta condición se puede evaluar al compararla con otras pruebas diagnósticas más complejas y rigurosas. La sensibilidad y especificidad de una técnica diagnóstica son medidas de validez y están definidas para cada prueba.

3.3.2.1.1.1.1.- Sensibilidad y Especificidad

Entendemos por *sensibilidad* de una prueba el grado de capacidad que tiene para detectar animales infectados por el agente específico, en este caso *Brucella*. De esta

manera, si la prueba que usamos da reacciones positivas en 98 animales de 100 bovinos infectados diremos que la prueba tiene 98 % de sensibilidad. El 2 % restante son " falsos negativos".

En un programa de erradicación interesa que la prueba empleada sea lo suficientemente sensible para que el grado de error por "falsos negativos" sea el menor posible, ya que el objetivo es eliminar todo foco de infección de un hato.

Ninguna prueba es capaz de descubrir el 100 % de los bovinos infectados de todos los rodeos (Szyfres, 2000).

Por *especificidad* en cambio, medimos el grado de capacidad de la prueba de detectar el mayor número de animales sanos y el menor número de "falsos positivos". Una prueba altamente específica será la que de menos reacciones de "falsos positivos". Si de 100 animales no infectados, la prueba da reacciones positivas en 5 animales, decimos que la misma tiene una especificidad del 95%. Una prueba poco específica es causa por consiguiente del sacrificio de animales sanos y de pérdidas económicas innecesarias. Ninguna prueba serológica sin embargo es 100 % específica. Si nosotros quisiéramos dar a una prueba mayor sensibilidad, disminuiría a la vez la especificidad (Szyfres, 2000).

3.3.2.1.1.1.1.- Los "Falsos positivos"

Los "falsos positivos" en las reacciones se deben a varias causas, tales como anticuerpos residuales por la vacunación con cepa 19 y reacciones cruzadas debidas a anticuerpos originados por bacterias que tienen lipopolisacáridos superficiales similares a los de

Brucella. Ya se dijo que hay una pequeña proporción de animales especialmente los vacunados a una edad tardía que puede mantener anticuerpos aglutinantes que persisten durante mucho tiempo. Las reacciones en estos casos se deben a la inmunoglobulina M, ya que la IgG 2 generalmente desaparece rápidamente y la IgG 1 es poca activa en la prueba y además su concentración se reduce al poco tiempo después de la vacunación (Szyfres, 2000).

El origen de muchas reacciones inespecíficas del bovino no se conoce. Sin embargo se sabe que algunos géneros de *Salmonella* dan reacciones cruzadas. Se ha comprobado que hay una relación antigénica entre *Brucella* y *Escherichia coli* y con *Yersinia enterocolítica* como se ha mencionado anteriormente.

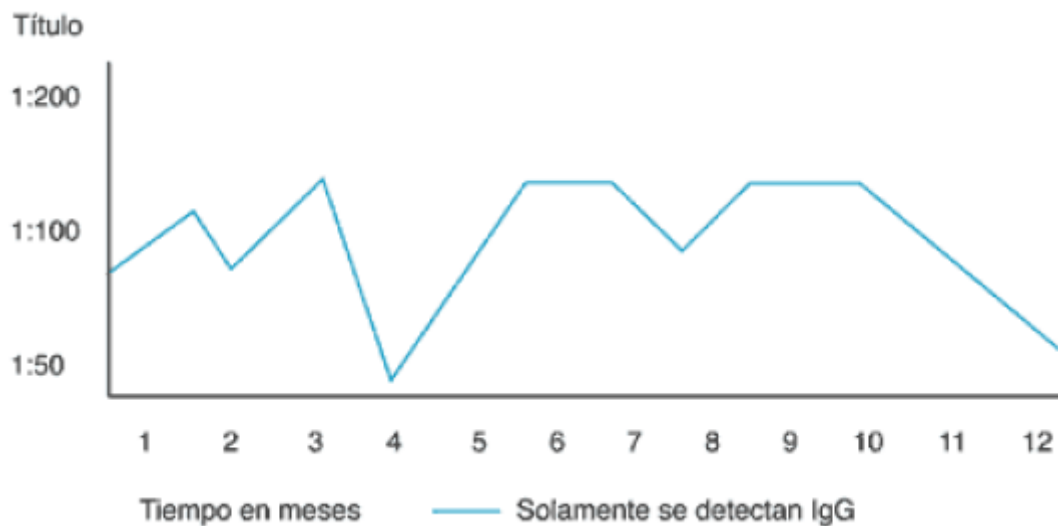
3.3.2.1.1.1.1.2.- Los “Falsos negativos”

Los "falsos negativos" en las pruebas de aglutinación se presentan durante el período de incubación es decir desde la exposición a la infección hasta la aparición de las aglutininas.

En hembras expuestas por primera vez a la infección durante la gestación es frecuente que las aglutininas aparezcan varios días a dos semanas después del aborto o del parto. Además hay animales infectados que nunca alcanzan un título aglutinante significativo. De especial interés son algunos animales con infección crónica, que se encuentran en los llamados "hatos problema" y en los cuales las IgM han bajado a un nivel no diagnóstico y casi todos los anticuerpos están constituidos por IgG. Estos animales pueden ser reconocidos por las pruebas complementarias (Szyfres, 2000).

La Figura 3.2 ilustra los resultados de sero-aglutinación de algunas vacas de "hatos problema".

Gráfico 3.2.- Representación esquemática de los resultados de la prueba de sero-aglutinación de algunas vacas infectadas de " hatos problema".



Fuente: Szyfres, (2000)

3.3.2.1.1.2.- Reproductividad

Es la capacidad de entregar los mismos resultados cuando se repite su aplicación en condiciones diferentes. La reproductividad puede variar por la variabilidad biológica de la patología estudiada y por la condición particular del observador.

3.3.2.1.1.3.- Seguridad

En la práctica, lo que se necesita conocer es si ante un resultado, sea este positivo o negativo, ¿Cuál es la probabilidad de que el animal esté realmente sano o enfermo? Esta

respuesta se la obtiene por medio de valor predictivo positivo y por el valor predictivo negativo, los cuáles están influenciados por la prevalencia de brucelosis, en este caso, de la población en estudio.

3.3.2.1.1.3.1.- El Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad de que un resultado positivo, pertenezca a un animal infectado. Se calcula con la fórmula:

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

Donde:

VPP: Valor predictivo positivo

VP: Verdadero positivo

FP: Falso positivo

3.3.2.1.1.3.2.- El Valor predictivo negativo (VPN): Es la probabilidad de que un resultado negativo pertenezca a una animal indemne. Se calcula con la fórmula:

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}}$$

Donde:

VPN: Valor predictivo negativo

VN: Verdadero negativo

FN: Falso negativo

3.3.2.1.2.- Pruebas en suero

3.3.2.1.2.1.- Prueba de Rosa de Bengala

Es una prueba de aglutinación rápida y eficaz; por su simplicidad, es muy útil como prueba de despistaje inicial o screening.

Fundamento: Se pone en contacto una alícuota de suero sin diluir con el antígeno y se observa la presencia de aglutinaciones (reacción Ag – Ac) en pocos minutos.

Antígeno: Suspensión al 8% de *B. abortus* cepa 99 teñida con Rosa de Bengala y ajustada a pH 3,6 (Serra & Godoy, 2000).

Anticuerpos que identifica: Detecta inmunoglobulinas del tipo IgG en mayor cantidad y en menor cantidad, IgM (Castro *et al*, 2005).

Interpretación de la prueba:

Cualquier grado de aglutinación (+)

Ausencia de aglutinaciones (-)

Ventajas:

- Fácil realización
- Rápido diagnóstico
- Es una prueba de screening.

Desventajas:

- Hay reacciones cruzadas con otras bacterias.
- La sensibilidad es variable.
- No es capaz de diferenciar anticuerpos resultantes de la infección y de la vacunación reciente

3.3.2.1.2.2.- Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT)

Se la utiliza para detectar infecciones agudas, debido a que los anticuerpos responsables de la sero-aglutinación son fundamentalmente de la clase IgM.

Fundamento: Se realizan diluciones crecientes del suero a investigar que se enfrentan con cantidades constantes de antígeno observándose la presencia o no de aglutinación luego de un período de incubación. De esa forma se determina el título como la máxima dilución aglutinante (Castro *et al*, 2006)

Antígeno: Suspensión de *B. abortus* 1119-3

Anticuerpos que identifica: Pone en evidencia las IgM y en menor grado IgG.

Ventajas:

- Puede ser empleada para detectar infecciones agudas
- Los títulos de los anticuerpos presentes en el suero, son reportados de forma cuantitativa
- Da un título completo de aglutinación de cada muestra

Desventajas:

- No es capaz de diferenciar anticuerpos resultantes de la infección y de la vacunación reciente.
- En etapas crónicas de la infección existen resultados falsos negativos.
- Puede darse el fenómeno de Prozona, que es un exceso de anticuerpos (Ac) bloqueantes, que impiden la unión de los Ac aglutinantes con el antígeno (Ag) (Ron, 2003).

3.3.2.1.2.3.- Prueba de aglutinación con 2 - mercaptoetanol (2 - ME)

Esta prueba es una variante de la anterior, que emplea el tratamiento previo con 2 – ME como agente reductor, que inactiva los anticuerpos de la clase IgM (Castro *et al*, 2005); y no produce efectos sobre los anticuerpos IgG (McMahon, 1983; citado por Cerero *et al*, 2000).

Fundamento: Tiene la misma base metodológica que SAT, con la diferencia de que el suero es tratado previamente con 2 – ME.

Antígeno: Suspensión de *B. abortus* 1119-3.

Anticuerpos que identifica: IgG

Ventajas:

- Puede ser empleada para detectar infecciones crónicas.
- Los títulos de los anticuerpos presentes en el suero, son reportados de forma cuantitativa

- Da un título completo de aglutinación de cada muestra

Desventajas:

- El tiempo requerido para su realización es largo (48 horas)
- El reactivo 2 – ME es tóxico.
- No es capaz de diferenciar anticuerpos resultantes de la infección y de la vacunación reciente
- Al tratar el suero con 2 – ME, puede también inactivar los anticuerpos IgG (Ariza, 2000).
- Baja sensibilidad

3.3.2.1.2.4.- ELISA (Enzyme linked immunoabsorvent assay)

Es una técnica altamente sensible, específica y versátil, emplea pequeñas cantidades de suero y da buenos resultados aun en presencia de hemólisis (Castro *et al*, 2005).

3.3.2.1.2.4.1.- ELISA indirecto (ELISA-I)

Recibe el nombre de ELISA indirecto, ya que detecta la presencia de anticuerpos específicos que se seleccione (IgG, IgM o IgA), con altos valores de sensibilidad y especificidad (Montes, 2000).

Fundamento: El antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuba con el suero a investigar, posteriormente con un anticuerpo anti-especie, conjugado a una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado, a una longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas (Castro *et al*, 2005).

Antígeno: El antígeno es el LPS liso de *B. abortus* cepa S1119-3 o S99 y un anticuerpo anti IgG1 bovino marcado con peroxidasa como conjugado (Nielsen & Gall, 1994; citado por Ortiz *et al*, 2007).). Se ha obtenido un antígeno libre de LPS (antígeno CP), que es altamente eficaz en detectar la respuesta a IgG durante una infección activa evitando al mismo tiempo las reacciones cruzadas debidas al LPS (Castro *et al*, 2006).

3.3.2.1.2.4.2.- ELISA directo

Se basa en la detección de antígenos inmovilizados sobre una fase sólida mediante anticuerpos antígenos marcados (Reina, 2003).

Fundamento: Las placas previamente impregnadas con el primer Ac monoclonal, se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha la presencia del antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo que las analizadas pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos, los cuales son soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido (Reina, 2003).

Antígeno: LPS – S

3.3.2.1.2.4.3.- ELISA competitivo (ELISA-C)

Según Ortiz (2007), este inmunoensayo presenta mayor especificidad que el ELISA indirecto y es capaz de eliminar la mayoría de las reacciones cruzadas con otras especies bacterianas que poseen el mismo LPS.

Fundamento: Se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epitope O del LPS-S, que compite con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima (Castro *et al*, 2005)

Antígeno: Emplea como antígeno el LPS liso de *B. abortus* cepa S1119-3 y el anticuerpo monoclonal M 84 como conjugado (Nielsen *et al.*, 1995; citado por Ortiz, 2007).

Anticuerpo detectados: Diferencia anticuerpos IgG de los IgM.

Ventajas

- Altamente específica.
- Emplea muy pequeña cantidad de suero.
- Proporciona buenos resultados en presencia de hemólisis.

Desventajas

- El tiempo requerido para su realización es bastante largo
- Baja sensibilidad

3.3.2.1.3.- Pruebas en leche

3.3.2.1.3.1.- Prueba del anillo en leche o “Milk Ring Test”

Se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en la leche de vacas infectadas, es una prueba que si se efectúa en forma correcta, tiene mucha sensibilidad. Este método

aún cuando no proporciona un diagnóstico definitivo, si puede brindarnos información general sobre la enfermedad en una determinada área (Díaz *et al*, 2000).

Fundamento: El antígeno se une con el anticuerpo (si está presente), formando un complejo junto con los glóbulos de grasa, que asciende por efectos del calor y forma una capa de crema coloreada de azul oscuro (anillo de color azul). Si no existen anticuerpos contra *Brucella*, el antígeno permanecerá suspendido en la leche, dando un color homogéneo azul, bajo una capa de crema blanca similar a un anillo de color blanco (Morgan *et al*, 1971 y Alton *et al*, 1975; citados por Díaz *et al*, 2000).

Antígeno: *Brucella abortus* 1119 – 3, a una concentración de 4,5%, teñido con hematoxilina.

Anticuerpos detectados: IgA e IgM (Morales, 1998).

Ventajas:

- Poco costosa
- Fácil aplicación
- Se puede vigilar la presencia de la Brucelosis en una determinada área geográfica.

Desventajas:

- Puede determinar falsos positivos (leche tiene calostro, desordenes hormonales, mastitis).

Tabla 3.3: Técnicas de Diagnóstico con su respectiva sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de Brucelosis.

Prueba de diagnóstico	Sensibilidad	Especificidad
Rosa de Bengala	^a 21%	^a 99%
Aglutinación lenta en tubo de Wright	^b 29%	^b 99%
Prueba de aglutinación con 2 - mercaptoetanol	^c 56%	^c 99%
Enzime linked inmunoabsorbent assay (ELISA)	^d 98,6%	^d 99,9%
Anillo en leche	^e 56%	^e 99%

Fuente: ^{a, b}Van Aert *et al* (1984), ^aSamartino *et al* (1999), ^{b, c}Lord et al (1989), ^dDohoo et al (1986), ^dRojas & Alonso (1994); citados por Nielsen (2002) y ^eGodfroid & Boulaert (1995).

3.4. Inmunización de animales mediante Vacunas

Se puede prevenir la infección y, por consiguiente, la aparición de la enfermedad, por medio de la vacunación. La inducción de una respuesta inmune protectora, efectiva y duradera en el caso de patógenos intracelulares facultativos (como es el caso de *Brucella*) requiere el uso de cepas vivas atenuadas, (Rivers *et al*, 2006 y Castro *et al*, 2005).

3.4.1.- Cuidados en la vacunación

La inmunidad que se estimula con la vacunación contra brucelosis es celular, para lo cual es necesario trabajar con bacterias vivas atenuadas. Es por ello que las vacunas deben ser manejadas bajo cadena de frío y su aplicación debe realizarse en el mínimo tiempo disponible luego de su disolución (Schurig 1991).

Su mal manejo, el mal estado corporal de las terneras y los pocos meses de vida en el momento de la vacunación hacen que la cobertura (animales que quedan inmunizados, luego de la vacunación) sea del orden del 75% y aún menor. Con una situación como estas, dejamos un 25% de terneras sin defensa ante esta enfermedad (Schurig, 1991).

3.4.2.- Tipos de vacunas

Actualmente en el Ecuador, se emplean dos tipos de vacunas, la Cepa 19 y la RB51, en zonas de alta y/o baja prevalencia, las cuáles se describen a continuación.

3.4.2.1.- *Brucella abortus* Cepa 19

La vacuna de cepa 19 fue derivada de un aislamiento de *B. abortus* en 1923 que fue dejada inadvertidamente a temperatura ambiente durante un año. La cepa derivó su nombre del hecho de ser el decimonoveno cultivo de una serie aislada por Buck. Se encontró que la cepa 19 era menos virulenta que las cepas de campo de *B. abortus*, sensible a la penicilina (5 U/ml), sensible al azul de tionina (1:500.000) y estable *in vivo*. La inoculación del ganado con cepa 19 induce una protección significativa contra abortos o infecciones causadas por cepas virulentas de *B. abortus* y entrega inmunidad casi de por vida contra la brucelosis (OPS/OMS, 1999). Aún así, en nuestro país, siendo la vida útil del ganado lechero de 12 años, hay estudios que demuestran claramente que los animales ya no presentan anticuerpos, y si los presentan no se sabe con certeza si se trata de anticuerpos persistentes debido a la vacunación o a una infección.

Es una cepa lisa que posee la cadena O del LPS, por ello, en animales inmunizados con esta cepa se pueden observar anticuerpos específicos contra este antígeno del tipo IgG1, IgG2 e IgM (Vemulapalli *et al*, 2000; citado por Rivers *et al*, 2006).

Su efectividad en el ganado bovino depende de variables como la edad de vacunación, dosis, ruta de administración y de la prevalencia de la brucelosis en el rebaño vacunado (Schurig *et al*, 2002).

Tabla 3.4: Manejo de la vacuna *Brucella abortus* Cepa 19.

Vacuna Cepa 19	
Edad óptima de vacunación	3 y 8 meses (Szyfres, 2000).
Dosis	6 ml (6 x 10 ¹⁰ gérmenes vivos)
Vía de administración	Subcutánea (Tabla del cuello)

Precauciones	La vacuna debe ser reconstituida y usada inmediatamente. La exposición de la vacuna a la luz solar y la demora en su aplicación deterioran el producto. Los envases y restos de vacuna no empleada deben ser desechados y preferiblemente quemados. No vacunar los machos. Consérvese en refrigeración entre 3 y 7° C. Manténgase fuera del alcance de los niños.
Presentación	Frasco por dos dosis acompañado de diluyente.

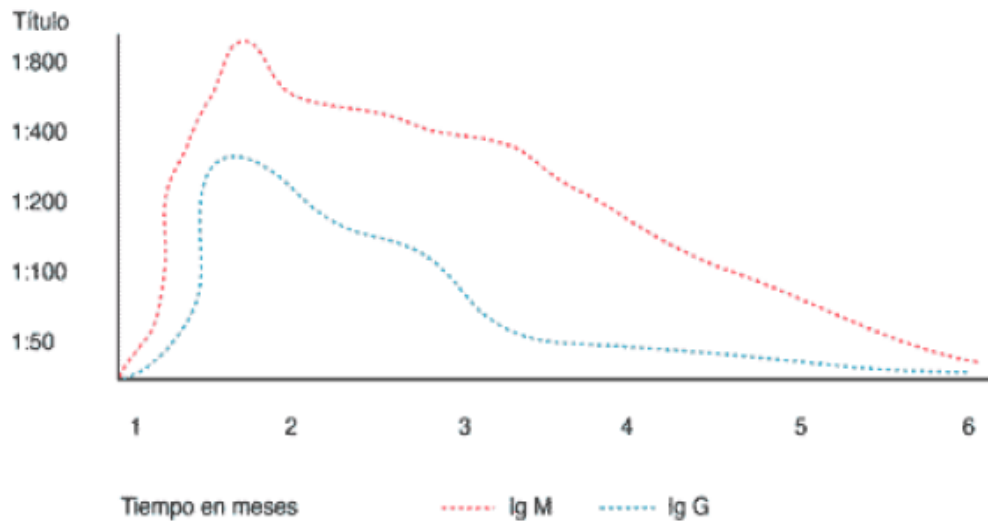
Fuente: Vademécum veterinario, 2006

3.4.2.1.1.- Influencia de la vacunación sobre el diagnóstico

La vacunación tiene indudables ventajas, pero también algunas desventajas. El inconveniente mayor es que la vacuna induce la formación de anticuerpos que pueden confundir temporalmente el diagnóstico. Para contrarrestar este inconveniente, se debe vacunar entre los 3 y 8 meses de edad. Cuanto más joven es el animal, menor tiempo retiene los anticuerpos debido a la vacunación. Las hembras vacunadas a los 3 meses, dejan de ser reaccionantes a las pruebas serológicas dos meses después de la vacunación, en cambio las vacunadas a los 6 meses tardan en hacerlo 6 meses y las vacunadas a los 9 meses (fuera de la edad permitida) mantienen la clasificación de sospechosa 15 meses después de la vacunación. En términos generales se puede afirmar que el 95 % de las hembras vacunadas a los 3-8 meses se negativizan a la edad de 2 años (Szyfres, 2000).

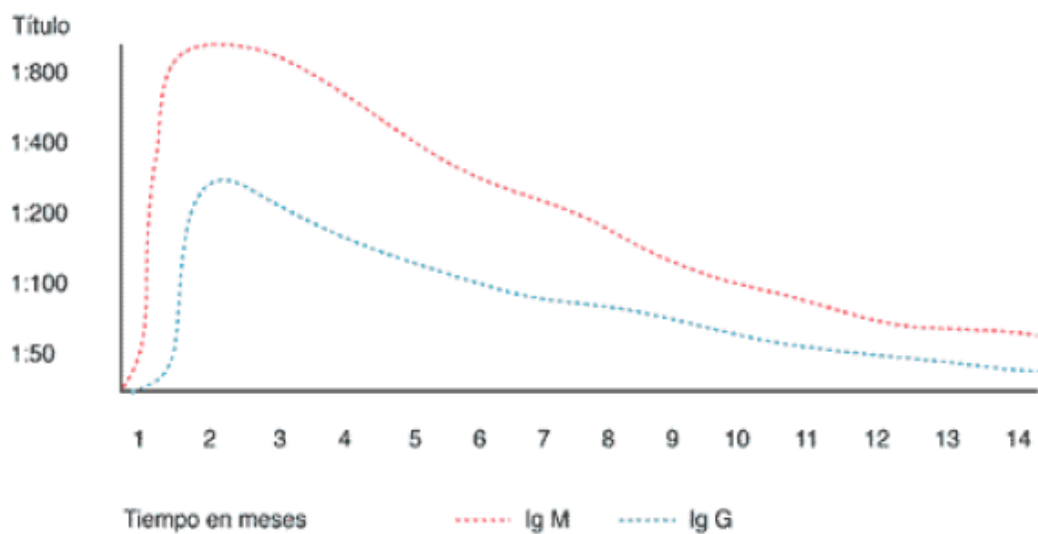
En las Figuras 3.3 y 3.4 se puede observar la relación del tenor y persistencia de los anticuerpos IgM e IgG en relación a la edad de vacunación, 4 a 6 meses y 8 meses de edad.

Gráfico 3.3.- Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con cepa 19 entre 4 y 6 meses de edad.



Fuente: Szyfres, 2000

Gráfico 3.4.- Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con la vacuna cepa 19 a los 8 meses de edad.



Fuente: Szyfres, (2000)

Como se puede observar, los anticuerpos a títulos significativos no solo desaparecen más rápidamente en terneras vacunadas entre 4 y 6 meses de edad, sino que el nivel de la IgG es mucho menor y menos persistente que cuando se vacunan animales a los 8 meses y con más razón a mayor edad.

Vacunando a edad temprana no solamente se reduce el riesgo de títulos persistentes en las pruebas serológicas sino también se confiere oportunamente la inmunidad a los animales. De ahí la recomendación de vacunar a temprana edad en los establecimientos donde se está erradicando la brucelosis (Szyfres, 2000).

3.4.2.1.2.- Ventajas

- Es incapaz de crecer en presencia de eritritol existiendo una baja probabilidad de abortos (Castro *et al*, 2005).
- Es una cepa estable, ya que a pesar de estar en el mercado desde 1923, no ha mutado.
- Se ha estimado que aunque la vacunación con cepa 19 no brinda una protección absoluta, el 65-70% de los animales vacunados están completamente protegidos, y en rebaños en los cuales la mayor parte de los novillos y terneras están vacunados, la infección animal se reduce en un 80% y la infección del rebaño en un 20% (OPS/OMS, 1999).
- Existiría la posibilidad de verificar la eficacia de la vacunación, mediante la utilización de la reacción cruzada demostrada en las pruebas serológicas (Com. Pers. Ron J., 2008)

3.4.2.1.3.- Desventajas

- Una desventaja importante radica, en que la vacunación del ganado con cepa 19 induce respuestas serológicas que no pueden diferenciarse fácilmente de las respuestas inducidas por las cepas de campo de *B. abortus* (Castro *et al*, 2005; Rivers *et al*, 2006; Richey & Harrel, 1997). Luego, las respuestas inmunológicas a la cepa 19 pueden menoscabar la identificación precisa de animales

individuales infectados con cepas de campo. Aunque la vacunación de terneras entre los 3 y 8 meses de edad reduce la incidencia, las respuestas inmunológicas pueden persistir hasta la edad adulta en un pequeño porcentaje de terneras de vacunadas (OPS/OMS, 1999).

- ☑ Puede inducir abortos en hembras preñadas, razón por la cual no es conveniente utilizarla en animales adultos.
- ☑ La exposición accidental de personas a la cepa 19 puede inducir síntomas clínicos de brucelosis (OPS/OMS, 1999).
- ☑ La cepa 19, aunque menos virulenta que las cepas de campo, puede inducir la artritis en las vacunaciones de terneras, la que se estima persiste hasta la edad adulta en 2 de cada 100.000 vacunaciones (Szyfres, 2000; OPS/OMS, 1999).
- ☑ En algunos animales se ha podido comprobar una infección duradera y persistente en el tejido mamario, con aislamiento de la cepa vacunal en leche (Szyfres, 2000).

3.4.2.2.- *Brucella abortus* Cepa RB51

Es una cepa mutante de la cepa lisa de *B. abortus* 2308 virulenta, que se atenuó por sucesivos pasajes en medios conteniendo Rifampicina, de esta manera se logró obtener una cepa rugosa (ausencia de cadena O), atenuada y estable. Por no poseer en su pared celular la cadena O, que es el epítoto inmunodominante, contra el cual se generan los anticuerpos detectables con las pruebas serológicas más utilizadas, ellas dan resultados negativos (Villarroel *et al*, 2000; SAG, 2004; Schurig *et al*, 2002).

Tabla 3.5: Manejo de la vacuna *Brucella abortus* Cepa RB51

Vacuna Cepa RB 51		
	Edad en meses	Dosis
Vacunación	4 – 10 meses (Schurig <i>et al</i> , 1999)	2 ml 1 x 10 ¹⁰ UFC
Revacunación	12 – 16 meses (Schurig <i>et al</i> , 1999)	1 X 10 ⁹ UFC (OPS/OMS, 1999)

Fuente: Vademécum veterinario (2006)

3.4.2.2.1.- Revacunación

La revacunación refuerza la inmunidad obtenida con la primera vacunación y la inmunidad general del rodeo. Definitivamente es factible la revacunación de adultos con Cepa RB51 de animales vacunados con Cepa 19, cuando eran terneras, lo cual aumenta la inmunidad, pero esto no eliminaría los problemas que se inducen con la Cepa 19. Por consiguiente, no se recomienda esta política a largo plazo ya que se pierde la ventaja más importante de vacunar con Cepa RB51, que es la eliminación del problema de diagnóstico que induce la Cepa 19. Sin embargo en rodeos que van a cambiar a vacunación con RB51, se recomienda la revacunación de adultas con esta vacuna que previamente fueron vacunadas como terneras con Cepa 19 para luego continuar el programa vacunando todas las terneras nuevas con RB51 seguido por revacunación entre los 12 y 16 meses con esa Cepa (Schurig, 2002).

Revacunaciones anuales no son necesarias, sin embargo en áreas de alta incidencia, la revacunación anual puede dar ventajas.

Pareciera ser razonable recomendar revacunación cada 2 años después de la primera (terneras) y segunda (12 – 16 meses de edad) vacunación (Schurig *et al*, 2002).

3.4.2.2.2.- Ventajas

- No induce serología que interfiera con el diagnóstico
- Permite la revacunación de los animales a cualquier edad y múltiples veces.

- ☑ La revacunación aumenta la inmunidad del animal individual y la del hato en general.
- ☑ Según Schurig (2002); es más atenuada que la Cepa 19, ya que se han realizado estudios, en los que al vacunar con RB51, no causa abortos (Samartino *et al*, 2003); pero es más seguro utilizarla en animales que no superen el primer tercio de preñez.
- ☑ Los estudios económicos indicaban un ahorro de millones de dólares que se gastan en problemas diagnósticos inducidos por Cepa 19.

3.4.2.2.3.- Desventajas

- ☑ Aunque en estudios de campo la dosis de 1×10^9 UFC ha demostrado ser segura para los animales en gestación, se han registrado abortos después de la administración inadvertida de la dosis completa para el período de ternera durante la gestación (OPS/OMS, 1999).
- ☑ A pesar que la empresa que creó la vacuna, afirma que no es patógena para el hombre; en 1999, se realiza el primer aislamiento de la cepa RB51 de un médico veterinario de 27 años de edad que presentaba sintomatología clínica sugerente de Brucelosis (Villaruel *et al*, 2000).
- ☑ En áreas de alta incidencia, se debe realizar vacunaciones anuales, lo cual implica mayores gastos.
- ☑ Al ser Rifampicina resistente, la infección en humanos es más difícil de tratar.
- ☑ Más costosa.

3.5.- Respuesta Inmunológica

En la infección por *Brucella*, las células del huésped se exponen a dos antígenos diferentes, el LPS y las proteínas de la pared celular, los que ejercen diferentes formas de activación del sistema inmune (Ortiz *et al*, 2007). Los antígenos proteicos se localizan en compartimentos intracelulares de las células presentadoras de antígeno (CPA), como los macrófagos, las células asesinas y los neutrófilos (Castro *et al*, 2005), los cuales son procesados a pequeños péptidos, que se asocian con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I ó II, son presentados en la superficie de las CPA y reconocidos por los linfocitos T. El LPS es un antígeno T-independiente capaz de activar los linfocitos B (LB) para la producción de anticuerpos (Splitter *et al*, 1996; citado por Ortiz, 2007; Aréstegui, 2001).

3.5.1.- Inmunidad mediada por células

Es la responsable del control de la infección; *B. abortus* es una fuerte inductora de la inmunidad celular tipo I, por su capacidad para estimular la producción de interleucina-12 (IL-12) en macrófagos, por la interacción del LPS con el receptor CD14, la cual estimula a las células asesinas y a los linfocitos T CD4+ (LTCD4+) a secretar más interferón gamma (IFN- δ). Los linfocitos T citotóxicos (LTc) CD8+ activados por el IFN- δ , liberan las sustancias granzina y perforina, que facilitan la lisis de los macrófagos para que las bacterias queden libres y sean fagocitadas por macrófagos activados (Holding *et al.*, 2001; citado por Ortiz, 2007; Aréstegui *et al* 2001).

3.5.1.1.- Macrófagos

Estas células juegan un rol central en la respuesta inmune frente a *Brucella*, ya que actúan como células fagocíticas profesionales y como células presentadoras de antígenos. Procesan antígenos en sus compartimentos intracelulares y los presentan en

el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, a linfocitos T (Rivers *et al*, 2006).

3.5.1.2.- Neutrófilos

Están implicados en el desarrollo de una defensa temprana frente a una infección por *Brucella* mediante la fagocitosis y posterior destrucción del microorganismo. En primer lugar, los neutrófilos son atraídos al sitio de la infección por estímulos químicos originados por el microorganismo (Birmingham, 1982), para posteriormente fagocitarlo (Young, 1997). Una vez que el patógeno es fagocitado, se desencadenan mecanismos por parte de la bacteria, los cuales fueron nombrados anteriormente, que le permiten sobrevivir y multiplicarse en el interior de los neutrófilos y además es diseminada a través de éstos a diferentes órganos, desarrollándose una infección persistente (Ariza, 2000; Rivers *et al*, 2006) Por ello, aunque éstos son las primeras células relacionadas con la eliminación de patógenos extraños, son considerados de baja eficiencia contra *Brucella*.

3.5.1.3.- Células asesinas (Natural Killer)

Forman parte de la primera línea de defensa contra *Brucella*, y una vez que son activadas pueden eliminar células infectadas, ya que la bacteria puede impulsar la actividad lítica de las células asesinas, estimulando la producción de interleuquina – 12 (IL – 12) por parte de las células presentadoras de antígenos (Rivers *et al*, 2006).

3.5.2.- Inmunidad Humoral

Está ampliamente aceptado que la inmunidad mediada por células es el mecanismo efector más relevante en la protección frente a *Brucella*, debido a que es un patógeno

intracelular (Oliveira *et al*, 2002), sin embargo la exposición prolongada de un animal ante la bacteria, cambia la naturaleza de la respuesta inmune, desde una inmunidad mediada por células hacia una respuesta humoral, la cual se caracteriza por la producción de anticuerpos (Rivers *et al*, 2006).

3.5.2.1.- Inmunoglobulinas

El término inmunoglobulinas comprende las proteínas que poseen actividad de anticuerpo. Las principales inmunoglobulinas (Ig) que nos conciernen en brucelosis son la M y la G. Se reconocen en el bovino dos subclases de IgG: IgG 1 e IgG 2. La IgG 1 es la más abundante en el suero y secreciones lácteas mientras que la IgG 2 se encuentra en concentraciones mas bajas, pero puede aumentar en determinadas circunstancias. Las inmunoglobulinas IgM e IgG se diferencian entre otras características por su peso molecular, constante de sedimentación, estabilidad al calor, movilidad electroforética, resistencia al 2-mercaptoetanol, precipitación por el rivanol que es un compuesto de la acridina e inhibición por pH ácido (Szyfres, 2000).

3.5.2.1.1.- Evolución de las inmunoglobulinas en animales vacunados e infectados

En los animales vacunados con Cepa 19, las IgM aparecen primero, entre los 5 y 7 días posvacunación y alcanzan su máxima concentración a las 2-3 semanas (Szyfres, 2000). Luego su concentración en el suero va reduciéndose pero sin desaparecer durante varios meses o años (Ortiz *et al*, 2007).

Las IgG aparecen casi al mismo tiempo, o algo más tarde, y alcanzan su máxima concentración de 28 a 42 días después de la vacunación. Estas inmunoglobulinas desaparecen más rápidamente que las IgM, perdurando unos 6 meses después de la

vacunación de terneras jóvenes (Szyfres, 2000), pero pueden persistir más tiempo en algunos adultos (Ortiz *et al*, 2007).

La infección natural o experimental con cepas de *Brucella abortus* virulentas va seguida de la formación de IgM e IgG, pero la concentración de Ig M declina, mientras que la IgG tiende a persistir todo el tiempo que el animal está infectado (Ortiz *et al*, 2007; Samartino, 2003 y Szyfres, 2000).

Según Ortiz (2006); en animales con brucelosis crónica la IgG es la inmunoglobulina principal y a veces la única detectable. En consecuencia, la diferencia principal entre animales vacunados e infectados es la perdurabilidad de la IgG en estos últimos.

3.6.- Epidemiología

3.6.1.- La brucelosis a nivel mundial

Actualmente se considera a la brucelosis como una enfermedad de distribución mundial, siendo muy común en países de bajos recursos económicos pero bien controlada en la mayoría de países desarrollados, y en otros inclusive, ya fue eliminada mediante programas de control y erradicación como es el caso de Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia (Díaz *et al*, 2000).

La incidencia y prevalencia de la brucelosis tienen importantes variaciones geográficas. Las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América, dentro de éste, se encuentran Estados Unidos, México, Brasil, Colombia y Argentina (Adams, 1997; citado por Castro, *et al*, 2005).

3.6.2.- La brucelosis en el Ecuador

La brucelosis del ganado bovino en el Ecuador, se encuentra ampliamente difundida en el país, en grados variables de intensidad, de acuerdo con los diferentes sistemas de producción ganadera existentes.

El SESA ha realizado la caracterización epidemiológica del Ecuador en tres zonas, en base a un trabajo realizado entre 1978 y 1979, en aproximadamente 15.000 bovinos, las cuáles se describen a continuación:

3.6.2.1.- Regiones de alta prevalencia

Conformada por provincias de la Sierra norte (zona 1= Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo), con una prevalencia de entre 4% y 10,62%; así como por provincias de la región Litoral (zona 2= Guayas, Los Ríos, El Oro, Esmeraldas y Manabí), con una prevalencia de entre 5,88% y 10,62%.

3.6.2.2.- Regiones de baja prevalencia

En la cual se encuentra las provincias de la sierra sur (zona 3 = Bolívar, Cañar, Azuay y Loja), con una prevalencia entre 1,3% y 2,6%. El SESA no dispone de información sobre la prevalencia de la enfermedad en la región amazónica (zona 4), pero ha estimado que dada la similitud de los sistemas de manejo empleados, la prevalencia debe ser igualmente baja.

3.6.2.3.- Región indemne

Archipiélago de Galápagos (zona 5); ya que de 114 propiedades, no hubo animales reaccionantes a Rosa de Bengala.

La Tabla 3.6, resume las principales investigaciones realizadas en el tema de brucelosis animal.

3.7.- Estrategias de Prevención y Control en el Ecuador

En el año 2000, el MAG – SESA, propuso las siguientes estrategias para prevenir, controlar y erradicar la Brucelosis de los hatos bovinos:

- Vacunar obligatoriamente a todas las terneras hembras entre los 4 y 8 meses de edad, con vacuna *Brucella abortus*.
- En áreas de mediana y alta prevalencia deberán revacunar a los 15 meses a todas las hembras utilizando la misma cepa.
- Realizar los muestreos sanguíneos en animales adultos sin vacunar en las fechas preestablecidas, según el esquema y situación sanitaria establecida de cada fin
- Los animales positivos a las pruebas serológicas, deberán identificarse mediante marca de fuego con la letra “B” en la cara (cachete) de lado izquierdo y aislarse de inmediato del resto del rejo, hasta que sean eliminados de la finca con destino al camal.
- Las hembras que aborten deberán aislarse del resto del hato, informando al Médico Veterinario responsable, para que en un transcurso de 10 días después del aborto, tome las muestras pertinentes, para laboratorio, con el fin de realizar el diagnóstico definitivo.
- Si el diagnóstico arroja un resultado positivo a Brucelosis, las vacas deberán continuar aisladas hasta su sacrificio. Los fetos abortados deberán enviarse de inmediato al laboratorio de diagnóstico para su estudio.

- ☑ Los productores deben llevar registros sobre los resultados de diagnósticos realizados.
- ☑ A las fincas solo pueden ingresar animales provenientes de otras fincas certificadas como libres, o con resultados negativos a la prueba serológica para Brucelosis. Los animales que así han ingresado deberán mantenerse en aislamiento dentro de la finca por 30 días mínimo.
- ☑ Se considera que una finca está libre de Brucelosis, cuando todas las hembras mayores a 24 meses y los machos mayores a 8 meses, son negativos a dos pruebas serológicas consecutivas de Rosa de Bengala, practicadas en un intervalo de 6 meses.
- ☑ A las fincas establecidas como libres de Brucelosis, el SESA les otorgará un certificado especial que así las acredite. Este certificado tendrá validez de 1 año para el primer período, contado a partir del momento de la certificación, y posteriormente será otorgado por 2 años. Su renovación se realizará demostrando que la finca continúa libre de la enfermedad, mediante la prueba serológica de Rosa de Bengala o por tres pruebas del anillo en leche (Ring Test) realizado con un intervalo de 30 días.

Tabla 3.6: Investigaciones sobre Brucelosis, realizadas en las universidades ecuatorianas.

Autores	Especie	Zona	Pruebas	No.de animales	No. de rebaños	% de positivos
	animal	de estudio	utilizadas	muestreados	muestreados	
Alvarado, 1959	bovinos	Zaruma	SAT	607	26	3,45
Quinde, 1960	bovinos	Loja	Huddleson	300	-	0,66

Vásconez, 1960	bovinos	Quito	MRT	Desconocido	Pasteurizadora	60 - 80
Tobar, 1961	ovinos	Desconocido	MRT - SA	30	-	0
	caprinos		MRT - SA	19	-	0
	porcinos		MRT - SA	200	-	3
Ortíz, 1962	caprinos	Guayas	SA	Desconocido	-	0
Encalada, 1963	porcinos	Guayaquil	SA	1000	-	3,4
Gómez, 1964	bovinos	Zona Litoral	SA	2400	-	12
Robalino, 1966	porcinos	Quito	SA	1200	CMQ	7,25
Olleague, 1969	bovinos	El Oro	MRT	1231	208	7,63
Valdivieso, 1969	bovinos	Machala	SA	1537	-	9,88
Chauvin, 1969	bovinos	Loja	Huddleson	Desconocido	-	0
Aragundi, 1969	bovinos	Los Ríos	MRT	257	113	33
García, 1970	bovinos	Manabí	MRT	233	-	5,5
			SA	145		6,2
Manzano, 1974	bovinos	Tungurahua	MRT - SA	Desconocido	47	11,41
Maldonado y Salgado, 1979	bovinos	Car, Imb, Pich	RB	989	-	51,57
		Cot y Man.	IC	989		52,57
Rivadeneira, 1981	bovinos	Upano	SA	850	-	0,9
Brito y González, 2001	bovinos	Manabí	RB	608		0,86
			ELISA - C	6		No reportado
Miño y Pico, 2003	bovinos	Cantón Mejía	RB	1012	59	13,53
			BPA			18,97
			ELISA - I			32,01
Angulo y Tufiño, 2005	Bovinos	El Carmen y	SAT, RB	1200	50	1,08 - 9,73
		Sto. Domingo	ELISA - I			2,17 - 9,4

(SAT) prueba seroaglutinación, (MRT) "Milk Ring Test", (IC) prueba de inactivación por calor, (ELISA - C) prueba ELISA competitivo, (ELISA - I) prueba ELISA indirecto, (CMQ) Camal Municipal de Quito, (Car) Carchi, (Imb) Imbabura, (Pich) Pichincha, (Cot) Cotopaxi, (Man) Manabí.

Fuente: Ron (2003)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Características del Campo Experimental

El presente estudio fue realizado en la Hacienda El Prado, propiedad de la Escuela Politécnica del Ejército, que se dedica a la explotación de ganado bovino, ovino,

porcino y a la crianza de especies menores (conejos y cuyes). Dentro de la parte agrícola, se cultiva trigo, papas, habas, cítricos, flores, bosques.

En la hacienda se practica la monta estacional en dos períodos, el primero empieza el 1 de enero hasta el 31 de marzo y el segundo, va desde el 1 de julio hasta el 30 de septiembre, de tal forma que los partos suceden en los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre, para el primer período y en los meses de Abril, Mayo y Junio para el segundo período. En las praderas, los animales disponen de agua y sal mineralizada a voluntad y se someten a planes preventivos de salud, de acuerdo con las normas sanitarias estipuladas por los profesionales de la hacienda.

4.1.1 Ubicación

- Ubicación: Instalaciones de Ganadería de la Hacienda “ El Prado”
- Parroquia: Loreto
- Cantón: Rumiñahui
- Provincia: Pichincha
- Latitud: 0°23'20''
- Longitud: 78°24'44''
- Altitud: 2780 msnm

4.1.2 Características agro climáticas

- Temperatura media: 13,5 °C
- Humedad relativa: 69,03%
- Temperatura promedio del agua: 12-13 °C
- Luminosidad: 12 h/luz
- Precipitación anual: 1270 mm/año

4.2.- Etapas realizadas

4.2.1.- Etapa de campo

4.2.1.1.- Materiales

- 22 hembras Holstein, 1 hembra Jersey, y 3 hembras híbridas: Holstein x Jersey (2 terneras) y Holstein x Brown Suis (1 ternera). En total, 26 animales en estudio.
- Tubos - vacutainer
- Agujas – vacutainer
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Capuchón
- Guantes
- Mascarillas
- Algodón
- Alcohol
- Sogas
- Marcador para identificar y señalar a los animales
- Manga del establo del IASA

4.2.1.2.- Selección e Identificación de animales

Se trabajó con 26 hembras, que tenían entre 4 y 6 meses de edad, que fueron correctamente identificadas con nombre y arete (Cuadro 4.1). Su sistema de crianza fue en jaulas. La alimentación durante los 4 primeros días fue con calostro a razón de 4 litros/animal/día. Desde el quinto día, hasta el destete (3 meses) recibieron leche entera

a razón de 4 litros/animal/día. El consumo aproximado de concentrado fue de 1 kg/animal/día, mientras que el consumo de agua y hierba fue a voluntad.

Cuadro 4.1: Identificación y datos de animales en estudio.

Nombre	Arete	Raza	Edad al inicio del estudio (meses)
Indiana	604	Holstein	6
Isidora	605	Holstein	6
Fresita	606	Holstein	6
Inspirada	607	Holstein	6
Famosa	608	Holstein	6
Irina	609	3/4 H. 1/4 J.	6
Catalina	610	1/2 H. 1/2 BS	6
Coroneza	611	Holstein	6
Dolorosa	612	Holstein	5
Santa	613	Holstein	5
Lojanita	614	Holstein	5
Ibarreña	615	Holstein	5
Dominga	616	Holstein	5
Leticia 2	617	Holstein	5
Mareada	618	Holstein	5
Bonita	619	Holstein	5
Jugadora	620	Holstein	5
Pionera	621	Holstein	5
Francesa	622	3/4 J. 1/4 H.	5
Luna	623	Holstein	4
Hada	624	Holstein	4
Martina 2	625	Holstein	4
Bambi	626	Jersey	4
Emilia	627	Holstein	4
Shadia	628	Holstein	4
Nicole	629	Holstein	4

(H): Holstein, (J): Jersey, (BS): Brown Suis

Fuente: Investigación directa

Elaboración: El Autor

4.2.1.3.- Vacunación

Se utilizó la vacuna antibang (vacuna Cepa 19 contra brucelosis), cuya presentación es en frascos de 2 dosis, acompañado de diluyente, el cual contiene 6×10^{10} gérmenes vivos por dosis.

Debido a que es una vacuna viva atenuada, fue manejada bajo cadena de frío (2 a 4° C) y su aplicación se realizó en el mínimo tiempo disponible luego de su reconstitución. Su almacenamiento, transporte y aplicación se realizó de la forma más adecuada, de acuerdo con los procedimientos recomendados para la aplicación de vacunas.

Se aplicó 6 ml de la vacuna, en inyección por vía subcutánea, en la tabla del cuello de cada ternera. El área fue ligeramente desinfectada con alcohol y posteriormente a la inoculación se masajeó levemente la zona, para dispersar la vacuna en el tejido. Se utilizó una aguja y una jeringuilla estéril desechable para cada ternera. Todo el material desechable utilizado en el proceso de vacunación fue retirado del predio y eliminado apropiadamente.

4.2.1.4.- Revacunación

En la Hacienda “El Prado” se han venido realizando revacunaciones de las hembras con la vacuna RB51, antes de que estas entren al empadre. La finalidad de la revacunación, es la de reforzar la inmunidad obtenida con la primera vacunación (Cepa 19) considerando que la vacuna RB51 no induce serología que interfiera con el diagnóstico. Así, los animales en estudio fueron revacunados después de 6 meses de su primera vacuna, es decir cuando éstos tenían entre 10 y 12 meses de edad.

La forma de presentación de la vacuna RB51 es, en frascos de 5 dosis, liofilizado, con una cantidad de 1×10^{10} gérmenes vivos por dosis. Por tratarse de una vacuna viva atenuada, similar a la Cepa 19, se tomaron las mismas precauciones nombradas anteriormente.

4.2.1.5.- Conformación de grupos de trabajo

Para comparar el nivel de persistencia de los anticuerpos IgM e IgG, en relación a la edad de vacunación, se clasificó a los animales en tres grupos, A, B y C (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2: Grupos de trabajo y edad a la vacunación

Grupos	Arete	Edad a la vacunación Cepa 19 (meses)
A N = 8	604	6,87
	605	6,63
	606	6,57
	607	6,50
	608	6,37
	609	6,27
	610	6,20
	611	6,10
B n = 11	612	5,93
	613	5,90
	614	5,87
	615	5,87
	616	5,83
	617	5,83
	618	5,83
	619	5,50
	620	5,47
	621	5,37
	622	5,10
C N = 7	623	4,80
	624	4,80
	625	4,60
	626	4,47
	627	4,17
	628	4,17
	629	4,17

Fuente: Investigación directa

Elaboración: El Autor

En el mes de septiembre del año 2006, se realizó la prueba Rosa de Bengala (RB) a todos los animales, y así determinar la prevalencia de Brucelosis en el hato y descartar los reactores positivos. Algunas de las terneras en estudio son hijas de vacas que fueron positivas en este análisis. Con la finalidad de determinar si existe alguna diferencia en la supervivencia de anticuerpos post-vacunales, las terneras fueron

divididas en dos grupos: 1) Terneras hijas de madres reactoras a RB y 2) Terneras hijas de madres no reactoras a RB (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3: Terneras hijas de madres reactoras a RB y Terneras hijas de madres no reactoras a RB.

Animales en estudio		Información de la madre		
Grupos	Arete	Arete	Número de abortos	Resultado a RB
1 n = 7	605	2004	0	+
	606	9712	0	+
	612	101	1	+
	623	207	0	+
	624	9916	1	+
	628	9836	1	+
	629	103	2	+
2 n = 19	604	327	0	-
	607	332	0	-
	608	211	0	-
	609	222	0	-
	610	328	0	-
	611	95707	0	-
	613	95201	0	-
	614	125	0	-
	615	241	0	-
	616	214	0	-
	617	330	0	-
	618	110	0	-
	619	2040	0	-
	620	9935	0	-
	621	319	0	-
	622	111	0	-
625	333	0	-	
626	07 – J	0	-	
627	9635	0	-	

RB: Prueba de aglutinación rápida en placa Rosa de Bengala

Fuente: Investigación directa

Elaboración: El Autor

4.2.1.6.- Esquema de muestreo

Para determinar la cinética de los anticuerpos generados por la primovacunación, se tomaron muestras sanguíneas de la vena yugular hasta cuando los animales cumplieron 12 meses, a partir de esta edad, se tomaron muestras de la vena caudal, de acuerdo al siguiente esquema:

Cuadro 4.4: Esquema de toma de muestras

No. de muestra	Intervalo de muestreo	Tiempo de estudio
Muestra 1	15 días antes de la vacunación	1 día
Muestra 2	El día de la vacunación	1 día
Muestras 3 a 14	Cada 7 días	3 meses
Muestras 15 a 20	Cada 14 días	3 meses
Muestras 21 a 28	Cada 7 días	2 meses
Muestras 29 a 33	Cada 14 días	2 meses
Muestras 34 a 36	Cada mes	3 meses

Elaboración: El Autor

4.2.2.- Etapa de laboratorio

Las muestras de sangre recolectadas mediante tubos vacutainer, fueron centrifugadas y el suero almacenado en congelación (-20° C), para luego ser procesados en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), de la Universidad Central del Ecuador, según protocolos establecidos.

4.2.2.1.- Pruebas de diagnóstico utilizadas en la investigación

Se emplearon las siguientes técnicas para el diagnóstico de brucelosis bovina: Rosa de Bengala (RB) y Suero – aglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA). Se realizó además la técnica de inmunoensayo “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto (iELISA) recomendado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Con la finalidad de determinar el tipo y persistencia de los anticuerpos generados por la vacunación, se tomó en cuenta los resultados de las siguientes pruebas cuantitativas:

- SAT–EDTA, para determinar anticuerpos tipo IgM, medidos en UI (Unidades Internacionales de aglutinación).

- iELISA, para determinar anticuerpos tipo IgG, medidos en Unidades/ml

4.2.2.1.1.- Protocolo de pruebas diagnósticas

El procedimiento a seguir en cada una de las pruebas se realizó de acuerdo a los protocolos descritos por Ron (2003).

4.2.2.1.2.- Prueba de aglutinación rápida en placa. “Rosa de Bengala” (RB)

4.2.2.1.2.1.- Materiales:

- Placas alveoladas de vidrio (VWR, hech 2418)
- Pipeta automática Eppendorf, calibrada a 30 µl
- Cuentagotas, calibrado a 30 µl
- Cronómetro Hanhart
- Aglutinoscopio (caja de madera, provista de una fuente de luz indirecta)
- Vortex Hheidolph, REAX top.
- Peines plásticos desechables.

4.2.2.1.2.2.- Reactivos:

- Bengatest (Synbiotics Código # ABGT, suspensión concentrada (8%) de *Brucella abortus* Cepa 1119 de Weybridge, inactivada por calor y el fenol (5%), dispersa en tampón ácido y coloreada con Rosa de Bengala.
- Sueros a investigar
- Sueros controles:

Controles negativos: los sueros SBFneg 1, SBFneg 2, SBFneg 3 (SBFneg = suero bovino Francia negativo), procedentes del “Laboratoire Départemental d’Analyses et de Recherches de la Haute – Vienne” (Limonges – Francia), así como el suero

SBBneg (SBBneg = suero bovino Bélgica negativo) procedente del “Centre d’Etude et de Recherche Veterinaires et Agrochimiques” (CERVA), fueron utilizados como controles negativos.

Controles positivos: los sueros SBFpost 4, SBFpost 6 (SBFpost = Suero bovino Francia positivo) y el suero SBBpost 2 (SBBpost = suero bovino Bélgica positivo), procedentes de los dos laboratorios de referencia (Francia y Bélgica), fueron utilizados como sueros controles positivos.

4.2.2.1.2.3.- Protocolo

- Los sueros controles (negativo y positivo), así como los sueros a investigar y el antígeno, fueron mantenidos a temperatura ambiente por un tiempo de 50 y 60 minutos antes de efectuar la prueba.
- Con una pipeta Eppendorf, se depositó sobre la placa, 30 µl de sueros de cada una de las muestras a investigar previamente homogenizadas.
- Se colocó 30 µl del suero control positivo, suero control negativo y la solución fisiológica, en cada sitio de la placa, siguiendo la hoja de trabajo diario (ver anexo A).
- Una gota (30 µl) de antígeno, fue depositado junto a cada gota de suero.
- Se mezcló el antígeno y el suero, utilizando para cada muestra, el extremo de un peine plástico, y durante 4 minutos se imprimió a la placa un ligero movimiento rotatorio en sentido horario y anti-horario.
- Transcurridos los 4 minutos, se procedió a realizar la lectura, la observación de la aglutinación, se efectuó con la ayuda de un aglutinoscopio.

4.2.2.1.2.4.- Validación

Para validar la prueba se comparó con los resultados de los controles, con el fin de dar un diagnóstico positivo o negativo.

4.2.2.1.2.5.- Interpretación

Los diferentes grados de aglutinación, fueron determinados según los siguientes criterios: el criterio de negatividad (ausencia de anticuerpos), o de positividad (presencia de anticuerpos), así:

- (-) sin aglutinación, ni formación de un borde color rosa
- (+) presencia de aglutinación fina y formación de un borde rosado poco visible.
- (++) aglutinación fina y formación de un borde rosado fino
- (+++) aglutinación gruesa y formación de un borde rosado, bien definido
- (++++) aglutinación gruesa, formación de un borde rosado bien definido y aclaración de la muestra.

Nota: Es importante indicar que esta escala de positividad, es empleada de forma particular por el CIZ, con la finalidad de realizar una correlación posterior con los resultados del iELISA.

4.2.2.1.3.- Prueba de aglutinación lenta en tubo o de Wright. “Suero Aglutinación de Wright” (SAT) con EDTA:

4.2.2.1.3.1.- Materiales y Equipos:

- Estufa Memmert
- Placas de microtitulación, con fondo cónico “U”

- Sistema de espejo de aumento, para la lectura de las placas de micro-titulación.

4.2.2.1.3.2.- Reactivos:

- Antígeno SAT de la casa Synbiotics (Antígeno para el diagnóstico serológico de brucelosis, por aglutinación lenta en tubo, Suero – aglutinación de Wright)
- Cloruro de Sodio
- Muestras de suero a investigar

4.2.2.1.3.3.- Soluciones y tampones:

- Tampón SAT – EDTA
 - PBS (Phosphate Buffered Saline) (Oxoid # BR0014G) 10 tabletas
 - EDTA 5 Mm
 - Agua destilada (ajustar a 1 L)

* El pH de este tampón fue ajustado a 7,2 con NaOH (1 N).

- Solución de antígeno
 - Antígeno 5 % (v/v) 50 ml
 - Tampón SAT – EDTA 950 ml

4.2.2.1.3.4.- Protocolo

Las diluciones del suero a investigar así como de los sueros controles (negativo y positivo), se efectuó sobre la micro placa de titulación.

Gráfico 4.1: Procedimiento para la realización de la prueba SAT

		Cúpulas											
Pasos	Reactivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	TSAT-EDTA (16ul)		16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
2	Suero (16ul)	16	16										
3	Diluir												
4	TAg (200 ul)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
	Dilución Final	$\frac{1}{12,5}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$

Fuente: Ron (2003)

Se colocó 16 µl de Tampón SAT – EDTA en las cúpulas 2 a 12 (prueba complementaria de titulación de anticuerpos). Seguidamente 16 µl de suero a investigar fue colocado en la cúpula 1 y 2. Luego de mezclar el contenido de la cúpula 2 (dilución 1/25), 16 µl del contenido de ésta cúpula, fueron colocados en la cúpula 3, para de esta forma obtener la dilución 1/50. Como se efectuó la prueba complementaria para la titulación de los Ac, las diluciones fueron realizadas hasta la cúpula 12 (dilución 1/25600).

Luego de adicionar 200 µl de solución de Antígeno a cada una de las cúpulas, las placas fueron incubadas a 37° C por 20 horas, en una caja plástica con ambiente húmedo.

4.2.2.1.3.5.- Lectura de placas e interpretación de resultados

La lectura se realizó, utilizando el dispositivo para lectura de micro placas de titulación, provisto de un espejo en la parte inferior.

- El resultado fue negativo cuando el antígeno forma en el centro de la cúpula un punto compacto de color blanco, con un borde neto.

- El resultado fue positivo cuando se forma una fina capa de sedimento, repartido uniformemente sobre todo el fondo de la cúpula, o cuando existe la formación de una gran zona de sedimentación, rodeada por un espacio de líquido completamente transparente.

Tabla 4.1: Relación entre el grado de translucidez, dilución del suero a investigar, y Unidades Internacionales de Aglutinación (UI), según diluciones del suero control positivo.

Dilución del suero	Porcentaje de translucidez de la muestra		
	25%	50%	75%
1/12,5	15 UI	20 UI	25 UI
1/25	30 UI	40 UI	50 UI
1/50	60 UI	80 UI	100 UI
1/100	120 UI	160 UI	200 UI
1/200	240 UI	320 UI	400 UI
1/400	480 UI	640 UI	800 UI
1/800	960 UI	1280 UI	1600 UI
1/1600	1920 UI	2560 UI	3200 UI
1/3200	3840 UI	5120 UI	6400 UI
1/6400	7680 UI	10240 UI	12800 UI
1/12800	15360 UI	20480 UI	25600 UI
1/25600	30720 UI	40960 UI	51200 UI

UI: Unidades Internacionales

Fuente: Ron (2003)

Los diferentes porcentajes de aglutinación fueron determinados en comparación con diluciones controles del suero positivo, con porcentajes de aglutinación de entre 0, 25, 50 y 75%. Los resultados fueron expresados en Unidades Internacionales de Aglutinación (UI), las cuales se presentan en la Tabla 4.1

4.2.2.1.4.- Prueba “Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay” indirecto (iELISA)

4.2.2.1.4.1.- Materiales y Equipos:

- Pipetas automáticas Eppendorf (Rangos de 0.5 – 10 μ l, 10 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l)
- Pipetas multicanal Transferpette - 8 (Rango 20 a 200 μ l)
- Placas de Poliestireno “Nunc” – Inmuno Modules F8 Maxisorb
- Lavador de microplacas “Nunc” – Inmuno TM
- Balanza automática Mettler Toledo AB1004
- Incubador Memmert
- Destilador de agua modelo “Distinction”
- Des-ionizador Barnstead Thermolyne Do 803
- Potenciómetro Mettler Toledo MD 220
- Espectrofotómetro automático Modelo Stat Fax 2100
- Centrífuga Meditronic Selecta
- Material de vidrio (vasos de precipitación, balón aforado, probetas, tubos de ensayo)
- Material de plástico (puntas desechables, pipetas, gradillas)

4.2.2.1.4.2.- Reactivos:

- Glicina [$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$] (Merck # 1.04201.0250) $M=75.07$ g/mol
- Cloruro de Sodio [NaCl] (Merck # 1.06404.1000) $M=58.44$ g/mol
- Hidróxido de Sodio [NaOH] (Merck # 1.06498.1000) $M = 40$ g/mol
- Titriplex (EDTA) [$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] (Merck 1.08418.0250) $M = 372.4$ g/mol
- Tween 80 (Merck # 8.22187.0500)
- Hidrógeno Fosfato de Disodio (Merck 1.06586.0500) $M = 141.96$ g/mol
- Ácido clorhídrico [HCl] (Merck # 1.00317.2500)

- Tween 20 (Merck # 8.22184.1000)
- Newborn Calf Serum (NBCS) (Gibco Cat No. 16010-167)
- ImmunoPure Protein G Peroxidase (Conjugado Pierce Código # 31499)
- Tampón Fosfato Citrato (Sigma P – 4809)
- oPD (o – phenylenediamine Sigma P – 8287)
- Perhydrol [H₂O₂ 30% v/v] (Merck # 1.07210.1000)
- Ácido Sulfúrico [H₂SO₄] (Merck # 1.00731.2500)
- Lipopolisacárido (LPS) (CERVA – Bélgica)
- Muestras de sueros a investigar

4.2.2.1.4.3.- Tampones:

- Tampón Glicina (**GS**), 10 veces concentrado

- Glicina	1 M (75.07 g)
- Cloruro de Sodio	1.7M (99.34 g)
- Agua destilada	aforar a 1 litro

* Una vez ajustado el pH a 9.2 + 0.1, con una solución de NaOH (1M), el tampón puede ser conservado por un máximo de 4 meses a 5° C + 3°C.

- Tampón Glicina EDTA Tween 80 (**GS – EDTA – Tw 80**)

- Tampón GS	100 ml
- Titriplex (EDTA)	50 Mm (18.6 g)
- Tween 80 (diluido previamente 1/10, en agua destilada)	0.1% (v/v) 10 ml
- Agua destilada	(aforar a 1 litro)

* Luego de ajustar el pH a 9.2 ± 0.1 , con NaOH (1 M), el tampón puede ser conservado por 2 meses como máximo, a 5°C .

Tampón Conjugado (**G – HRPO**)

- Hidrógeno Fosfato de sodio 10 mM (1.4196g)
- Cloruro de Sodio 150 mM (8,766 g)
- Tween 80 (diluido previamente 1/10, en agua destilada) 0.1% (v/v) 10 ml
- Agua destilada aforar a 1 litro

*El pH de este tampón se ajusta a 7.2 ± 0.1 con una solución de HCl (1N), y puede ser conservada por 2 meses como máximo, a $5^{\circ}\text{C} + 3^{\circ}\text{C}$.

Tampón de revelación (**TR**)

- Tampón Fosfato Citrato 1 tableta
- Agua destilada 100 ml

Tampón para diluir la curva de calibración (**BS**)

- Tampón GS – EDTA – Tween 80 10 ml
- SBBneg (Suero bovino Bélgica negativo) 200 μl

4.2.2.1.4.4.- Soluciones:

Solución de lavado

- Cloruro de Sodio 0.15 M (8,760 g)
- Tween 20 0.01% (v/v) (0.1 ml)
- Agua destilada aforar a 1 litro

Solución de conjugado

- Tampón conjugado (G- HRPO) 10 ml

- NBCS 2% (v/v) (200 µl)
- Conjugado (Proteína G – HRPO) 8 µl
- Solución de sustrato
 - Tampón de revelación (TR) 25 ml
 - oPD (tableta de 10 mg) 1 tableta
 - Perhydrol 5 µl
- Solución de parada
 - Ácido sulfúrico 2M
- Sueros controles (se utilizan los que están descritos en RB)

4.2.2.1.4.5. – Protocolo

Antes de iniciar la prueba iELISA, fueron realizadas las siguientes operaciones:

- Sensibilización de placas

El Lipopolisacárido (Antígeno), fue utilizado a una concentración de 1µg/ml, para lo cual se mezcló lo siguiente:

- Tampón GS 6 ml
- Agua destilada 300 ml
- Lipopolisacárido (LPS) [10 mg/ml] 30 µl

*Las placas fueron sensibilizadas, con 100 µl por cúpula de la solución de LPS, incubadas a 37⁰ C por 3 horas y 50 minutos y un período de refrigeración (4⁰ C) por 12 horas.

- Preparación del volumen necesario de solución de lavado
- Dilución de sueros a investigar (1/50 v/v)

- Suero a investigar 10 µl

Tampón GS – EDTA – Tween 80

490 µl

- Preparación de la curva de calibración

Se prepararon 6 diluciones de suero positivo (1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, 1/8640), en tampón Tampón GS – EDTA – Tween 80 (BB).

- Preparación de la hoja de protocolo ELISA (ver Anexo B)

- Lavado de micro placas

Luego de cada paso, las placas fueron lavadas de la siguiente manera: el contenido de la micro cúpula fue eliminado y reemplazado con la solución de lavado. El exceso de líquido fue eliminado, golpeando vigorosamente la placa sobre papel absorbente. Esta operación se repitió 5 veces en cada fase de lavado.

Una vez realizadas todas estas actividades, se procedió a efectuar el procedimiento de iELISA.

En las placas previamente sensibilizadas con el LPS y después de ser lavadas, se distribuyó 50 µl de cada dilución de la curva de calibración, sueros controles así como de los sueros a investigar en las cúpulas respectivas. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de una nueva fase de lavado, se adicionó a cada cúpula, 50 µl de la solución de conjugado.

Las placas ELISA fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad, posteriormente fueron lavadas 5 veces.

Se añadió a cada cúpula, 100 µl de solución de sustrato, y la placa fue incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad.

La reacción de color fue detenida adicionando 25 µl de solución de parada, y los resultados de las densidades ópticas (DO) fueron leídos con un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 492 nm.

4.2.2.1.4.6.- Interpretación de resultados

Los valores promedios de la DO de las muestras y de la curva, fueron corregidos sustrayendo el valor promedio de la DO del tampón GS – EDTA Tween 80 (BB), que sirvió como tampón blanco.

En la Tabla 4.2, se presenta la relación entre las diluciones de la curva de calibración y las unidades.

Tabla 4.2: Diluciones de la curva de calibración, unidades y “cut off”

Diluciones de la curva de calibración						
	1/270	1/540	1/1080	1/2160	1/4320	1/8640
Unidades	60	30	15	7.5	3.75	1.87

“Cut off” en bovinos: mayor a 1,87 U

Fuente: Ron (2003)

4.3. - Análisis Estadístico

4.3.1.- Diagramas de caja

En los dos criterios de clasificación realizados: 1) Agrupación por edades (A, B y C) y 2) Agrupación por hijas de madres rectoras o no a la prueba RB (1 y 2), se hizo una representación gráfica basada en cuartiles llamada Diagrama de caja.

Para elaborar tal diagrama, se necesitó cinco valores estadísticos: el valor mínimo; Q_1 (el primer cuartil); la mediana; Q_3 (el tercer cuartil) y el valor máximo. Los cuartiles, dividen un conjunto de observaciones en cuatro partes iguales. El primer cuartil, generalmente simbolizado como Q_1 , es el valor abajo del cual se encuentra el 25% de las observaciones, y el tercer cuartil, comúnmente designado por Q_3 , es el valor por abajo del cual se encuentra el 75% de las observaciones, lógicamente, Q_2 , es la mediana. Se tiene que Q_1 , puede ser considerado como la “mediana” de la mitad inferior de los datos, y Q_3 como la “mediana” de la mitad superior de los datos.

Para localizar la mediana y los cuartiles, se organizó los datos de cada uno de los grupos en orden ascendente. El valor de la mediana fue la observación que se encontraba en el centro. El valor central se localiza en $(n + 1)/2$, donde n es el número total de observaciones. Como se mencionó anteriormente, los cuartiles dividen un conjunto de observaciones en cuatro partes iguales, de ahí que un 25% de las observaciones son menores que el primer cuartil y un 75% de las observaciones son menores que el tercer cuartil, entonces para localizar el primer cuartil se utiliza la siguiente fórmula:

$$L_P = (n + 1) \frac{P}{100}$$

Donde:

L_P = posición del percentil deseado (primer cuartil)

n = número de observaciones

$P = 25$

Y para localizar el tercer cuartil, se reemplaza los datos, así:

L_P = posición del percentil deseado (tercer cuartil)

n = número de observaciones

$P = 75$

4.3.2.- Análisis de supervivencia de los anticuerpos utilizando el límite del producto de Kaplan Meier

Para el estudio de la duración de anticuerpos detectables, así como el tiempo (días posvacunación) hasta que cada animal reportó un resultado positivo a las pruebas serológicas, se utilizó la técnica estadística denominada análisis de supervivencia.

La observación de cada ternera se inició el día en que se vacunó (tiempo = 0) y continuó hasta la muerte del animal o hasta que el tiempo de seguimiento finalizó (t = 378 días). Los animales que murieron antes de finalizar el tiempo de seguimiento, fueron considerados como “censurados”.

En el análisis de supervivencia, se utilizó la técnica no paramétrica Kaplan Meier (Método del límite del producto), con el Programa Minitab (versión 13.1). Este método permite estudiar la duración del tiempo hasta la desaparición de los anticuerpos.

La principal característica del análisis con este método, es que, la proporción acumulada de terneras que siguen en estudio se calcula para el tiempo de duración individual de los anticuerpos de cada ternera y no se agrupan los tiempos de duración en intervalos.

Se realizaron dos criterios de clasificación: 1) De acuerdo a la edad que tenían al momento de la vacunación, así: A = terneras de 6,10 a 6,87 meses; B = terneras de 5,10 a 5,93 meses y C = terneras de 4,17 a 4,8 meses. 2) Agrupación por hijas de madres rectoras o no a la prueba RB, así: 1 = Hijas de madres rectoras a RB y 2) = Hijas de madres no rectoras a RB. Con estos grupos de trabajo se calculó la proporción acumulativa de anticuerpos detectables hasta el tiempo t , con la siguiente fórmula:

$$\text{Probabilidad de supervivencia para cada tiempo} = \frac{n - r}{n}$$

$$n - r + 1$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra

r = Rango no censurado

$$\text{Estimador de la proporción acumulativa que sobrevive} = S_{(t_0)} * S_{(t+1)}$$

Como resultado de graficar una curva de supervivencia de cada población (probabilidad de sobrevivir hasta el tiempo x), de cada grupo se hace una curva individual. Con la finalidad de comparar en esencia el número de eventos (desaparición de los anticuerpos) en cada grupo con el número de fracasos que podría esperarse de las pérdidas en los grupos combinados se realizó la prueba Log - rank

4.3.3.- El índice KAPPA

La comparación de la concordancia entre pruebas se hizo mediante la prueba de KAPPA. Su cálculo fue realizado en el programa SPSS (versión 12.0). Para esto, se dividió el tiempo de muestreo en tres etapas, y en cada etapa se analizó las siguientes comparaciones: RB vs SAT-EDTA, RB vs iELISA y SAT-EDTA vs iELISA (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5: Etapas de tiempo y comparaciones realizadas

	Etapas 1	Etapas 2	Etapas 3
Días posvacunación	0 – 42 días	49 – 140 días	154 – 378 días
Comparaciones	RB vs SAT- DTA	RB vs SAT-EDTA	RB vs SAT-EDTA
	RB vs iELISA	RB vs iELISA	RB vs iELISA
	SAT – EDTA vs iELISA	SAT-EDTA vs iELISA	SAT-EDTA vs iELISA

Elaboración: El Autor

La Etapa 1, se determinó entre el día 0 y el día 42, ya que según Szyfres, 2000 y Ortiz, 2007, en este tiempo aparecen las inmunoglobulinas IgM e IgG, alcanzando su máxima concentración las IgG.

La Etapa 2, se determinó entre el día 49 y el día 140, con la finalidad de verificar lo afirmado por Szyfres, 2000 y Ortiz, 2007, al mencionar que las inmunoglobulinas IgM empiezan a descender y no son fácilmente detectables por las pruebas serológicas.

La Etapa 3, se determinó entre el día 154 y 378, y así observar si hay presencia de anticuerpos hasta ese día.

Este análisis estadístico funciona con tablas de doble entrada, las cuales se muestran a continuación:

Cuadro 4.6: Tabla de doble entrada utilizada para la prueba KAPPA

		Prueba 1	
		+	-
Prueba 2	+		
	-		

Elaboración: El Autor

El índice Kappa se calcula con la siguiente fórmula:

$$Kappa = \frac{No. de acuerdos encontrados - No. de acuerdos por azar}{Total de examinados - No. de acuerdos por azar}$$

La interpretación de los resultados de esta prueba se observan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Interpretación de la prueba KAPPA

Valor de Kappa	Concordancia
Menos de 0	Ninguno
0,00 – 0,20	Mínimo
0,21 – 0,40	Regular
0,41 – 0,60	Bueno
0,61 – 0,80	Excelente
0,81 – 1,00	Casi perfecto

Fuente: Morilla & González (1998).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Resultados de las pruebas de diagnóstico

5.1.1.- Resultados en muestreos previos a la vacunación

Cuadro 5.1: Resultados de las pruebas diagnósticas en animales aún no vacunados.

Arete	15 días antes de la vacunación 13-Oct-2006			1 día antes de la vacunación 26-Oct-06		
	RB	SAT-EDTA (U.I)	iELISA (u/ml)	RB	SAT-EDTA (U.I)	iELISA (u/ml)
604	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
605*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
606*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
607	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
608	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87
609	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
610	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
611	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
612*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
613	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)
614	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
615	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
616	(+)	50	1,87	(-)	(-)	(-)
617	(-)	30	(-)	(-)	(-)	(-)
618	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

619	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
620	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)
621	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
622	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
623*	(-)	(-)	3,75	(-)	(-)	3,75
624*	(+)	(-)	3,75	(+)	(-)	7,5
625	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
626	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
627	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	3,75
628*	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	3,75
629*	(+)	50	(-)	(+)	50	(-)

(*): Terneras hijas de madres reactoras a la prueba RB, (+): Resultado positivo, (-): Resultado negativo, **RB:** Rosa de Bengala, **SAT-EDTA:** “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, **iELISA:** “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto, **U.I.:** Unidades Internacionales de aglutinación, **u/ml:** unidades por mililitro

Fuente: Investigación directa

Elaboración: El Autor

Con la finalidad de determinar si los animales en estudio presentaban aún anticuerpos calostrales, o al momento estaban cursando una infección, se procedió a muestrear a los animales dos veces previas a la vacunación, la primera vez se muestreó 15 días antes y la segunda vez 1 día antes. En el Cuadro 5.1, se presenta los resultados de dichos muestreos.

5.1.1.1.- Terneras hijas de madres reactoras a RB

En el Cuadro 5.1 se puede apreciar que las terneras 605, 606 y 612, que son hijas de madres positivas a RB (ver Cuadro 4.3), presentan un diagnóstico negativo en los 2 muestreos para las tres pruebas, indicando que los animales probablemente no se infectaron al consumir el calostro, ya que no hubo generación de anticuerpos detectables por las pruebas serológicas. Sin embargo no se puede asegurar que estos animales no estén infectados ya que puede haber ocurrido el “Síndrome de latencia de la ternera”, es decir, los animales pueden haberse infectado intrauterinamente y mantener una infección latente, sin respuesta inmunológica (Blood *et al*, 1987). Cuando dichos animales lleguen a la madurez sexual, *Brucella* se puede acumular en el útero por la

presencia de eritritol, provocando abortos o si logra terminar el periodo de gestación, eliminará gran cantidad de la bacteria en los tejidos placentarios (Samartino, 2003).

Las terneras 623 y 628 (hijas de madres rectoras a RB), son positivas para iELISA y negativas para SAT-EDTA y RB. Igualmente, puede tratarse de una infección intrauterina, que permanece latente, por ello iELISA, es positiva, sin embargo RB y SAT - EDTA son negativas, esto se debe a que iELISA tiene mayor sensibilidad que las dos anteriores, como lo cita Ron, *et. al.* (Datos no publicados), quien en un estudio realizado en 23 fincas de la provincia de Pichincha, estimó la sensibilidad de las tres pruebas: iELISA (61% a 86%), SAT-EDTA (59% a 82%), RB (48% a 91%).

La ternera 624, presenta un diagnóstico positivo para RB y iELISA, mientras que es negativa para SAT-EDTA, en los dos muestreos. Como se conoce, SAT-EDTA, es una prueba que detecta anticuerpos de tipo IgM (Castro *et. al.*, 2005), los cuales, según Szyfres (2000) y Buchanan *et al*; citado por Castro *et al* (2005), son los primeros que aparecen en caso de infección o vacunación (5 – 7 días), alcanzando su máxima concentración a las 2 – 3 semanas, luego esta va reduciéndose en el suero, resultando difícil su detección. En cambio, los anticuerpos de tipo IgG, detectados por RB y iELISA (Castro *et. al.*, 2005) aparecen a los 15 días o más tarde, alcanzando su máximo nivel a los 28 – 42 días (Szyfres, 2000; Ortiz *et al.*, 2007). Esto explicaría, porque RB y iELISA son positivos, mientras que SAT-EDTA es negativa.

La ternera 629, es negativa para iELISA, no así para RB y SAT-EDTA, que son positivas. En este caso, también se puede hablar de una infección latente (Blood *et al.*,

1987), puesto que la madre de este animal fue positiva para RB y además presentó 2 abortos en su vida reproductiva.

5.1.1.2.- Terneras hijas de madres no rectoras a RB

La ternera 616 presentó un diagnóstico positivo para las tres pruebas serológicas en el muestreo 1, los anticuerpos detectados se deben probablemente a anticuerpos calostrales, o tal vez a la reactividad cruzada en las pruebas serológicas causada por otras bacterias que comparten el epítotope con *Brucella*, como es el caso de *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Pseudomona maltophilia*, *Escherichia coli*, (Díaz *et al*, 2005 y OIE, 2007) y más no a una infección intrauterina, ya que su madre fue negativa a RB y nunca ha presentado un aborto en su vida reproductiva (Cuadro 4.3). Además esto se confirma en el muestreo 2 (15 días después), donde presenta un diagnóstico negativo para las tres pruebas, indicando que se trataba de anticuerpos calostrales, los cuales ya se agotaron. La ternera 616, en el muestreo 1, tiene 5 meses de edad y según la FAO & OMS (1986) y la OIE (2002), los anticuerpos calostrales pueden estar presentes hasta los 8 meses de edad. Esto puede confirmar que la positividad de este animal, se debe a que los anticuerpos provenían de la madre. El mismo caso ocurre en la ternera 617, la cual es positiva para SAT-EDTA y negativa para RB y iELISA, en el muestreo 1, dando un diagnóstico negativo para las tres pruebas en el muestreo 2.

El resto de terneras fueron negativas para las tres pruebas serológicas en los 2 muestreos, por lo tanto se asume que se agotaron los anticuerpos calostrales, puesto que tenían una edad de 4,17 a 6 ,87 meses (FAO & OMS, 1986; OIE, 2002). No se sospecha

de infección en estos animales ya que sus madres no fueron positivas a RB, y tampoco han abortado.

5.1.2.- Resultados en muestreos posteriores a la vacunación

El Anexo C, presenta los resultados de las tres pruebas diagnósticas para todos los muestreos realizados después de la vacunación. No se indican los resultados de las terneras 606 y 629, puesto que murieron antes de ser evaluada su respuesta humoral. La ternera 606 murió con Neumonía, el 29 de octubre del 2006, mientras que la ternera 629 fue sacrificada el día 8 de noviembre del 2006, con la finalidad de determinar las cepas de *Brucella* circulantes en el hato bovino. Muestras de ganglios linfáticos, útero y sangre fueron llevados al “Centre d’Etude et de Recherche Veterinaires et Agrochimiques” (CERVA) (Bélgica), lamentablemente no se pudo encontrar ninguna especie perteneciente al género *Brucella*.

5.1.2.1.- Tiempo de aparición de Inmunoglobulinas de tipo IgM (7 días posvacunación):

Estudios realizados por Szyfres (2000) y Ortiz *et al*, (2007), afirman que la vacunación con la Cepa 19, estimula la aparición de IgM, al cabo de 7 días y alcanzan su máxima concentración a los 14 a 21 días; con el objeto de comparar si tal hecho se suscitó en el presente estudio, se procedió a muestrear en tales días, los resultados se indican en el Cuadro 5.2.

Cuadro 5.2: Resultados de las pruebas diagnósticas a los 7 días posvacunación.

Arete	7 días posvacunación		
	RB	SAT – EDTA (U.I.)	iELISA (u/ml)
604	(+)	120	3,75
605	(+)	200	1,87
607	(+)	200	7,5
608	(+)	320	15
609	(+)	400	(-)
610	(+)	640	3,75

611	(+)	480	(-)
612	(+)	800	7,5
613	(+)	400	7,5
614	(+)	640	(-)
615	(+)	1920	3,75
616	(+)	400	15
617	(+)	2560	3,75
618	(+)	320	(-)
619	(+)	100	(-)
620	(+)	800	3,75
621	(+)	7680	3,75
622	(+)	320	7,5
623	(-)	(-)	1,87
624	(+)	60	3,75
625	(+)	640	3,75
626	(+)	800	(-)
627	(-)	(-)	1,87
628	(-)	30	1,87

(+): Resultado positivo, (-): Resultado negativo, **RB**: Rosa de Bengala, **SAT – EDTA**: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, **iELISA**: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto, **U.I.**: Unidades Internacionales de aglutinación, **u/ml**: Unidades por mililitro

Elaboración: El Autor

El 62,5% de los animales (15 terneras), fue positivo a los 7 días después de la vacunación, para las tres pruebas serológicas, esto concuerda con un estudio realizado por Aguirre *et al* (2001), en el que evaluaron la respuesta inmune de 52 hembras Holando Argentino, después de haber vacunado con la cepa 19; las pruebas realizadas fueron la BPA (buffered plate antigen), RAP (rapad automated presumptive), Polarización fluorescente (FPA) iELISA, FC (Fijación del complemento), SAT y SAT – 2ME. Estas 52 hembras fueron positivas a los 7 días, con las pruebas BPA, SAT y iELISA. Los resultados de las 15 terneras en estudio, también se relaciona a lo determinado por Szyfres (2000) y Ortiz *et al* (2007).

El 25% (6 terneras), fue positivo para SAT–EDTA, 7 días después de la vacunación, puesto que esta prueba detecta anticuerpos IgM, y éstos son los primeros en aparecer (Buchanan *et al*, 1974; citado por Castro *et al*, 2005). También la prueba RB fue

positiva, aunque ésta detecta anticuerpos IgG, también reconoce anticuerpos IgM, pero en menor cantidad (Rose & Roepke, 1957; citados por Bercovich, 2000). La prueba iELISA, fue negativa, ya que detecta anticuerpos IgG, y éstos, según Szyfres (2000) y Ortiz *et al* (2007), aparecen 15 días después o más tarde.

La ternera 628, fue positiva para SAT-EDTA y iELISA, a los 7 días de la vacunación, después siempre fue negativa para SAT-EDTA, esto parecería concordar con lo indicado por Szyfres (2000); puesto que la concentración de anticuerpos IgM en el suero va reduciéndose, siendo difícil de detectar por las pruebas serológicas, tal vez por esta razón, esta prueba es negativa ya que reconoce IgM. Con la técnica RB, nunca presentó un resultado positivo, probablemente debido a la baja sensibilidad que posee, de 48% - 91% (Ron, 2003), o inclusive es hasta más baja según Van Aert *et al* (1984) y Samartino *et al* (1999), quienes afirman que la sensibilidad de RB es del 21%.

El 8,33% (2 terneras), fueron negativas. Estos animales (623 y 627), aún cuando se las vacunó, nunca presentaron altos niveles de anticuerpos. Esto se debe probablemente a dos razones, la primera es que a pesar de haber tomado en cuenta todos los cuidados en la vacunación (ver numeral 3.4.1), se pudo haber fallado al momento de aplicar la dosis en la vía de administración (Tizard, 1995). La vacuna Cepa 19, según Castro (2005), debe administrarse en forma subcutánea, para inducir la producción de una intensa y prolongada respuesta de anticuerpos. Lo que tal vez ocurrió, fue que se administró la vacuna en forma intramuscular, de tal manera que no existió una correcta producción de anticuerpos. La segunda razón, pudo ser que no se aplicó la dosis adecuada. La dosis vacunal es de 6 ml (6×10^{10} gérmenes vivos), tal cantidad es capaz de estimular la inmunidad humoral; si ésta es menos de lo recomendado, el animal no desarrollará una

respuesta inmune humoral, y si la dosis es mayor, el animal puede adquirir la enfermedad (OPS/OMS, 1999 y Tizard, 1995). En el estudio realizado por Aguirre *et al* (2001), ningún animal fue negativo tras la vacunación, o al menos, no indicaron que se suscitó tal evento.

El hecho de que 2 de los 26 animales nunca hayan presentado anticuerpos aún después de ser vacunados, también puede deberse a la mala calidad de la vacuna empleada, ya que un frasco del mismo lote que se utilizó para vacunar a los animales en estudio, se llevó al “Centre d’Etude et de Recherche Veterinaires et Agrochimiques” (CERVA) en Bélgica, donde la vacuna Cepa 19 comprada directamente en un almacén veterinario en la zona de estudio, presentó una concentración mas baja de lo indicado por el fabricante.

5.1.2.2.- Tiempo de aparición de Inmunoglobulinas de tipo IgG (14-21-28-42 días posvacunación):

Según Szyfres (2000) y Ortiz, *et al* (2007), las inmunoglobulinas de tipo IgG, aparecen a los 15 días o más tarde y alcanzan su máxima concentración a los 28 a 42 días posvacunación, igualmente, para constatar estos datos en el presente estudio, se procedió a muestrear en esos días, los resultados se muestran en el Cuadro 5.3.

El 87,5% de los animales (21 terneras), fue positivo para SAT-EDTA a los 14, 21 y 28 días posvacunación (ver Cuadro 5.3), esta prueba detecta inmunoglobulinas de tipo IgM, las cuales aparecen primero; al cabo de 42 días, su concentración empezó a descender, sin desaparecer durante varios meses, tal como lo citaron Szyfres (2000) y Ortiz *et al*, (2007).

El 12,5% de los animales (terneras 623, 627 y 628), en todos los muestreos manifestaron títulos bajos de IgM (ver Cuadro 5.3), ya que SAT–EDTA, siempre indicó bajas UI (Unidades Internacionales de aglutinaciones), algo similar se suscitó en el estudio reportado por Aguirre *et al* (2001), donde realizaron SAT y SAT-2ME, arrojando resultados positivos pero con bajas UI.

Las inmunoglobulinas de tipo IgG, detectadas por RB y iELISA, empezaron a aparecer a los 14 días (ver Cuadro 5.3), pero los títulos más altos se observaron a los 28 y 42 días posvacunación lo cual guarda relación a lo indicado por Szyfres, (2000); y Ortiz *et al* (2007).

Cuadro 5.3: Resultados de las pruebas diagnósticas a los 14, 21, 28 y 42 días posvacunación.

Arete	14 días			21 días			28 días			42 días		
	RB	SAT - EDTA (U.I.)	iELISA (u/ml)	RB	SAT EDTA (U.I.)	iELISA (u/ml)	RB	SAT - EDTA (U.I.)	iELISA (u/ml)	RB	SAT - EDTA (U.I.)	iELISA (u/ml)
604	(+)	100	(-)	(+)	100	3,75	(+)	60	3,75	(+)	50	1,87
605	(+)	200	(-)	(+)	100	1,87	(+)	80	3,75	(+)	50	1,87
607	(+)	200	(-)	(+)	100	7,5	(+)	100	15	(+)	50	7,5
608	(+)	50	3,75	(+)	160	15	(+)	120	15	(+)	50	7,5
609	(+)	60	(-)	(+)	120	1,87	(+)	60	1,87	(+)	50	3,75
610	(+)	400	(-)	(+)	400	3,75	(+)	100	7,5	(+)	100	7,5
611	(+)	240	(-)	(+)	320	1,87	(+)	120	3,75	(+)	100	3,75
612	(+)	400	(-)	(+)	960	7,5	(+)	400	15	(+)	200	7,5
613	(+)	100	3,75	(+)	240	7,5	(+)	200	15	(+)	100	7,5
614	(+)	240	(-)	(+)	240	3,75	(+)	240	3,75	(+)	100	7,5
615	(+)	400	(-)	(+)	400	7,5	(+)	400	15	(+)	200	15
616	(+)	60	1,87	(+)	200	30	(+)	240	30	(+)	160	30
617	(+)	400	(-)	(+)	800	3,75	(+)	400	7,5	(+)	200	7,5
618	(-)	50	(-)	(+)	100	1,87	(+)	60	1,87	(-)	50	1,87
619	(+)	100	(-)	(+)	240	3,75	(+)	400	15	(+)	240	15
620	(+)	100	(-)	(+)	240	15	(+)	200	15	(+)	100	15
621	(+)	240	(-)	(+)	1920	7,5	(+)	480	15	(+)	400	15
622	(+)	960	1,87	(+)	120	7,5	(+)	60	7,5	(-)	(-)	7,5
623	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	1,87
624	(+)	30	3,75	(+)	50	3,75	(+)	50	3,75	(+)	(-)	3,75
625	(+)	120	(-)	(+)	200	7,5	(+)	120	7,5	(-)	40	3,75
626	(+)	320	(-)	(+)	320	3,75	(+)	80	1,87	(+)	50	1,87
627	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	3,75	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	3,75

628	(-)	(-)	3,75	(-)	(-)	3,75	(-)	(-)	3,75	(-)	(-)	3,75
-----	-----	-----	------	-----	-----	------	-----	-----	------	-----	-----	------

(+): Resultado positivo, (-): Resultado negativo, **RB**: Rosa de Bengala, **SAT – EDTA**: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, **iELISA**: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto, **U.I.**: Unidades Internacionales de aglutinación, **u/ml**: Unidades por ml

Elaboración: El Autor

5.1.2.3.- Nivel de persistencia de IgM en grupos de terneras con diferentes edades de vacunación

Para comparar el nivel de persistencia de los anticuerpos IgM en relación a la edad de vacunación, se estudió la respuesta humoral en los 3 grupos de animales: A (6,10 – 6,87 meses), B (5,10 - 5,93) y C (4,17 – 4,80).

Los resultados de la prueba SAT–EDTA, de los grupos A, B y C, se indican en los Cuadros 5.4, 5.5 y 5.6. Como se puede apreciar, existen valores bastante dispersos, para lo cual fue necesario realizar diagramas de caja, con el fin de observar en una representación gráfica basada en cuartiles, los valores mínimos y máximos de anticuerpos detectables por la prueba SAT–EDTA (IgM) de cada ternera en los diferentes intervalos de tiempo (ver Figuras 5.1, 5.3 y 5.5).

Las Figuras 5.2, 5.4 y 5.6, son curvas que indican el comportamiento de las Inmunoglobulinas tipo IgM, en los tres grupos de animales, los puntos que se utilizaron para graficar dichas curvas, fueron las medianas, más no el promedio, puesto que este no es representativo cuando se tiene una amplia dispersión, como es el caso.

En los grupos A, B y C, las inmunoglobulinas de tipo IgM aparecieron al cabo de 7 días, las mismas que van descendiendo a partir de los 14 días. Posteriormente su concentración en el suero va reduciendo (ver Figura 5.13), pero sin desaparecer, estando presentes durante varios meses como lo afirman Buchanan *et al*, 1974; citado por Castro *et al*, 2005; Ortiz *et al*, (2007) y Szyfres (2000).

Cuadro 5.4: Resultados de la prueba SAT–EDTA, para el Grupo A

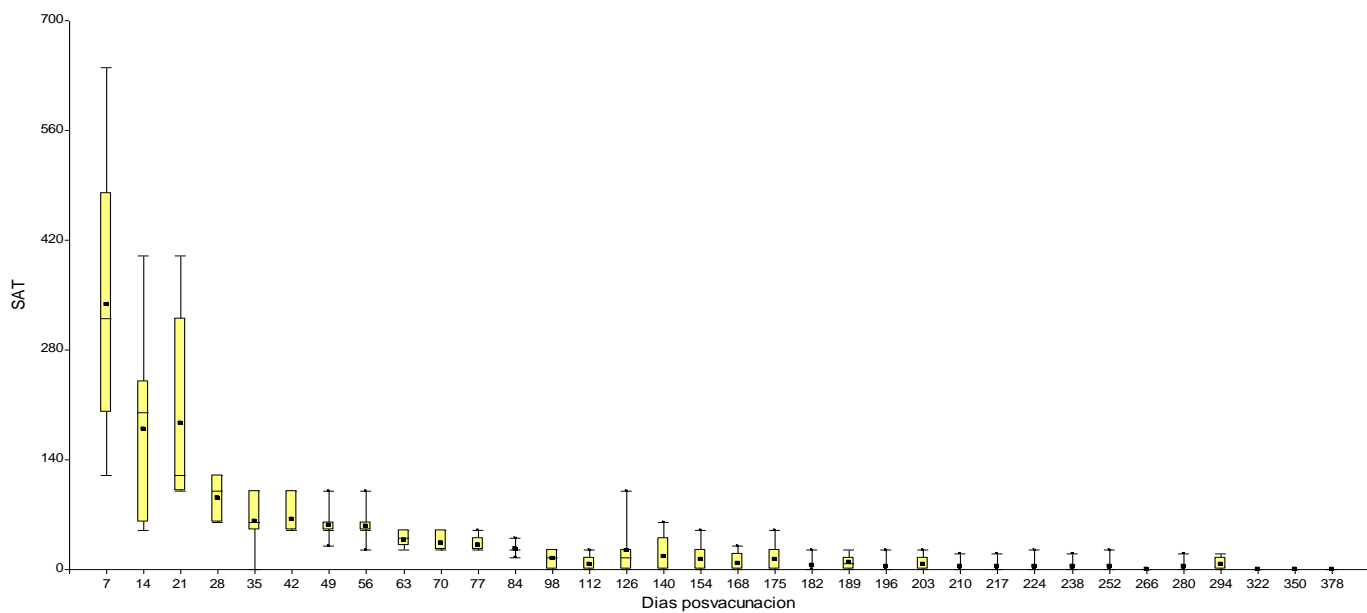
Días Posvacunación	T 604 (U.I.)	T 605 (U.I.)	T 607 (U.I.)	T 608 (U.I.)	T 609 (U.I.)	T 610 (U.I.)	T 611 (U.I.)
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	120	200	200	320	400	640	480
14	100	200	200	50	60	400	240
21	100	100	100	160	120	400	320
28	60	80	100	120	60	100	120
35	50	(-)	60	60	60	100	100
42	50	50	50	50	50	100	100
49	30	50	50	50	50	60	100
56	(-)	50	50	50	50	60	100
63	(-)	50	30	30	40	40	50
70	(-)	(-)	(-)	50	40	50	(-)
77	(-)	30	(-)	50	(-)	40	(-)
84	(-)	(-)	(-)	(-)	40	(-)	(-)
98	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
112	(-)	(-)	(-)	(-)	240	(-)	(-)
126	(-)	(-)	(-)	(-)	100	(-)	(-)
140	(-)	(-)	(-)	(-)	60	40	(-)
154	(-)	(-)	(-)	(-)	50	(-)	(-)
168	(-)	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)
175	(-)	(-)	(-)	(-)	50	(-)	SP
182	(-)	(-)	(-)	SP	x	(-)	(-)
189	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
196	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
203	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
210	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
217	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
224	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
238	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)

252	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
266	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
280	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
294	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
322	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
350	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
378	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)

(-): Resultado negativo, T: Ternera, SP: Suero perdido, x: Sin muestra, U.I.: Unidades internacionales de aglutinación

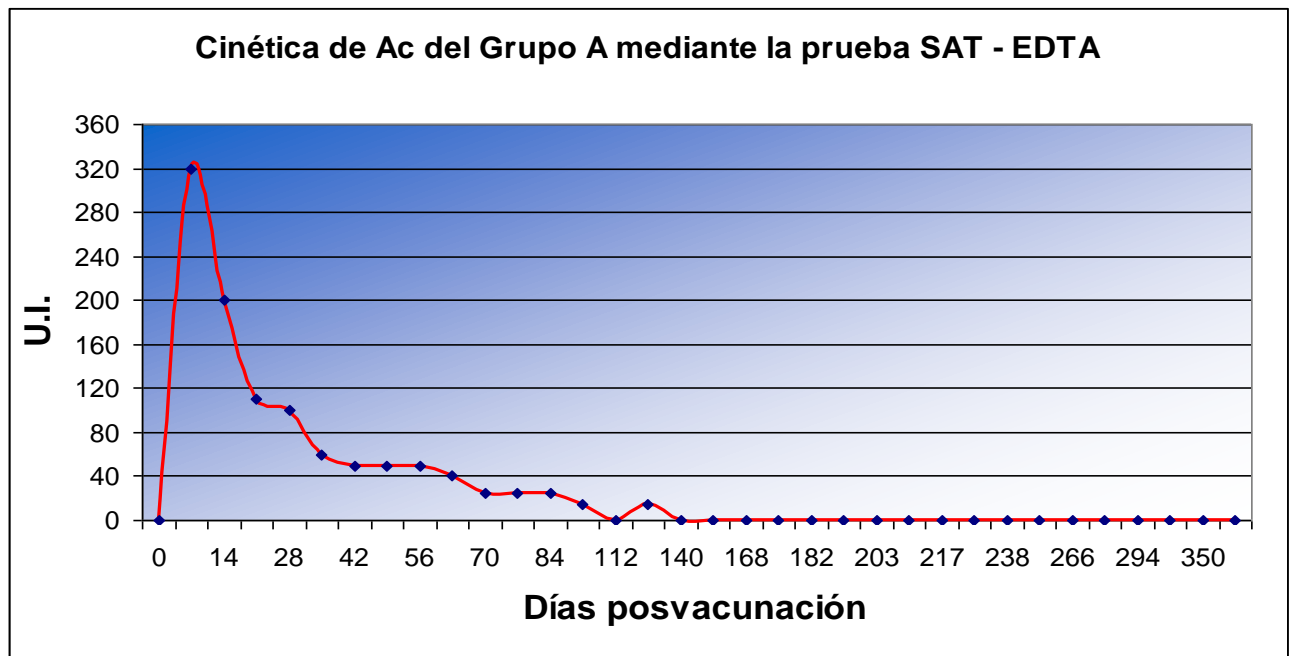
Elaboración: El Autor

Figura 5.1: Diagrama de caja del Grupo A, con la prueba SAT-EDTA



Elaboración: El Autor

Figura 5.2: Cinética de Ac del Grupo A, utilizando la prueba SAT-EDTA



SAT-EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, **U.I:** Unidades internacionales de aglutinaciones, **Ac:** anticuerpos

Elaboración: El Autor

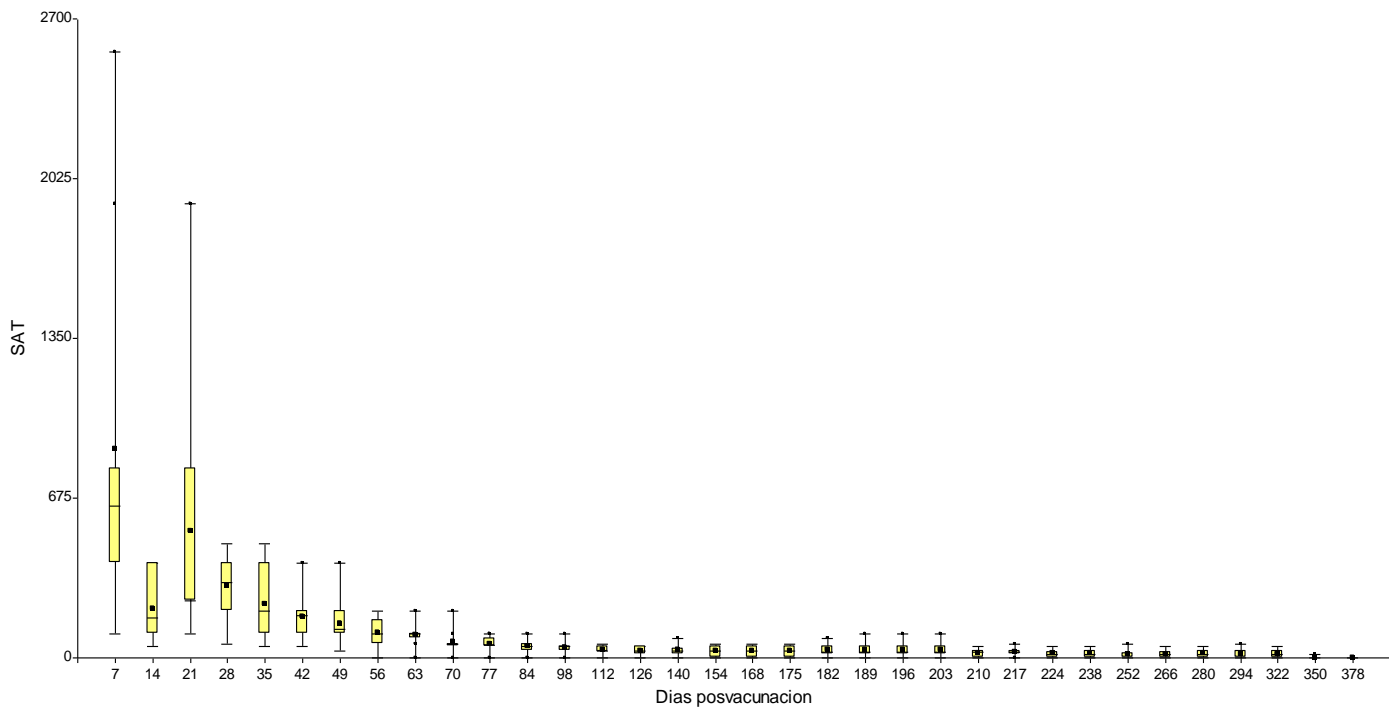
Cuadro 5.5: Resultados de la prueba SAT–EDTA, para el Grupo B

Días posvacunación	T 612 (U.I.)	T 613 (U.I.)	T 614 (U.I.)	T 615 (U.I.)	T 616 (U.I.)	T 617 (U.I.)	T 618 (U.I.)	T 619 (U.I.)	T 620 (U.I.)	T 621 (U.I.)
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	800	400	640	1920	400	2560	320	100	800	7680
14	400	100	240	400	60	400	50	100	100	240
21	960	240	240	400	200	800	100	240	240	1920
28	400	200	240	400	240	400	60	400	200	480
35	400	100	120	240	160	240	50	400	100	480
42	200	100	100	200	160	200	50	240	100	400
49	120	100	100	120	200	120	30	50	400	200
56	100	60	100	100	160	100	(-)	200	50	200
63	60	80	100	100	120	100	(-)	100	100	200
70	60	60	50	50	50	60	(-)	100	60	200
77	60	80	40	50	50	60	(-)	100	50	100
84	60	80	(-)	40	50	60	(-)	50	30	100
98	50	50	50	30	50	50	(-)	50	(-)	100
112	30	30	50	30	(-)	60	(-)	50	(-)	60
126	30	x	(-)	50	(-)	50	(-)	50	(-)	X
140	50	x	(-)	40	(-)	80	(-)	30	(-)	X
154	50	x	x	50	(-)	60	(-)	30	(-)	X
168	50	x	x	(-)	(-)	60	(-)	30	SP	X
175	50	x	x	30	(-)	60	(-)	30	(-)	X
182	50	x	x	30	(-)	80	(-)	(-)	(-)	X
189	50	x	x	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	X
196	50	x	x	(-)	(-)	100	(-)	(-)	(-)	X
203	50	x	x	40	(-)	100	(-)	(-)	(-)	X
210	30	x	x	30	(-)	50	(-)	(-)	(-)	X
217	30	x	x	30	(-)	60	(-)	(-)	(-)	X
224	(-)	x	x	(-)	(-)	50	(-)	(-)	(-)	X
238	30	x	x	(-)	(-)	50	(-)	(-)	(-)	X
252	(-)	x	x	(-)	(-)	60	(-)	(-)	(-)	X
266	(-)	x	x	(-)	(-)	50	(-)	(-)	(-)	X
280	30	x	x	(-)	(-)	50	(-)	(-)	(-)	X
294	30	x	x	(-)	(-)	60	(-)	(-)	(-)	X
322	30	x	x	(-)	(-)	50	(-)	(-)	(-)	X
350	(-)	x	x	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	X
378	(-)	x	x	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	X

(-): Resultado negativo, **T:** Ternera, **SP:** Suero perdido, **x:** Sin muestra, **U.I.:** Unidades internacionales de aglutinación

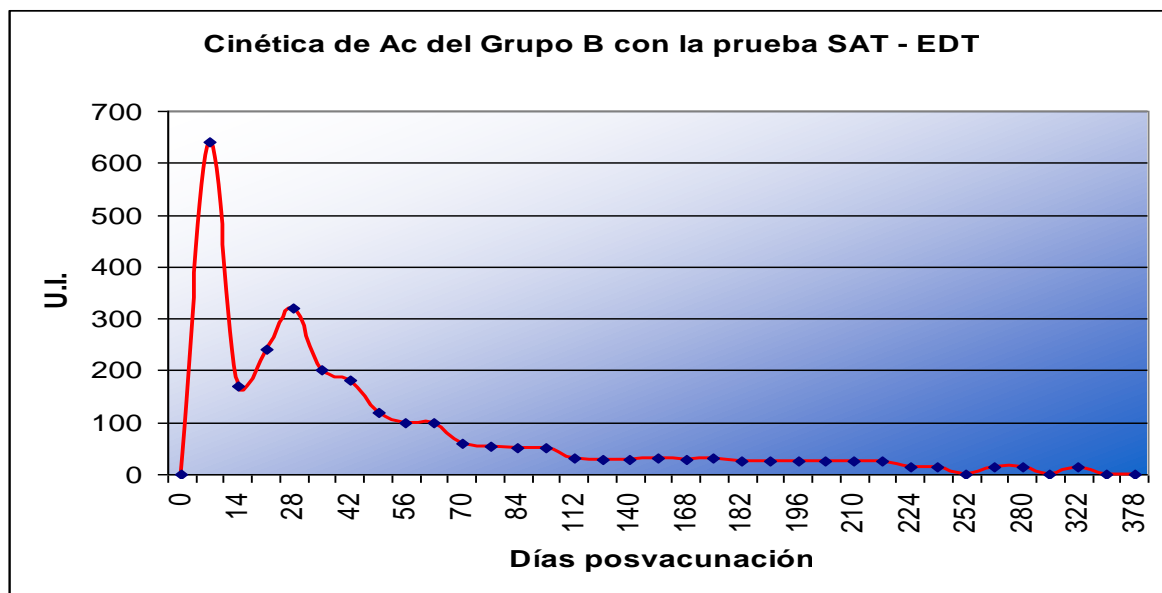
Elaboración: El Autor

Figura 5.3: Diagrama de caja del Grupo B, con la prueba SAT – EDTA



Elaboración: El Autor

Figura 5.4: Cinética de Ac del Grupo A, utilizando la prueba SAT-EDTA



SAT-EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, U.I: Unidades internacionales de aglutinación, Ac: anticuerpos

Elaboración: El Autor

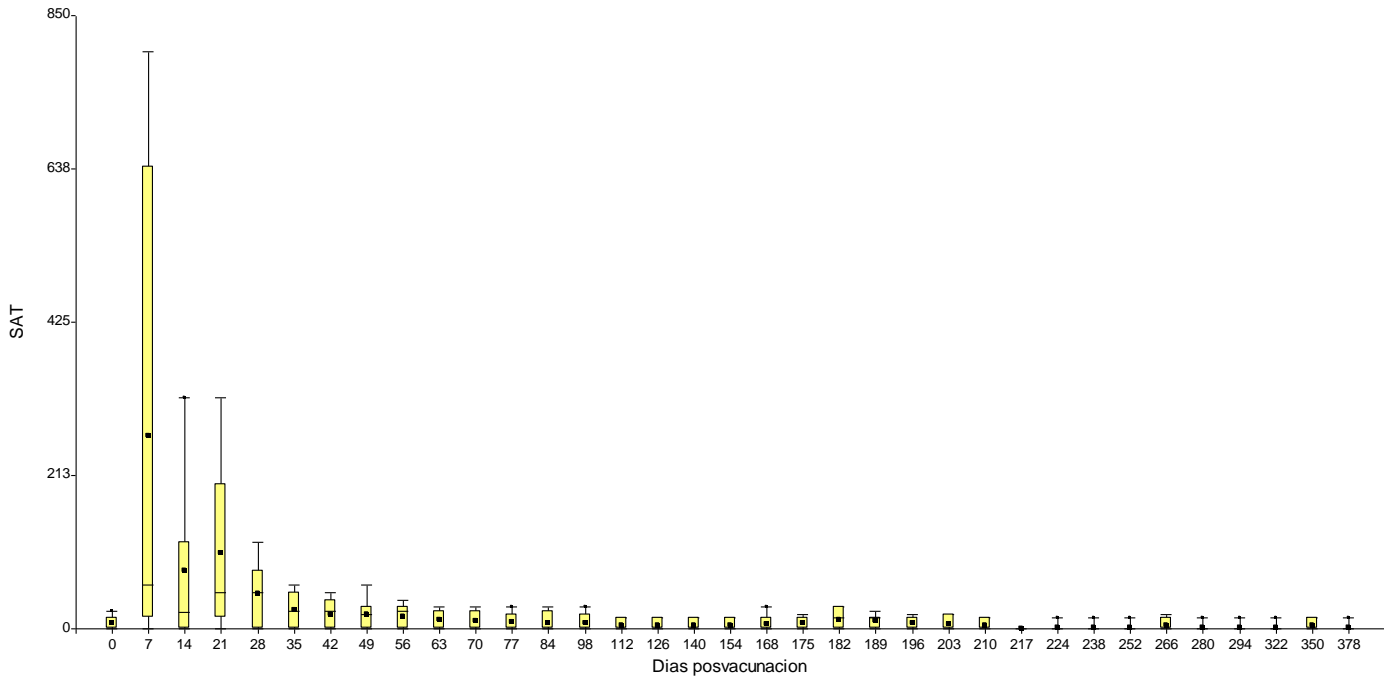
Cuadro 5.6: Resultados de la prueba SAT–EDTA, para el Grupo C

Días posvacunación	T 622 (U.I)	T 623 (U.I)	T 624 (U.I)	T 625 (U.I)	T 626 (U.I)	T 627 (U.I)	T 628 (U.I)
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	320	(-)	60	640	800	(-)	30
14	960	(-)	30	120	320	(-)	(-)
21	120	(-)	50	200	320	(-)	(-)
28	60	(-)	50	120	80	(-)	(-)
35	50	(-)	(-)	60	50	(-)	(-)
42	(-)	(-)	(-)	40	50	(-)	(-)
49	30	(-)	(-)	30	60	(-)	(-)
56	30	(-)	(-)	(-)	40	(-)	(-)
63	(-)	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)
70	(-)	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)
77	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)	(-)
84	(-)	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)
98	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)	(-)
112	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
126	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
140	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
154	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
168	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)	(-)
175	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
182	(-)	(-)	(-)	30	(-)	(-)	30
189	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
196	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
203	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
210	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
217	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
224	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
238	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
252	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
266	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
280	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
294	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
322	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
350	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
378	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-): Resultado negativo, **T:** Ternera, **U.I.:** Unidades internacionales de aglutinación

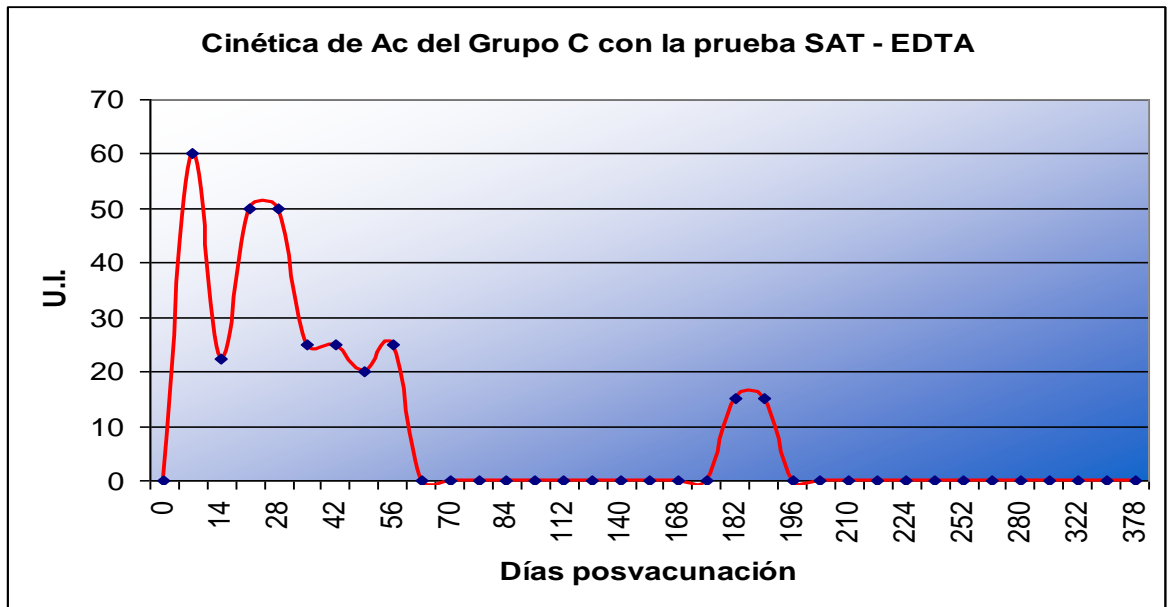
Elaboración: El Autor

Figura 5.5: Diagrama de caja del Grupo C, con la prueba SAT – EDTA



Elaboración: El Autor

Figura 5.6: Cinética de Ac del Grupo C, utilizando la prueba SAT - EDTA



SAT-EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, **U.I:** Unidades internacionales de aglutinación, **Ac:** anticuerpos

Elaboración: El Autor

5.1.2.4.- Nivel de persistencia de IgG en grupos de terneras con diferentes edades de vacunación

Para comparar el nivel de persistencia de los anticuerpos IgG en relación a la edad de vacunación, se estudió la respuesta humoral en los 3 grupos de animales: A (6,10 – 6,87 meses), B (5,10 - 5,93) y C (4,17 – 4,80).

Los resultados de la prueba iELISA, de los grupos A, B y C, se indican en los Cuadros 5.7, 5.8 y 5.9. Como se puede apreciar, existen valores bastante dispersos, al igual que los resultados con la prueba SAT–EDTA, para lo cual fue necesario realizar diagramas de caja, con el fin de observar en una representación gráfica basada en cuartiles, los valores mínimos y máximos de anticuerpos detectables por la prueba iELISA de cada ternera en los diferentes intervalos de tiempo (ver Figuras 5.7, 5.9 y 5.11).

Las Figuras 5.8, 5.10 y 5.12, son curvas que indican el comportamiento de las Inmunoglobulinas tipo IgG, en los tres grupos de animales, los puntos que se utilizaron para graficar dichas curvas, fueron las medianas.

Se puede apreciar en los tres grupos, que las IgG alcanzan su máxima concentración entre los 28 y 42 días después de la vacunación (ver Figura 5.14), permaneciendo en baja cantidad hasta los 98 días, hasta finalmente desaparecer, esto concuerda con el estudio de Aguirre, *et al* (2001), ya que la prueba iELISA que ellos realizaron, arrojó resultados positivos hasta 70 días posvacunación.

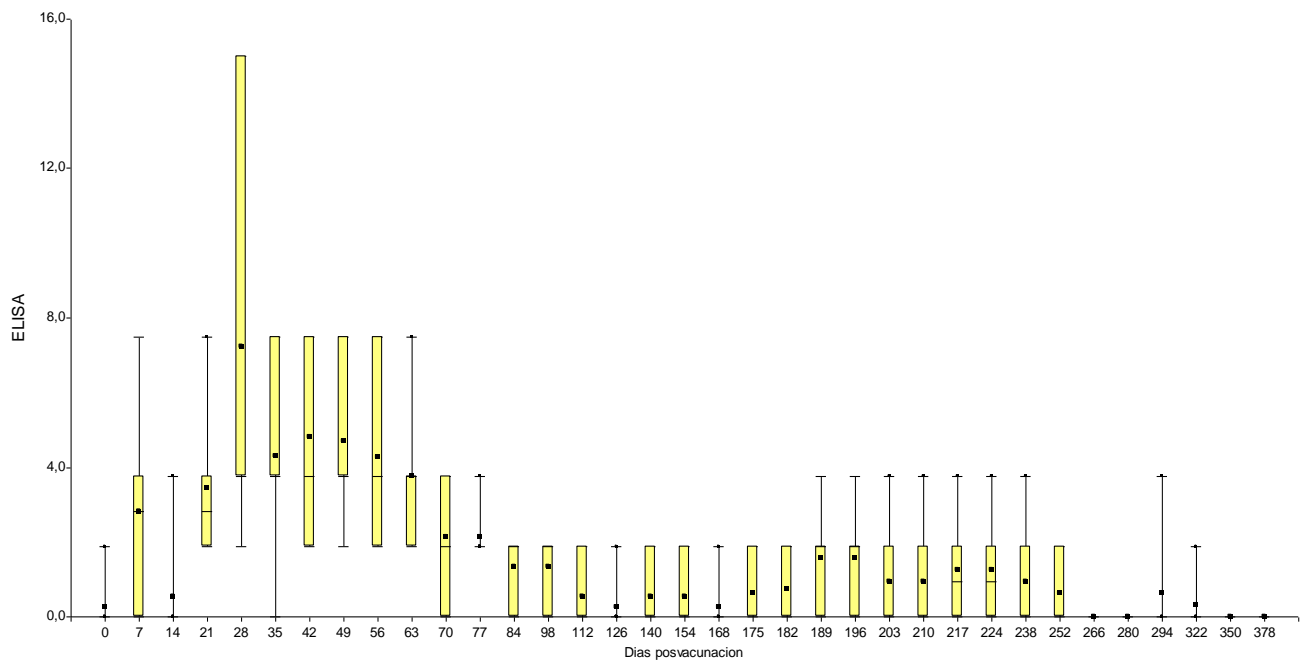
Cuadro 5.7: Resultados de la prueba iELISA, para el Grupo A.

Días posvacunación	T 604 (u/ml)	T 605 (u/ml)	T 607 (u/ml)	T 608 (u/ml)	T 609 (u/ml)	T 610 (u/ml)	T 611 (u/ml)
0	(-)	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)
7	3,75	1,87	7,5	15	(-)	3,75	(-)
14	(-)	(-)	(-)	3,75	(-)	(-)	(-)
21	3,75	1,87	7,5	15	1,87	3,75	1,87
28	3,75	3,75	15	15	1,87	7,5	3,75
35	3,75	(-)	7,5	7,5	3,75	3,75	3,75
42	1,87	1,87	7,5	7,5	3,75	7,5	3,75
49	3,75	1,87	15	7,5	3,75	7,5	3,75
56	3,75	1,87	7,5	3,75	1,87	7,5	3,75
63	3,75	1,87	3,75	3,75	1,87	7,5	3,75
70	1,87	(-)	1,87	3,75	(-)	3,75	3,75
77	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	3,75	1,87
84	1,87	(-)	1,87	1,87	1,87	1,87	(-)
98	1,87	(-)	1,87	1,87	1,87	1,87	(-)
112	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87	(-)
126	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87	(-)
140	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87	1,87	(-)
154	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87	1,87	(-)
168	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)
175	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	1,87	SP
182	(-)	(-)	1,87	SP	x	1,87	(-)
189	1,87	(-)	1,87	(-)	x	1,87	3,75
196	1,87	(-)	1,87	(-)	x	1,87	3,75
203	(-)	(-)	1,87	(-)	x	(-)	3,75
210	(-)	(-)	(-)	(-)	x	1,87	3,75
217	(-)	(-)	1,87	(-)	x	1,87	3,75
224	(-)	(-)	1,87	(-)	x	1,87	3,75
238	(-)	(-)	(-)	(-)	x	1,87	3,75
252	(-)	(-)	1,87	(-)	x	1,87	(-)
266	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
280	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
294	(-)	(-)	(-)	(-)	x	3,75	(-)
322	(-)	(-)	(-)	(-)	x	1,87	(-)
350	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)
378	(-)	(-)	(-)	(-)	x	(-)	(-)

(-): Resultado negativo, **T:** Ternera; **SP:** Suero perdido, **x:** Sin muestra, **u/ml:** Unidades por mililitro

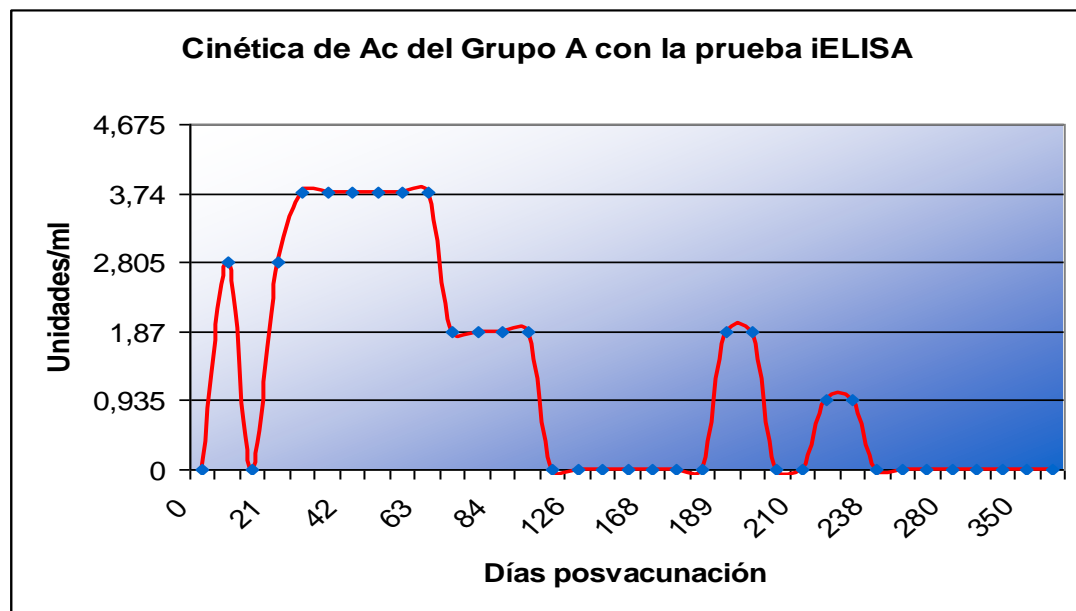
Elaboración: El Autor

Figura 5.7: Diagrama de caja del Grupo A, con la prueba iELISA



Elaboración: El Autor

Figura 5.8: Cinética de Ac del Grupo A, utilizando la prueba iELISA



iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto, **Ac:** Anticuerpos

Elaboración: El Autor

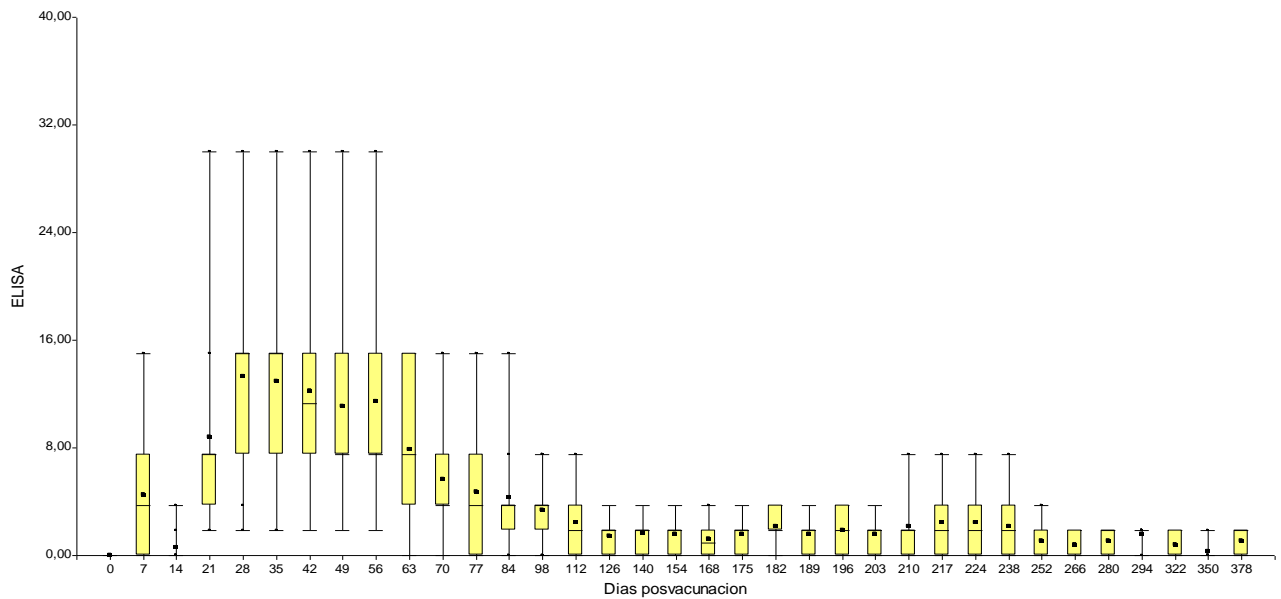
Cuadro 5.8: Resultados del Grupo B, con la prueba iELISA

Días Posvacunación	T 612 (u/ml)	T 613 (u/ml)	T 614 (u/ml)	T 615 (u/ml)	T 616 (u/ml)	T 617 (u/ml)	T 618 (u/ml)	T 619 (u/ml)	T 620 (u/ml)	T 621 (u/ml)
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	7,5	7,5	(-)	3,75	15	3,75	(-)	(-)	3,75	3,75
14	(-)	3,75	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	7,5	7,5	3,75	7,5	30	3,75	1,87	3,75	15	7,5
28	15	15	3,75	15	30	7,5	1,87	15	15	15
35	15	7,5	7,5	15	30	7,5	1,87	15	15	15
42	7,5	7,5	7,5	15	30	7,5	1,87	15	15	15
49	7,5	7,5	7,5	15	30	7,5	1,87	3,75	15	15
56	7,5	7,5	7,5	15	30	7,5	1,87	15	7,5	15
63	7,5	3,75	3,75	7,5	15	3,75	(-)	7,5	15	15
70	3,75	3,75	3,75	3,75	15	3,75	(-)	7,5	(-)	15
77	7,5	3,75	3,75		15	1,87	(-)	7,5	(-)	7,5
84	3,75	3,75	3,75	3,75	15	1,87	(-)	3,75	(-)	7,5
98	1,87	3,75	3,75	1,87	7,5	(-)	(-)	3,75	3,75	7,5
112	(-)	3,75	1,87	1,87	7,5	(-)	(-)	3,75	1,87	3,75
126	(-)	x	1,87	1,87	3,75	(-)	(-)	1,87	1,87	X
140	(-)	x	1,87	1,87	3,75	3,75	(-)	1,87	(-)	X
154	(-)	x	x	1,87	3,75	1,87	(-)	1,87	1,87	X
168	1,87	x	x	(-)	3,75	(-)	(-)	1,87	SP	X
175	1,87	x	x	3,75	1,87	(-)	(-)	1,87	1,87	X
182	1,87	x	x	3,75	1,87	1,87	3,75	1,87	(-)	X
189	1,87	x	x	1,87	1,87	3,75	(-)	1,87	(-)	X
196	1,87	x	x	3,75	1,87	3,75	(-)	1,87	(-)	X
203	1,87	x	x	3,75	(-)	1,87	1,87	1,87	(-)	X
210	1,87	x	x	7,5	1,87	1,87	(-)	1,87	(-)	X
217	3,75	x	x	7,5	1,87	1,87	(-)	1,87	(-)	X
224	1,87	x	x	3,75	1,87	(-)	(-)	1,87	7,5	X
238	(-)	x	x	1,87	1,87	(-)	(-)	3,75	7,5	X
252	(-)	x	x	1,87	1,87	(-)	(-)	(-)	3,75	X
266	(-)	x	x	1,87	1,87	(-)	(-)	1,87	(-)	X
280	1,87	x	x	1,87	1,87	(-)	(-)	1,87	(-)	X
294	1,87	x	x	1,87	1,87	1,87	(-)	1,87	1,87	X
322	1,87	x	x	1,87	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)	X
350	(-)	x	x	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	X
378	1,87	x	x	1,87	1,87	(-)	(-)	1,87	(-)	X

(-): Resultado negativo, T: Ternera, x: Sin muestra, u/ml: Unidades por mililitro

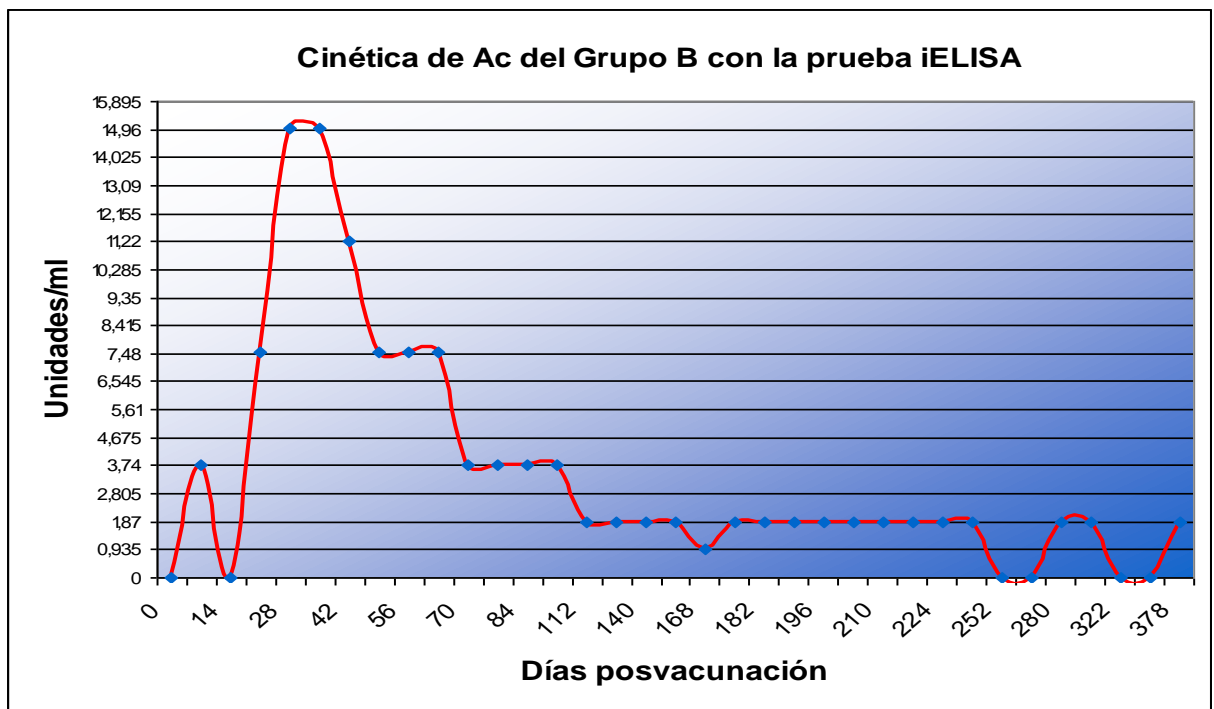
Elaboración: El Autor

Figura 5.9: Diagrama de caja del Grupo B, con la prueba iELISA



Elaboración: El Autor

Figura 5.10: Cinética de Ac del Grupo B, utilizando la prueba iELISA



iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto, **Ac:** Anticuerpos

Elaboración: El Autor

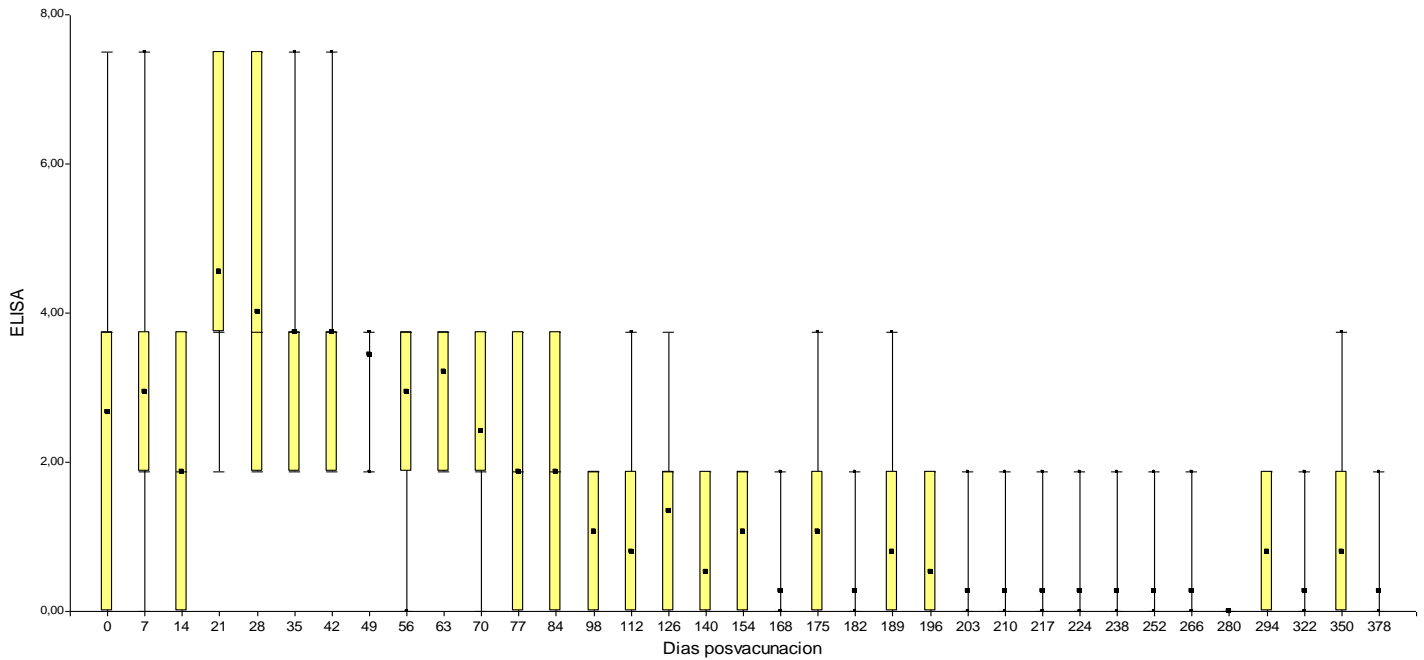
Cuadro 5.9: Resultados de la prueba iELISA, para el Grupo C.

Días posvacunación	T 622 (u/ml)	T 623 (u/ml)	T 624 (u/ml)	T 625 (u/ml)	T 626 (u/ml)	T 627 (u/ml)	T 628 (u/ml)
0	(-)	3,75	7,5	(-)	(-)	3,75	3,75
7	7,5	1,87	3,75	3,75	(-)	1,87	1,87
14	1,87	1,87	3,75	(-)	(-)	1,87	3,75
21	7,5	1,87	3,75	7,5	3,75	3,75	3,75
28	7,5	1,87	3,75	7,5	1,87	1,87	3,75
35	7,5	1,87	3,75	3,75	1,87	3,75	3,75
42	7,5	1,87	3,75	3,75	1,87	3,75	3,75
49	3,75	1,87	3,75	3,75	15	3,75	3,75
56	3,75	(-)	3,75	3,75	1,87	3,75	3,75
63	3,75	1,87	3,75	3,75	1,87	3,75	3,75
70	1,87	(-)	3,75	3,75	1,87	1,87	3,75
77	1,87	(-)	1,87	3,75	(-)	1,87	3,75
84	1,87	(-)	1,87	3,75	(-)	1,87	3,75
98	1,87	(-)	1,87	1,87	(-)	(-)	1,87
112	(-)	(-)	(-)	(-)	3,75	(-)	1,87
126	1,87	(-)	3,75	(-)	1,87	(-)	1,87
140	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	1,87
154	1,87	(-)	1,87	(-)	(-)	1,87	1,87
168	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87
175	(-)	(-)	3,75	1,87	(-)	(-)	1,87
182	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87
189	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87	3,75
196	(-)	(-)	1,87	(-)	1,87	(-)	(-)
203	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)
210	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)
217	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
224	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87
238	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87	(-)
252	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87
266	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,87
280	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
294	(-)	(-)	(-)	1,87	(-)	1,87	1,87
322	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)
350	(-)	(-)	3,75	(-)	1,87	(-)	(-)
378	(-)	(-)	1,87	(-)	(-)	(-)	(-)

(-): Resultado negativo, T: Ternera, u/ml: Unidades por mililitro

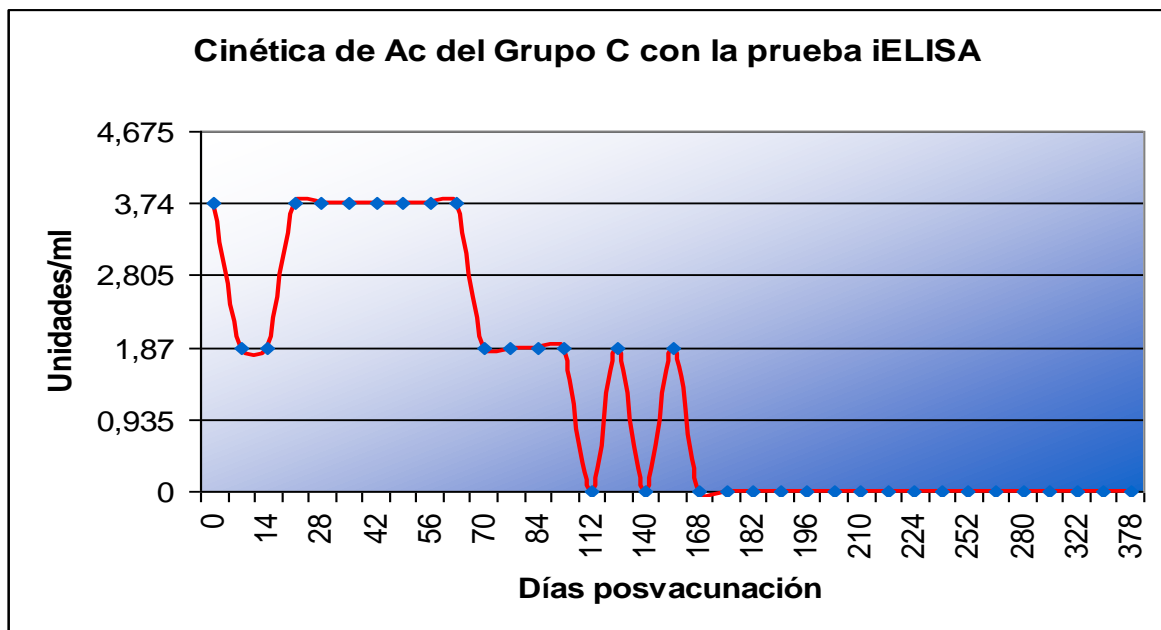
Elaboración: El Autor

Figura 5.11: Diagrama de caja del Grupo C, con la prueba iELISA



Elaboración: El Autor

Figura 5.12: Cinética de Ac del Grupo C, utilizando la prueba iELISA

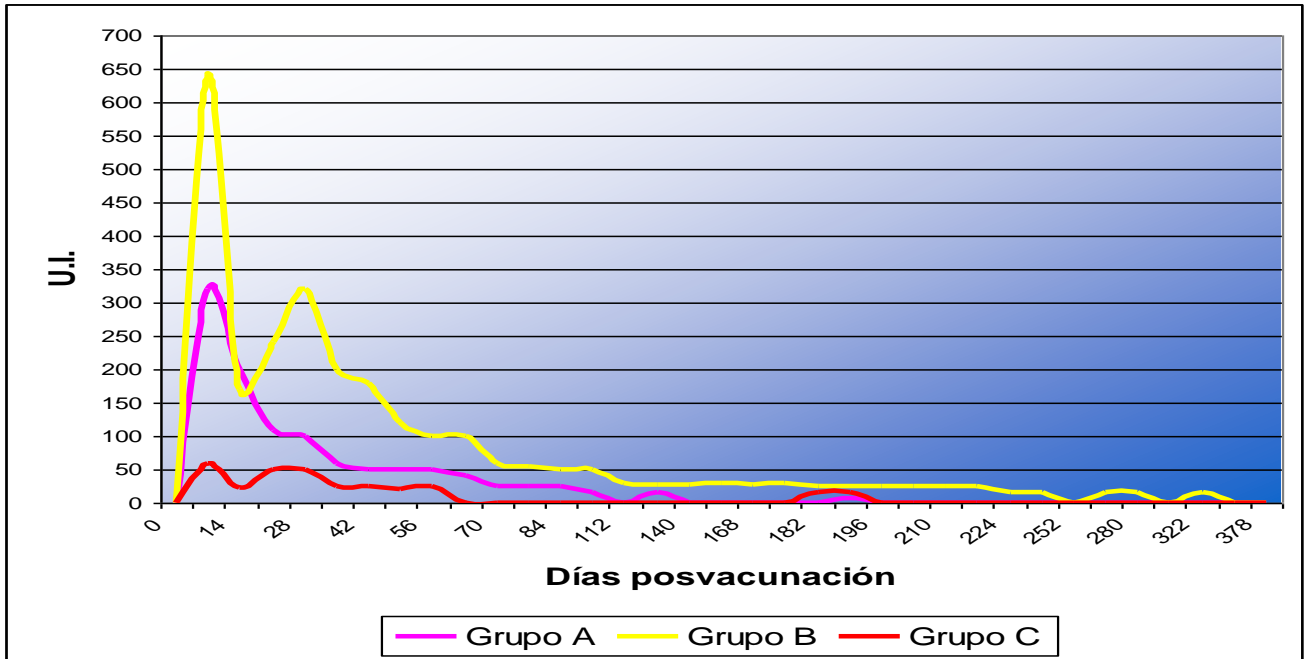


iELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto, **Ac:** Anticuerpos

Elaboración: El Autor

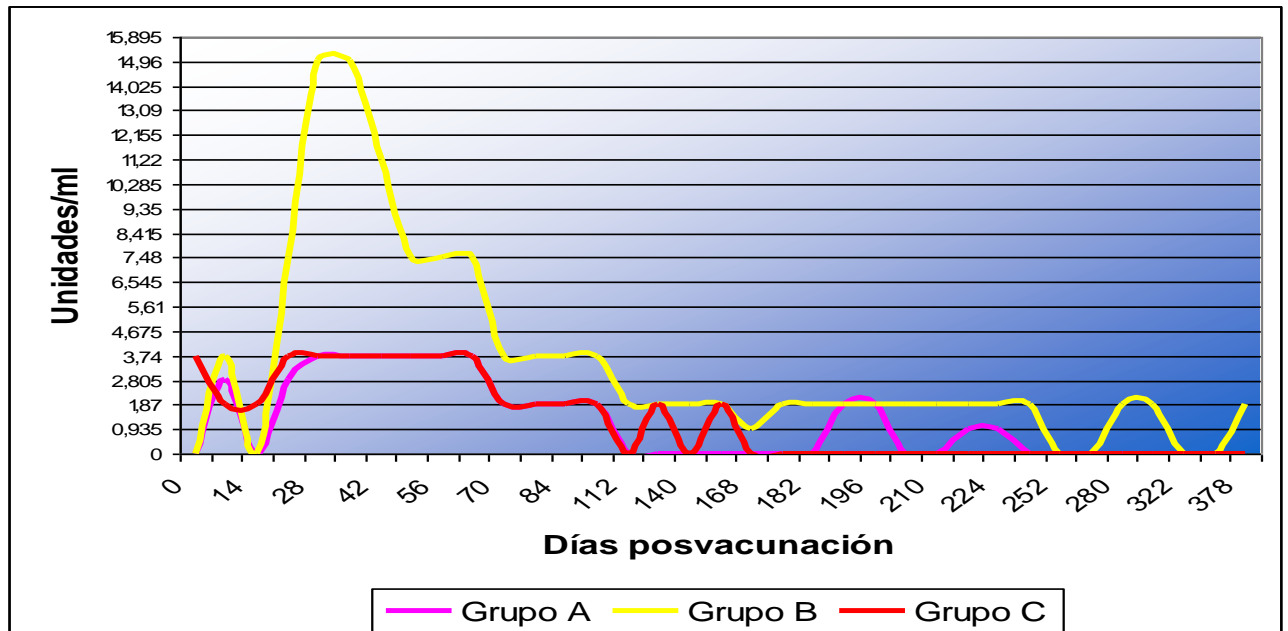
5.1.2.5.- Respuesta humoral de los diferentes grupos

Figura 5.13: Cinética de anticuerpos por grupos con diferentes edades, utilizando la prueba SAT-EDTA



Elaboración: El Autor

Figura 5.14: Cinética de anticuerpos por grupos con diferentes edades, utilizando la prueba iELISA



Elaboración: El Autor

Las IgM e IgG del grupo A, B y C, aparecen a los 7 días, habiendo un descenso a los 14 días (ver Figuras 5.13 y 5.14), esto se debe probablemente a que hubo un “pull” de reserva, el cual se activó ante la presencia del antígeno vacunal, agotándose inmediatamente, por ello el descenso de las Inmunoglobulinas al día 14 (García, 2003).

Los animales del Grupo A, que se encuentran en la edad de 6,10 a 6,87 meses, presentan una respuesta inmune humoral baja, puesto que de acuerdo al manejo que se lleva a cabo en la hacienda “El Prado”, a esta edad, los animales ya han salido de los corrales, para dirigirse a los potreros, su dieta ha cambiado, así como las condiciones ambientales. Es decir se enfrentan a otro escenario al que no están acostumbrados, por lo que el Sistema Inmune está trabajando en forma severa produciendo así, baja cantidad de anticuerpos ante el antígeno vacunal (García, 2008), a esto se debe la baja respuesta inmunitaria, como se aprecia en las Figuras 5.13 y 5.14.

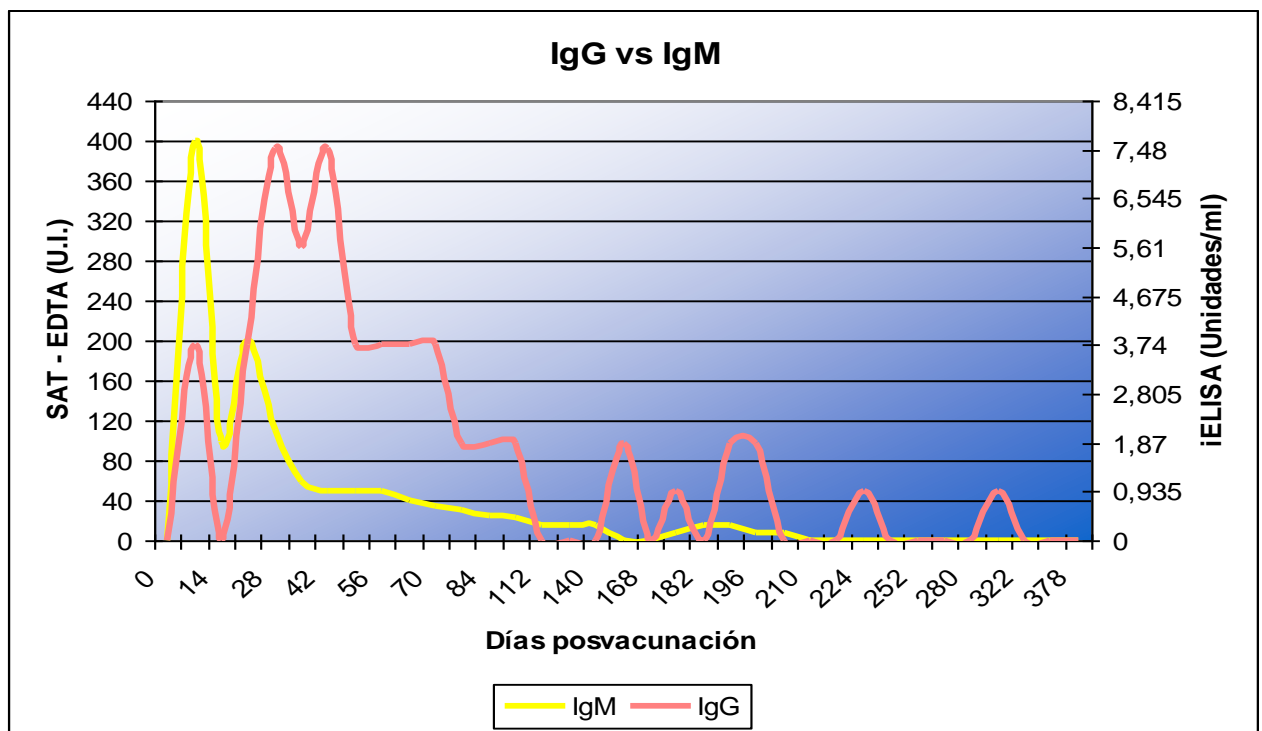
En el Grupo C, se encuentran los animales de 4,17 a 4,87 meses, como se puede ver, tampoco reaccionan adecuadamente ante la vacuna. A esta edad, los animales aún siguen protegidos con los anticuerpos transferidos por la madre mediante el calostro, que junto con los anticuerpos presentes en la leche (IgA), bloquean al antígeno vacunal, sin permitir que reaccione el Sistema Inmune Humoral y se produzcan así anticuerpos de tipo IgG (Tizard 1995).

El grupo que mejor respuesta humoral tiene, es el B (ver Figuras 5.13 y 5.14), en el cual se encuentran los animales con una edad de 5,10 a 5,93 meses. Esto se debe probablemente a que en esta edad los anticuerpos calostrales están presentes pero en una mínima cantidad, por ello no bloquean el antígeno vacunal (Tizard, 1995) y también se

encuentran protegiendo a los animales, quienes empiezan a enfrentar potreros, nuevas dietas y clima diferente, dando oportunidad al Sistema Humoral que produzca anticuerpos ante la presencia de la vacuna.

5.1.2.6.- IgM vs IgG

Figura 5.15: Cinética de las Inmunoglobulinas de tipo IgG e IgM, mediante las pruebas iELISA y SAT–EDTA



SAT – EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, **iELISA:** “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto, U.I.: Unidades Internacionales de aglutinación

Elaboración: El Autor

En estos animales, que han sido previamente vacunados con la Cepa 19, las IgM aparecieron primero, al cabo de 7 días, después su concentración disminuyó, pero no desaparecieron, estando presentes hasta los 77 días aproximadamente (ver Figura 5.15), lo cual se asemeja con el estudio de Aguirre *et al*, 2001, puesto que la prueba SAT que realizaron permitió detectar Ac de tipo IgM hasta el día 49.

A continuación, aparecieron las IgG, a los 14 días, y alcanzaron títulos máximos entre los 35 y 56 días. Según Ortiz *et al* (2007) y Szyfres (2000), estas inmunoglobulinas desaparecen más rápidamente que las IgM, perdurando aproximadamente 6 meses después de la vacunación, siempre y cuando no exista una infección, ya que si la hay, esta inmunoglobulina es la que persiste con altas concentraciones en el suero de animales enfermos (Szyfres, 2000).

Al parecer, los animales utilizados en el estudio, no presentan anticuerpos de infección, puesto que, cuando ocurre una infección natural o experimental (vacunación) con cepas de *Brucella abortus*, aparecen las IgM seguidas de IgG; si se trata de una infección, la concentración de IgM declina, mientras que las IgG tienden a persistir todo el tiempo que el animal está infectado (Samartino, 2000; citado por Ortíz *et al*, 2007), por ello en animales con brucelosis crónica, la IgG es la inmunoglobulina principal, y a veces la única detectable. (Szyfres, 2000). En consecuencia, la diferencia principal entre animales vacunados e infectados es la perdurabilidad de la IgG en estos últimos (Szyfres, 2000). Esto no sucede en la Figura 5.15, ya que las IgG desaparecen al día 196 y a partir de este día, iELISA presentó bajas unidades hasta el día 252, dando finalmente resultados negativos a partir de este día hasta el día 378 (Anexo B).

5.1.3.- Resultados en muestreos posteriores a la revacunación

Los animales fueron revacunados con la Cepa RB51, a la edad de 10 a 12 meses, sin presentar resultados positivos en ningún animal, debido a que es una cepa rugosa carente de la cadena O (Villarroel *et al*, 2000; SAG, 2004; Schurig *et al*, 2002), y como las pruebas inmunológicas utilizadas están dirigidas a la detección de Ac contra *Brucella* en fase lisa, no hubo generación de anticuerpos (ver Anexo B).

5.2.- Análisis de Supervivencia

5.2.1.- Método de Kaplan Meier por grupos de diferente edad al momento de la vacunación:

Con los grupos establecidos, de acuerdo a la edad de los animales: A = terneras de 6,10 a 6,87 meses; B = terneras de 5,10 a 5,93 meses y C = terneras de 4,17 a 4,8 meses, se calculó la proporción acumulativa de anticuerpos que duraron hasta el tiempo t , para cada prueba serológica.

5.2.1.1.- Método de Kaplan Meier con la prueba RB

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Para el Grupo A, una media de 95; para el Grupo B, una media de 129,75 y para el Grupo C, una media de 28,85. El test log – rank, para comparación de curvas de supervivencia encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellas. El cálculo de la proporción acumulativa de anticuerpos detectables se indica en el Cuadro 5.10.

El Grupo C, cuyos animales son los más jóvenes (4,17 a 4,80 meses), presenta el promedio de supervivencia de anticuerpos IgG más bajo (28,85 días); debido a que esta inmunoglobulina es la primera en desaparecer después de la vacunación (Szyfres, 2000), además, también influye la edad de los animales, ya que según Pastoret (1997), en terneras jóvenes los anticuerpos desaparecen más rápidamente, aproximadamente en dos meses empiezan a reportar resultados negativos; siempre y cuando no se trate de infección, porque en este caso la que persiste a lo largo del tiempo es la IgG (Ortiz *et al*, 2007)

Sin embargo, en el presente estudio, existen terneras que son positivas para RB, hasta el día 154 (Ver Anexo B), probablemente se deba a la especificidad de la prueba, la cual es del 65% (Donate *et al*, 1971), razón por la cual, estos animales pueden ser falsos positivos. Se podría hablar de una infección, por lo nombrado anteriormente acerca de la persistencia de IgG, pero este no es el caso porque la prueba iELISA, cuya especificidad es más alta, 99,9% (Dohoo *et al*, 1986, Rojas & Alonso, 1994; citados por Nielsen, 2002), arroja resultados negativos y pocos casos positivos pero con tan solo 1,87 u/ml, pudiéndose tratar de casos falsos positivos, o también porque el PSO de *Brucella abortus* posee epítopes compartidos con otras especies bacterianas como *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, siendo éstas responsables de reactividad cruzada en las pruebas RB y iELISA que se basan en la detección de Ac hacia este Ag (OIE, 2007).

El grupo B, cuyos animales tenían una edad de 5,10 a 5,93 meses al momento de la vacunación, presentaron el promedio de supervivencia de anticuerpos más alto (129,75 días); concordando con en el estudio de Szyfres (2000), quién afirma que terneras vacunadas a los 6 meses, tardan en negativizarse aproximadamente 6 meses.

Cuadro 5.10: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba RB

Arete	Tiempo de duración de Ac en días	No. de orden	Orden de las observaciones no censuradas	$\frac{n-r}{n-r+1}$	
GRUPO A					
604	70	1	1	$(8-1)/(8-1+1) = 0,88$	0,88
605	84	2	2	$(8-2)/(8-2+1) = 0,86$	0,76
606	2*	3	--		
607	49	4	4	$(8-4)/(8-4+1) = 0,8$	0,61
608	56	5	5	$(8-5)/(8-5+1) = 0,75$	0,46
609	175*	6	--		
610	175	7	7	$(8-7)/(8-7+1) = 0,5$	0,23
611	56	8	8	$(8-8)/(8-8+1) = 0$	0,0
GRUPO B					
612	98	1	1	$(11-1)/(11-1+1) = 0,91$	0,91
613	84*	2	--		
614	56*	3	--		
615	182	4	4	$(11-4)/(11-4+1) = 0,88$	0,80
616	77	5	5	$(11-5)/(11-5+1) = 0,86$	0,69
617	280	6	6	$(11-6)/(11-6+1) = 0,83$	0,57
618	28	7	7	$(11-7)/(11-7+1) = 0,8$	0,46
619	84	8	8	$(11-8)/(11-8+1) = 0,75$	0,35
620	63	9	9	$(11-9)/(11-9+1) = 0,67$	0,23
621	112*	10	--		
622	35	11	11	$(11-11)/(11-11+1) = 0$	0,0
GRUPO C					
623	2	1	1	$(7-1)/(7-1+1) = 0,86$	0,86
624	42	2	2	$(7-2)/(7-2+1) = 0,83$	0,71
625	56	3	3	$(7-3)/(7-3+1) = 0,8$	0,57
626	49	4	4	$(7-4)/(7-4+1) = 0,75$	0,43
627	2	5	5	$(7-5)/(7-5+1) = 0,67$	0,29
628	2	6	6	$(7-6)/(7-6+1) = 0,5$	0,14
629	2	7	--		

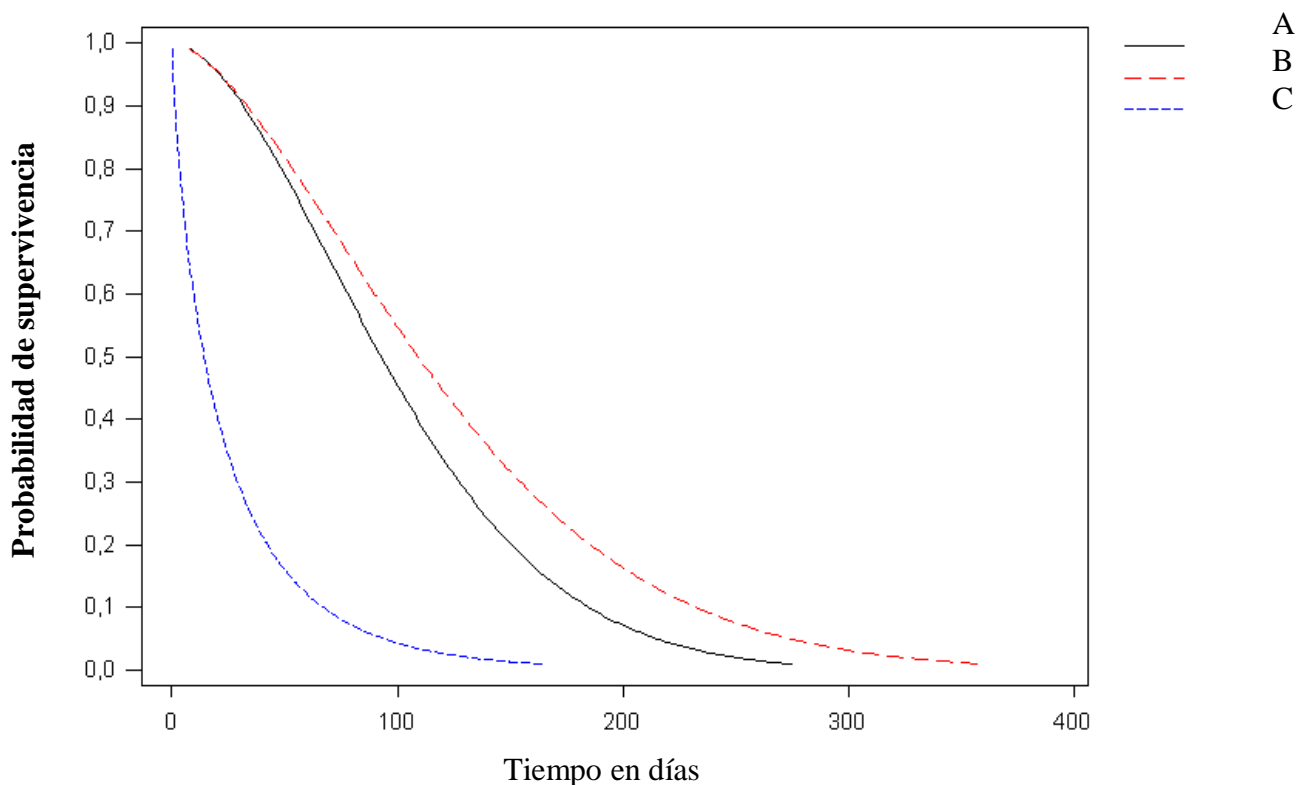
(*): Observación censurada; **Ac**: anticuerpos; **n**: tamaño de la muestra; **r**: rango no censurado

Elaboración: El Autor

La probabilidad de supervivencia puede representarse gráficamente como se muestra la

Figura 5.16.

Figura 5.16: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos A, B y C, con la prueba RB.



A: Terneras de 6,10 a 6,87 meses; **B:** Terneras de 5,10 a 5,93 meses y **C:** Terneras de 4,17 a 4,8 meses

Elaboración: El Autor

5.2.1.2.- Método de Kaplan Meier con la prueba SAT-EDTA

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Para el Grupo A, una media de 87; para el Grupo B, una media de 190,909 y para el Grupo C, una media de 85,57. El test log – rank, para comparación de curvas de supervivencia encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellas. El cálculo de la proporción acumulativa de anticuerpos detectables por la prueba SAT - EDTA se indica en el Cuadro 5.11.

Cuadro 5.11: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba SAT-EDTA

Arete	Tiempo de duración de Ac en días	No. de orden	Orden de las observaciones no censuradas	$\frac{n-r}{n-r+1}$	
GRUPO A					
604	49	1	1	$(8-1)/(8-1+1) = 0,88$	0,88
605	77	2	2	$(8-2)/(8-2+1) = 0,86$	0,76
606	2*	3	--		
607	63	4	4	$(8-4)/(8-4+1) = 0,8$	0,61
608	77	5	5	$(8-5)/(8-5+1) = 0,75$	0,46
609	175*	6	--		
610	140	7	7	$(8-7)/(8-7+1) = 0,5$	0,23
611	63	8	8	$(8-8)/(8-8+1) = 0$	0,0
GRUPO B					
612	322	1	1	$(11-1)/(11-1+1) = 0,91$	0,91
613	112*	2	--		
614	112*	3	--		
615	217	4	4	$(11-4)/(11-4+1) = 0,88$	0,80
616	98	5	5	$(11-5)/(11-5+1) = 0,86$	0,69
617	322	6	6	$(11-6)/(11-6+1) = 0,83$	0,57
618	49	7	7	$(11-7)/(11-7+1) = 0,8$	0,46
619	175	8	8	$(11-8)/(11-8+1) = 0,75$	0,35
620	84	9	9	$(11-9)/(11-9+1) = 0,67$	0,23
621	112*	10	--		
622	56	11	11	$(11-11)/(11-11+1) = 0$	0,0
GRUPO C					
623	2	1	1	$(7-1)/(7-1+1) = 0,86$	0,86
624	28	2	2	$(7-2)/(7-2+1) = 0,83$	0,71
625	182	3	3	$(7-3)/(7-3+1) = 0,8$	0,57
626	84	4	4	$(7-4)/(7-4+1) = 0,75$	0,43
627	2	5	5	$(7-5)/(7-5+1) = 0,67$	0,29
628	182	6	6	$(7-6)/(7-6+1) = 0,5$	0,14
629	2*	7	--		

(*): Observación censurada; **Ac**: anticuerpos; **n**: tamaño de la muestra; **r**: rango no censurado

Elaboración: El Autor

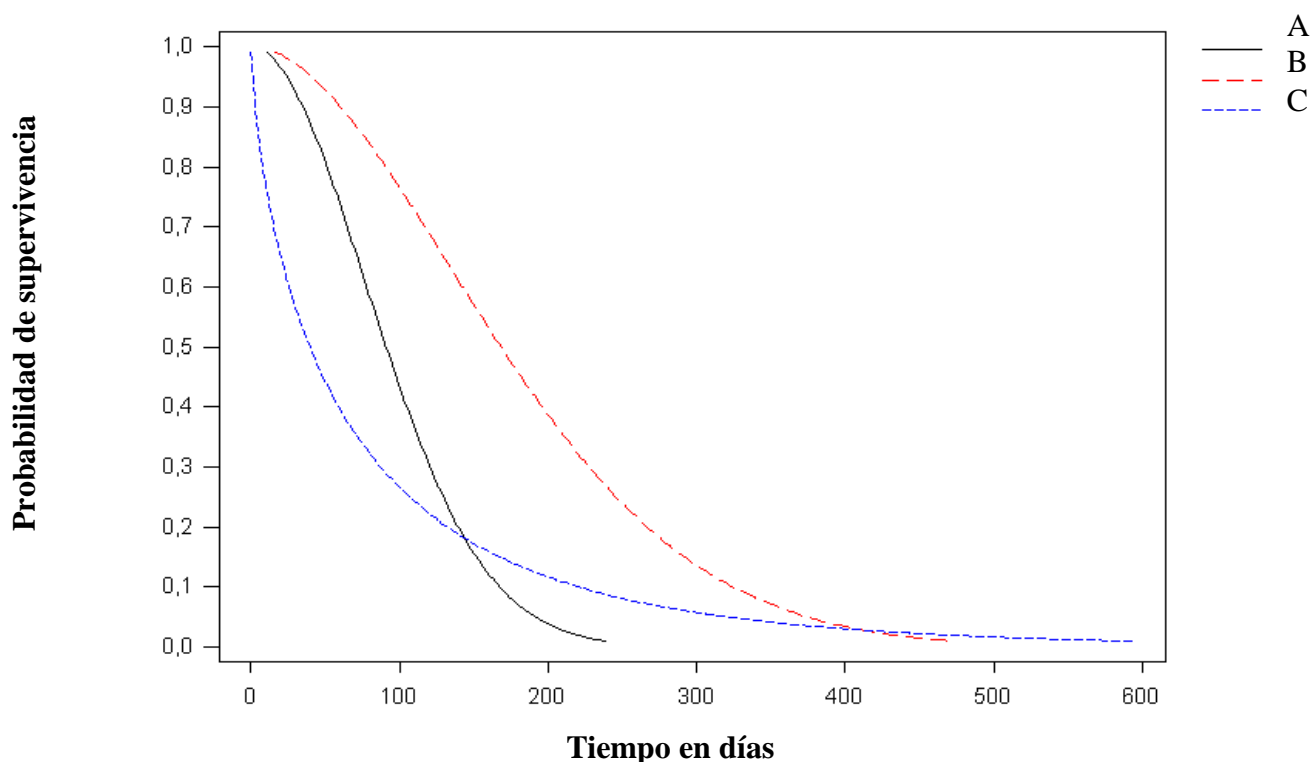
Como se puede ver, el Grupo C, cuyos animales tenían una edad de 4,17 a 4,8 meses, presenta el promedio de supervivencia de anticuerpos IgM más bajo (85,57 días); como se mencionó anteriormente, son animales que al ser vacunados a temprana edad, retienen los anticuerpos menor tiempo (Pastoret *et al*, 1997).

En este estudio, las terneras son positivas hasta el día 126, pero con bajas unidades (30 – 50 U.I.) en SAT-EDTA (ver Anexo B); en este caso puede tratarse de reacciones cruzadas debidas a anticuerpos originados por bacterias que tienen lipopolisacáridos superficiales similares a los de *Brucella* (Díaz *et al*, 2005), por ello la positividad de la prueba hasta ese día. Otra razón, es que se puede tratar de animales falsos positivos debido a la especificidad de SAT-EDTA, que es del 82% (Ron, 2003).

El grupo A, cuyos animales tenían la mayor edad en el estudio (6,10 a 6,87 meses), presentaron el promedio de supervivencia de anticuerpos más alto (190,909 días); como se mencionó anteriormente, los animales vacunados a edad tardía pueden mantener anticuerpos aglutinantes que persisten durante mucho tiempo. Las reacciones en estos casos se deben a la inmunoglobulina M, ya que la IgG 2 generalmente desaparece rápidamente y la IgG 1 es poca activa en la prueba y además su concentración se reduce al poco tiempo después de la vacunación (Pastoret *et al*, 1995)

La probabilidad de supervivencia puede representarse gráficamente como se muestra en la Figura 5.17.

Figura 5.17: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos A, B y C, con la prueba SAT-EDTA



A: Terneras de 6,10 a 6,87 meses; **B:** Terneras de 5,10 a 5,93 meses y **C:** Terneras de 4,17 a 4,8 meses

Elaboración: El Autor

Las Figura 5.16 y 5.17 indican que los tres grupos de animales, persisten manteniendo altos niveles de anticuerpos; conforme transcurre el tiempo, los animales van desapareciendo, pues bajan sus niveles de anticuerpos. Los animales del Grupo C, desaparecen más rápidamente que los animales de los grupos A y B, esto se debe a la edad de vacunación; como se mencionó anteriormente, (Szyfres, 2000), afirma que los animales vacunados a edad temprana, retienen menos tiempo los anticuerpos y como los animales del Grupo C, presentaban una edad de 4 meses aproximadamente, sus anticuerpos desaparecieron más rápidamente.

5.2.1.3.- Método de Kaplan Meier con la prueba iELISA

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: para el Grupo A, una media de 205; para el Grupo B, una media de 307,12 y para el Grupo C, una media de 304,5. El test log – rank, para comparación de curvas de supervivencia encontró diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$). El cálculo de la proporción acumulativa de anticuerpos detectables por la prueba iELISA se indica en el Cuadro 5.12.

El Grupo A, cuyos animales tenían una edad de 6,10 a 6,87 meses, tiene un promedio de supervivencia de anticuerpos IgG de 205 días, el cual es el menor respecto a los otros grupos, a pesar de ser los animales que mayor edad tenían al momento de la vacunación.

Sin embargo, como lo menciona (Pastoret *et al*, 1997), los animales que son vacunados en una edad tardía, retienen los anticuerpos por más de 6 meses, y esto es lo que sucede en el grupo A, con un promedio de supervivencia de anticuerpos de 205 días.

El Grupo C, cuyos animales eran los más jóvenes al momento de la vacunación (4,17 a 4,8 meses), tienen un promedio de supervivencia de anticuerpos IgG de 304,5 días. El hecho de que estas terneras, siendo las más jóvenes, hayan retenido los anticuerpos más tiempo que animales vacunados en edad tardía, puede deberse la presencia de otras bacterias que tengan el mismo PSO que *Brucella*, y hayan generado la presencia de anticuerpos ante este antígeno (Díaz *et al*, 2005)

Cuadro 5.12: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba iELISA

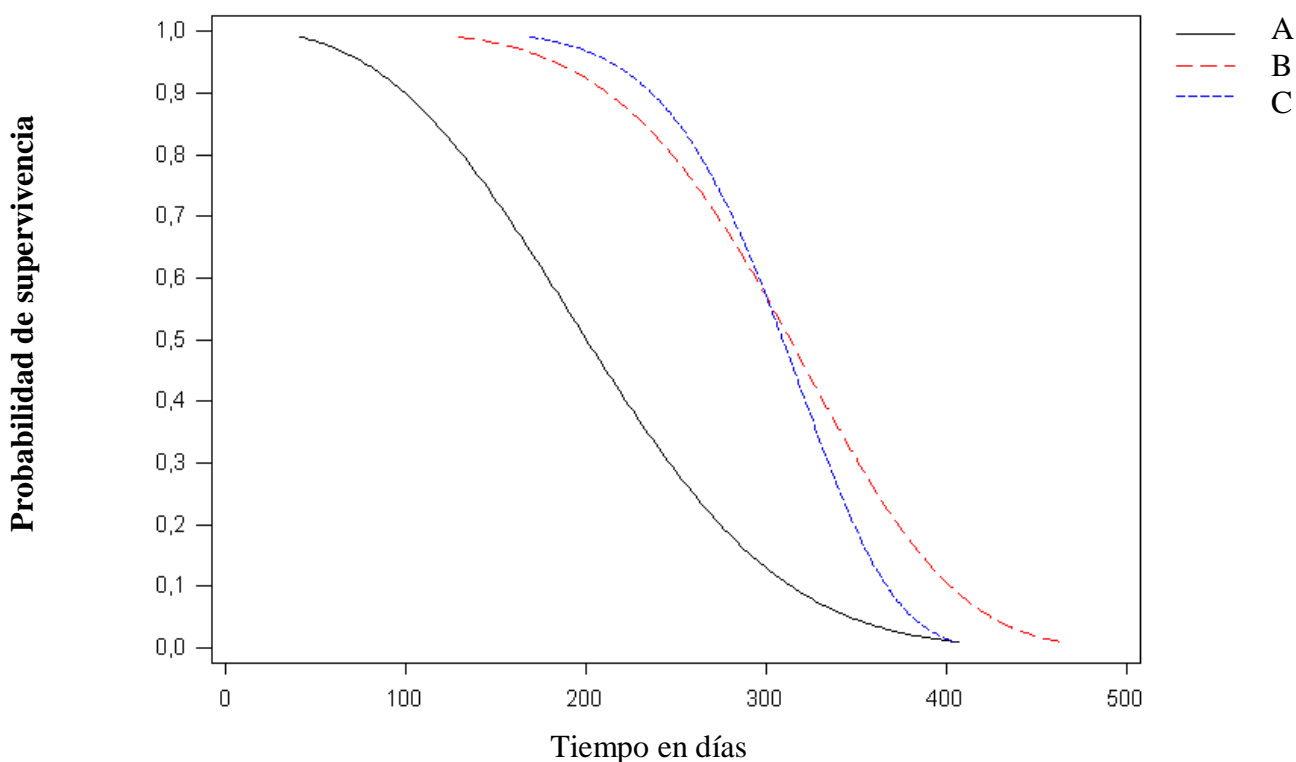
Arete	Tiempo de duración de Ac en días	No. de orden	Orden de las observaciones no censuradas	$\frac{n-r}{n-r+1}$	
GRUPO A					
604	196	1	1	$(8-1)/(8-1+1) = 0,88$	0,88
605	77	2	2	$(8-2)/(8-2+1) = 0,86$	0,76
606	2*	3	--		
607	252	4	4	$(8-4)/(8-4+1) = 0,8$	0,61
608	98	5	5	$(8-5)/(8-5+1) = 0,75$	0,46
609	154*	6	--		
610	322	7	7	$(8-7)/(8-7+1) = 0,5$	0,23
611	238	8	8	$(8-8)/(8-8+1) = 0$	0,0
GRUPO B					
612	378	1	1	$(11-1)/(11-1+1) = 0,91$	0,91
613	112*	2	--		
614	140*	3	--		
615	378	4	4	$(11-4)/(11-4+1) = 0,88$	0,80
616	378	5	5	$(11-5)/(11-5+1) = 0,86$	0,69
617	294	6	6	$(11-6)/(11-6+1) = 0,83$	0,57
618	203	7	7	$(11-7)/(11-7+1) = 0,8$	0,46
619	378	8	8	$(11-8)/(11-8+1) = 0,75$	0,35
620	294	9	9	$(11-9)/(11-9+1) = 0,67$	0,23
621	112*	10	--		
622	154	11	11	$(11-11)/(11-11+1) = 0$	0,0
GRUPO C					
623	217	1	1	$(7-1)/(7-1+1) = 0,86$	0,86
624	378	2	2	$(7-2)/(7-2+1) = 0,83$	0,71
625	294	3	3	$(7-3)/(7-3+1) = 0,8$	0,57
626	350	4	4	$(7-4)/(7-4+1) = 0,75$	0,43
627	294	5	5	$(7-5)/(7-5+1) = 0,67$	0,29
628	294	6	6	$(7-6)/(7-6+1) = 0,5$	0,14
629	2*	7	--		

(*): Observación censurada; **Ac**: anticuerpos; **n**: tamaño de la muestra; **r**: rango no censurado

Elaboración: El Autor

La probabilidad de supervivencia puede representarse gráficamente como se muestra en la Figura 5.18.

Figura 5.18: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos A, B y C, con la prueba iELISA



A: Terneras de 6,10 a 6,87 meses; **B:** Terneras de 5,10 a 5,93 meses y **C:** Terneras de 4,17 a 4,8 meses

Elaboración: El Autor

En la Figura 5.18, se observa que los tres grupos de animales, persisten manteniendo altos niveles de anticuerpos; conforme transcurre el tiempo, los animales van desapareciendo, pues baja el nivel de los mismos. Los animales del Grupo A, desaparecen más rápidamente que los animales de los grupos B y C, por las razones nombradas anteriormente.

5.2.2.- Método de Kaplan Meier en hijas de madres rectoras o no a RB

Con los grupos establecidos, de acuerdo a si las terneras en estudio son hijas o no de madres rectoras a RB: 1) Hijas de madres rectoras a RB y 2) = Hijas de madres no

reactoras a RB, se calculó la proporción acumulativa de anticuerpos que duraron hasta el tiempo t , para cada prueba serológica.

5.2.2.1.- Método de Kaplan Meier con la prueba RB

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Para el Grupo 1, una media de 53,905 y para el Grupo 2, una media de 105,63. El test log – rank, para comparación de curvas de supervivencia no encontró diferencias significativas entre ellas ($p>0,05$). El cálculo de la proporción acumulativa de anticuerpos detectables por la prueba SAT- EDTA se indica en el Cuadro 5.13.

El Grupo 1, cuyos animales son hijas de madres rectoras a RB, presenta el menor promedio de supervivencia de anticuerpos (53,905 días). Sin embargo al observar las probabilidades de supervivencia en forma gráfica de las pruebas SAT–EDTA y iELISA, que se presentan más adelante, se encuentra que no hay diferencia entre las medias, ni en sus curvas, es decir los anticuerpos tienen casi la misma duración. La única prueba que encuentra diferencias es RB, ya que aunque es una prueba muy eficaz, su sensibilidad y especificidad comparada con las pruebas iELISA y SAT-EDTA es baja (Ariza, 2000).

Sin embargo la prueba RB es una prueba de aglutinación rápida muy eficaz, ya que el medio ácido en el que se efectúa la prueba favorece considerablemente la expresión del componente aglutinante de los anticuerpos. Su especificidad y sensibilidad para identificar anticuerpos aglutinantes anti-Brucella, es baja comparada con otras pruebas como iELISA, pero aún así es una prueba de screening bastante útil, de tal forma que

solo resulta negativa en la fase aguda de la infección y con muy poca frecuencia en las fases evolucionadas o crónicas de la enfermedad (Aariza, 2000)

Cuadro 5.13: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba RB

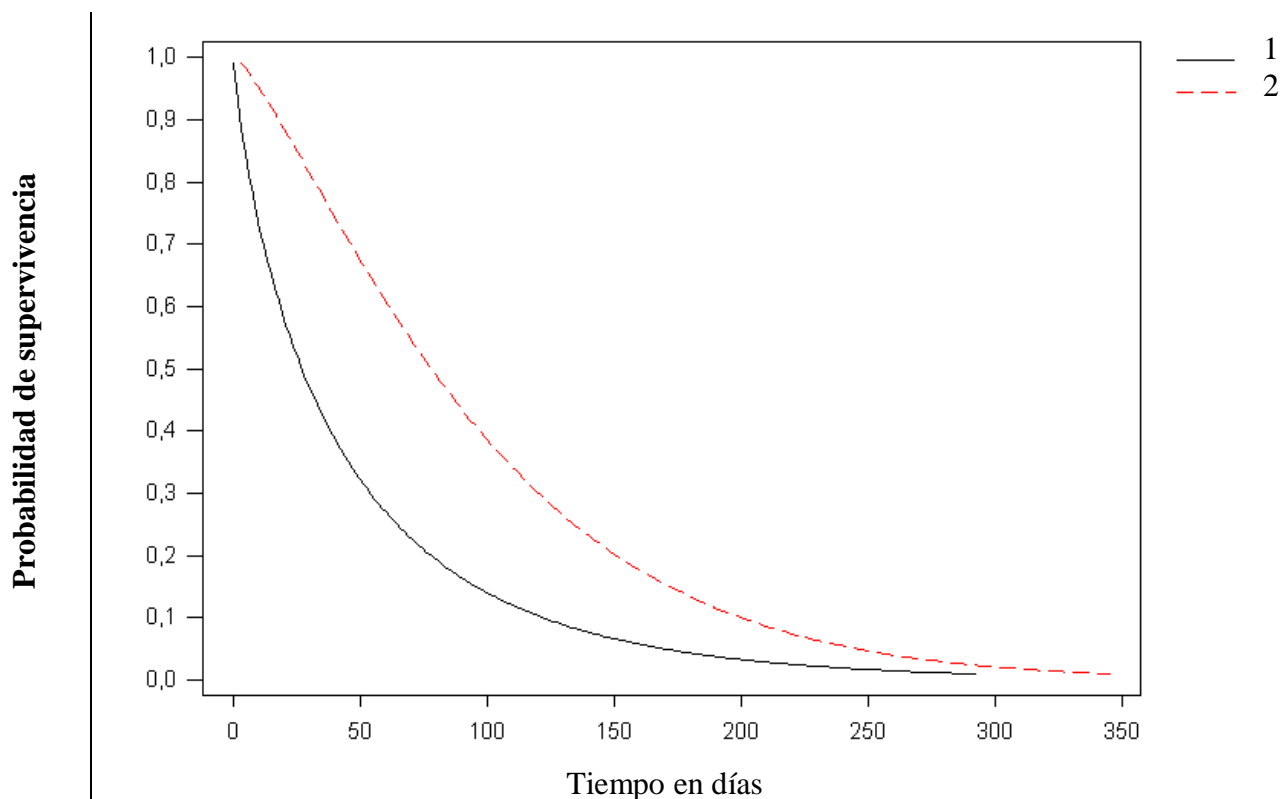
Arete	Tiempo de duración de Ac en días	No. de orden	Orden de las observaciones no censuradas	$\frac{n-r}{n-r+1}$	
GRUPO 1					
605	84	1	1	$(7-1)/(7-1+1) = 0,86$	
606	2	2	--		
612	98	3	3	$(7-3)/(7-3+1) = 0,8$	
623	2	4	4	$(7-4)/(7-4+1) = 0,75$	
624	42	5	5	$(7-5)/(7-5+1) = 0,67$	
628	2	6	6	$(7-6)/(7-6+1) = 0,83$	
629	2	7	--		
GRUPO 2					
604	70	1	1	$(19-1)/(19-1+1) = 0,95$	
607	49	2	2	$(19-2)/(19-2+1) = 0,94$	
608	56	3	3	$(19-3)/(19-3+1) = 0,94$	
609	175	4	--		
610	210	5	5	$(19-5)/(19-5+1) = 0,93$	
611	56	6	6	$(19-6)/(19-6+1) = 0,93$	
613	84	7	--		
614	56	8	--		
615	63	9	9	$(19-9)/(19-9+1) = 0,91$	
616	77	10	10	$(19-10)/(19-10+1) = 0,82$	
617	280	11	11	$(19-11)/(19-11+1) = 0,89$	
618	28	12	12	$(19-12)/(19-12+1) = 0,88$	
619	84	13	13	$(19-13)/(19-13+1) = 0,86$	
620	63	14	14	$(19-14)/(19-14+1) = 0,83$	
621	112	15	--		
622	35	16	16	$(19-16)/(19-16+1) = 0,75$	
625	56	17	17	$(19-17)/(19-17+1) = 0,67$	
626	49	18	18	$(19-18)/(19-18+1) = 0,5$	
627	2	19	19	$(19-19)/(19-19+1) = 0$	

(*): Observación censurada; **Ac**: anticuerpos; **n**: tamaño de la muestra; **r**: rango no censurado

Elaboración: El Autor

La probabilidad de supervivencia puede representarse gráficamente como se muestra en la Figura 5.19.

Figura 5.19: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos 1 y 2, con la prueba SAT - EDTA.



1: Terneras hijas de madres rectoras a RB; **2:** Terneras hijas de madres no rectoras a RB

Elaboración: El Autor

5.2.2.2.- Método de Kaplan Meier con la prueba SAT - EDTA

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Para el Grupo 1, una media de 130,78 y para el Grupo 2, una media de 133,66. El test log – rank, para comparación de curvas de supervivencia no encontró diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). El cálculo de la proporción acumulativa de anticuerpos detectables por la prueba SAT-EDTA se indica en el Cuadro 5.14.

Cuadro 5.14: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba SAT-EDTA

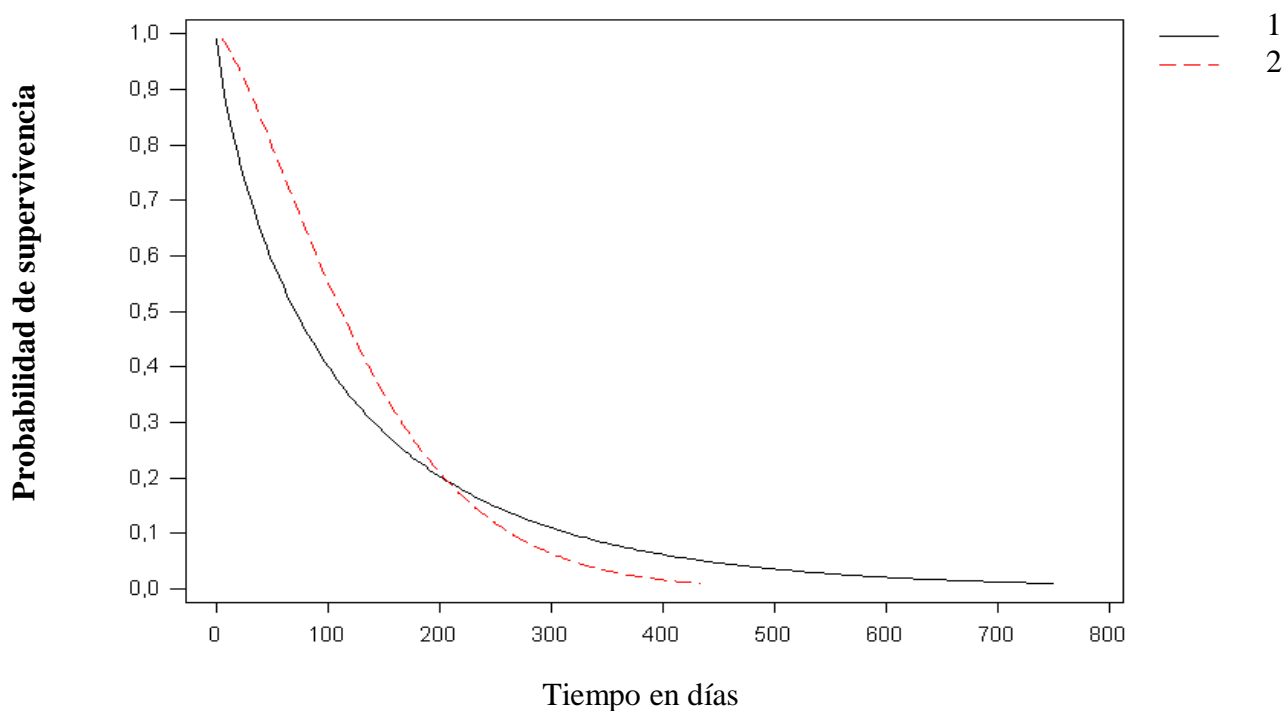
Arete	Tiempo de duración de Ac en días	No. de orden	Orden de las observaciones no censuradas	$\frac{n - r}{n - r + 1}$	
GRUPO 1					
605	77	1	1	$(7-1)/(7-1+1) = 0,86$	
606	2	2	--		
612	322	3	3	$(7-3)/(7-3+1) = 0,8$	
623	2	4	4	$(7-4)/(7-4+1) = 0,75$	
624	28	5	5	$(7-5)/(7-5+1) = 0,67$	
628	182	6	6	$(7-6)/(7-6+1) = 0,83$	
629	2	7	--		
GRUPO 2					
604	49	1	1	$(19-1)/(19-1+1) = 0,95$	
607	63	2	2	$(19-2)/(19-2+1) = 0,94$	
608	77	3	3	$(19-3)/(19-3+1) = 0,94$	
609	175	4	--		
610	140	5	5	$(19-5)/(19-5+1) = 0,93$	
611	63	6	6	$(19-6)/(19-6+1) = 0,93$	
613	112	7	--		
614	112	8	--		
615	217	9	9	$(19-9)/(19-9+1) = 0,91$	
616	98	10	10	$(19-10)/(19-10+1) = 0,82$	
617	322	11	11	$(19-11)/(19-11+1) = 0,89$	
618	49	12	12	$(19-12)/(19-12+1) = 0,88$	
619	175	13	13	$(19-13)/(19-13+1) = 0,86$	
620	84	14	14	$(19-14)/(19-14+1) = 0,83$	
621	112	15	--		
622	56	16	16	$(19-16)/(19-16+1) = 0,75$	
625	182	17	17	$(19-17)/(19-17+1) = 0,67$	
626	84	18	18	$(19-18)/(19-18+1) = 0,5$	
627	2	19	19	$(19-19)/(19-19+1) = 0$	

(*): Observación censurada; Ac: anticuerpos; n: tamaño de la muestra; r: rango no censurado

Elaboración: El Autor

La probabilidad de supervivencia puede representarse gráficamente como se muestra en la Figura 5.20.

Figura 5.20: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos 1 y 2, con la prueba SAT-EDTA.



1: Terneras hijas de madres reactoras a RB; **2:** Terneras hijas de madres no reactoras a RB

Elaboración: El Autor

5.2.2.3.- Método de Kaplan Meier con la prueba iELISA

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Para el Grupo 1, una media de 267,4 y para el Grupo 2, una media de 274,89. El test log – rank, para comparación de curvas de supervivencia no encontró diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). El cálculo de la proporción acumulativa de anticuerpos detectables por la prueba iELISA se indica en el Cuadro 5.15.

Cuadro 5.15: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba iELISA

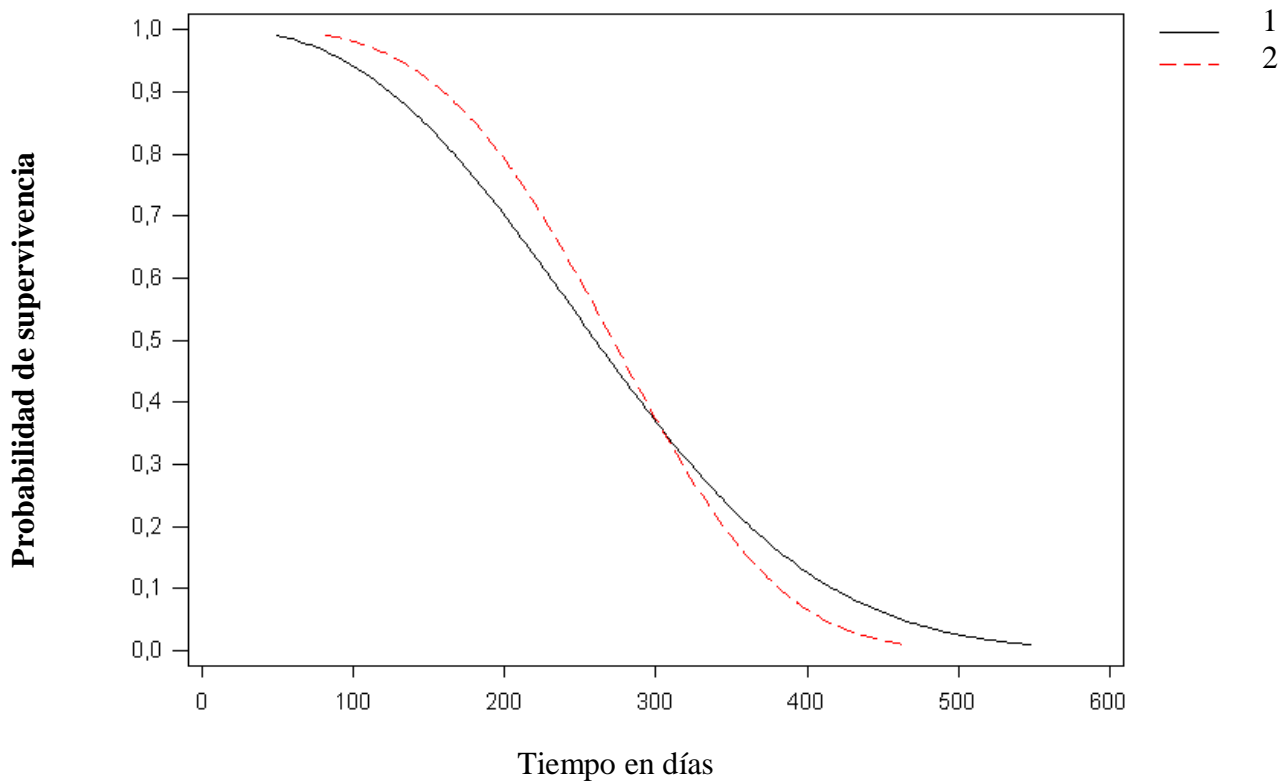
Arete	Tiempo de duración de Ac en días	No. de orden	Orden de las observaciones no censuradas	$\frac{n - r}{n - r + 1}$	
GRUPO 1					
605	70	1	1	$(7-1)/(7-1+1) = 0,86$	
606	2*	2	--		
612	378	3	3	$(7-3)/(7-3+1) = 0,8$	
623	217	4	4	$(7-4)/(7-4+1) = 0,75$	
624	378	5	5	$(7-5)/(7-5+1) = 0,67$	
628	294	6	6	$(7-6)/(7-6+1) = 0,83$	
629	2*	7	--		
GRUPO 2					
604	196	1	1	$(19-1)/(19-1+1) = 0,95$	
607	252	2	2	$(19-2)/(19-2+1) = 0,94$	
608	84	3	3	$(19-3)/(19-3+1) = 0,94$	
609	154*	4	--		
610	322	5	5	$(19-5)/(19-5+1) = 0,93$	
611	238	6	6	$(19-6)/(19-6+1) = 0,93$	
613	112*	7	--		
614	140*	8	--		
615	378	9	9	$(19-9)/(19-9+1) = 0,91$	
616	378	10	10	$(19-10)/(19-10+1) = 0,82$	
617	294	11	11	$(19-11)/(19-11+1) = 0,89$	
618	203	12	12	$(19-12)/(19-12+1) = 0,88$	
619	378	13	13	$(19-13)/(19-13+1) = 0,86$	
620	294	14	14	$(19-14)/(19-14+1) = 0,83$	
621	112*	15	--		
622	77	16	16	$(19-16)/(19-16+1) = 0,75$	
625	294	17	17	$(19-17)/(19-17+1) = 0,67$	
626	350	18	18	$(19-18)/(19-18+1) = 0,5$	
627	294	19	19	$(19-19)/(19-19+1) = 0$	

(*): Observación censurada; **Ac**: anticuerpos; **n**: tamaño de la muestra; **r**: rango no censurado

Elaboración: El Autor

La probabilidad de supervivencia puede representarse gráficamente como se muestra en la Figura 5.21.

Figura 5.21: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos 1 y 2, con la prueba iELISA.



1: Terneras hijas de madres rectoras a RB; **2:** Terneras hijas de madres no rectoras a RB

Elaboración: El Autor

Como se mencionó anteriormente, los Grupos 1 y 2, para las pruebas SAT-EDTA y iELISA, no muestran diferencias significativas en las curvas, es decir, no influye que sean hijas o no de madres rectoras a RB, esto se constata en las Figuras 5.20 y 5.21, las cuales indican que los dos grupos de animales, persisten manteniendo altos niveles de anticuerpos; conforme transcurre el tiempo, los animales van desapareciendo, pues bajan sus niveles de anticuerpos.

5.3.- Correlación entre los resultados de las pruebas serológicas (Índice KAPPA)

5.3.1.- Correlación de los resultados en la Etapa 1

5.3.1.1.- Correlación de los resultados entre RB y SAT-EDTA

La correlación entre RB y SAT-EDTA fue “casi perfecta” (valor Kappa = 0,880; $p < 0,05$), para la Etapa 1 (0 – 42 días posvacunación), debido a que la prueba SAT-EDTA detecta IgM y aunque RB detecta IgG, también detecta IgM, pero en menor cantidad, por ello que 118 sueros fueron positivos y 42 sueros arrojaron resultados negativos para las dos pruebas (ver Cuadro 5.16). Esto se verifica en el estudio realizado por Calva *et al*, 2007; en el que recolectaron 162 muestras sanguíneas de humanos provenientes de 9 camales de la Sierra Norte del Ecuador (Pichincha, Imbabura y Carchi), entre Septiembre 2006 y Febrero 2007; los sueros fueron analizados con las pruebas RB, SAT-EDTA y iELISA. En este estudio la correlación entre RB y SAT-EDTA fue “buena” (valor Kappa = 0,61).

Sin embargo, existen 5 sueros que siendo positivos para SAT-EDTA, resultan negativos para RB (ver Cuadro 5.16), debido a que SAT – EDTA, detecta IgM, y estas inmunoglobulinas son las primeras en aparecer en esta etapa, mientras que RB, detecta IgG, y éstas alcanzan su máxima concentración después de los 42 días aproximadamente.

En el Cuadro 5.16, también se puede observar que existen 3 sueros que siendo positivos para RB, arrojan resultados negativos para SAT-EDTA, esto pudo ser debido al fenómeno de Prozona ocurrido en la prueba SAT-EDTA, que es un exceso de anticuerpos bloqueantes, que impiden la unión de los Ac aglutinantes con el antígeno, dando resultados negativos (Ron, 2003)

Cuadro 5.16: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y SAT – EDTA para la Etapa 1

		RB		TOTAL
		(+)	(-)	
SAT-EDTA	(+)	118	5	123
	(-)	3	42	45
TOTAL		121	47	168

RB: Rosa de Bengala, SAT – EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA

Elaboración: El Autor

5.3.1.2.- Correlación de los resultados entre RB y iELISA

La correlación entre RB y iELISA fue “regular” (valor Kappa = 0,282; p = 0,081), para la Etapa 1 (0 – 42 días posvacunación). Estas dos pruebas detectan Inmunoglobulinas tipo IgG, por ello 100 sueros son positivos para ambas pruebas mientras 21 sueros son negativos (ver Cuadro 5.17). Sin embargo la correlación es baja, puesto que 26 sueros siendo positivos para iELISA, arrojaron resultados negativos para RB, esto se debe a la sensibilidad de la prueba, ya que según Van Aert *et al*, 1984; Samartino *et al*, 1999 y Rojas & Alonso 1994; citados por Nielsen, 2002, iELISA tiene una sensibilidad más alta que RB (iELISA = 98,6% y RB = 21%).

Otra de las razones por las que la correlación es baja, es que en la Etapa 1, las Inmunoglobulinas que mayor concentración alcanzan son las IgM, y éstas son detectadas en cantidades bajas por la prueba RB, mientras que iELISA detecta Inmunoglobulinas tipo IgG, por ello, 21 sueros son negativos para iELISA, y positivos para RB (ver Cuadro 5.17).

En el estudio realizado por Calva *et al*, 2007, la correlación entre estas dos pruebas fue “buena” (valor Kappa = 0,612), esto probablemente se debe a que las personas en

estudio presentaban una infección crónica donde la única Inmunoglobulina detectable es la IgG (Ortíz *et al*, 2007 y Szyfres, 2000), y tanto RB como iELISA detectan tal Ac.

Cuadro 5.17: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y iELISA para la Etapa 1

		RB		
		(+)	(-)	TOTAL
iELISA	(+)	100	26	126
	(-)	21	21	42
TOTAL		121	47	168

RB: Rosa de Bengala, iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto

Elaboración: El Autor

5.3.1.3.- Correlación de los resultados entre SAT – EDTA y iELISA

La correlación entre SAT-EDTA y iELISA fue “regular” (valor Kappa = 0,271; p = 0,082), para la Etapa 1 (0 – 42 días posvacunación), debido a que la prueba SAT–EDTA detecta Inmunoglobulinas tipo IgM (aparecieron a los 7 días, alcanzando su máxima concentración a los 15 a 21 días), mientras que Ielisa reconoce, IgG (aparecieron a los 15 a 21 días, alcanzando su máxima concentración después de los 42 días), por ello se da el caso de que 22 sueros fueron positivos para SAT–EDTA, pero negativos para iELISA (ver Cuadro 5.18).

Cuadro 5.18: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas SAT-EDTA y iELISA, para la Etapa 1

		SAT–EDTA		
		(+)	(-)	TOTAL
iELISA	(+)	101	25	126
	(-)	22	20	42
TOTAL		123	45	168

SAT – EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto

Elaboración: El Autor

5.3.2.- Correlación de los resultados en la Etapa 2

5.3.2.1.- Correlación de los resultados entre RB y SAT –EDTA

La correlación entre RB y SAT–EDTA fue “buena” (valor Kappa = 0,481; p = 0,053), para la Etapa 2 (49 – 140 días posvacunación), debido a que la prueba SAT-EDTA detecta IgM y aunque RB detecta IgG, también reconoce IgM, pero en menor cantidad, por ello que 64 sueros fueron positivos para las dos pruebas y 111 sueros resultaron negativos (ver Cuadro 5.19) Esto se verifica en el estudio realizado por Calva *et al*, 2007; donde la correlación entre las dos pruebas también fue “buena” (valor Kappa = 0,61).

A pesar de la buena correlación entre estas dos pruebas, existen 8 sueros que siendo positivos para RB, son negativos para SAT-EDTA, debido a que RB detecta IgG (Inmunoglobulina que alcanza mayor concentración en la Etapa 2), mientras que SAT-EDTA, reconoce IgM (Inmunoglobulina que en la Etapa 2, empieza a reducir su concentración en el suero, siendo difícil de detectar por las pruebas serológicas). Sin embargo existen 53 sueros que fueron negativos para RB, y positivos para SAT-EDTA, esto se debe probablemente a que en estos sueros la concentración de IgM, se mantenía alta aún y la de IgG empezó a decaer, ya que esta desaparece más rápidamente que la IgM (Tizard, 1995)

Cuadro 5.19: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y SAT – EDTA, para la Etapa 2

		RB		TOTAL
		(+)	(-)	
SAT–EDTA	(+)	64	53	117
	(-)	8	111	119
TOTAL		72	164	168

RB: Rosa de Bengala, SAT – EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA

Elaboración: El Autor

5.3.2.2.- Correlación de los resultados entre RB y iELISA

La correlación entre RB y iELISA fue “mínima” (valor Kappa = 0,180; $p < 0,05$), para la Etapa 2 (49 – 140 días posvacunación). Estas dos pruebas detectan Inmunoglobulinas tipo IgG, por ello 66 sueros son positivos para ambas pruebas y 55 sueros son negativos (ver Cuadro 5.20). Aún así, la correlación entre RB y iELISA es baja, puesto que existieron 109 sueros que siendo negativos para RB, fueron positivos para iELISA (ver Cuadro 5.20). Esto se debe a que la sensibilidad de iELISA es más alta que RB (Van Aert *et al*, 1984; Samartino *et al*, 1999 y Rojas & Alonso 1994; citados por Nielsen, 2002).

Cuadro 5.20: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y iELISA, para la Etapa 2

		RB		
		(+)	(-)	TOTAL
iELISA	(+)	66	109	175
	(-)	6	55	61
TOTAL		72	164	236

RB: Rosa de Bengala, iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto

Elaboración: El Autor

5.3.2.3.- Correlación de los resultados entre SAT–EDTA y iELISA

La correlación entre SAT-EDTA y iELISA fue “regular” (valor Kappa = 0,299; $p = 0,054$), para la Etapa 2 (49 – 140 días posvacunación), debido a que la prueba SAT – EDTA detecta Inmunoglobulinas tipo IgM (alcanzaron su máxima concentración a los 21 días, después siempre arrojaron resultados negativos), mientras que iELISA, IgG (alcanzaron su máxima concentración después de los 42 días), es por ello que 70 sueros siendo positivos para iELISA, fueron negativos para SAT–EDTA (ver Cuadro 5.21).

Cuadro 5.21: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas SAT–EDTA y iELISA, para la Etapa 2

		SAT – EDTA		
		(+)	(-)	TOTAL
iELISA	(+)	104	70	174
	(-)	13	49	62
TOTAL		117	119	236

SAT – EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto

Elaboración: El Autor

5.3.3.- Correlación de los resultados en la Etapa 3

5.3.3.1.- Correlación de los resultados entre RB y SAT –EDTA

La correlación entre RB y SAT–EDTA fue “regular” (valor Kappa = 0,359; p = 0,081), para la Etapa 3 (154 – 378 días posvacunación), puesto que la prueba RB detecta Inmunoglobulinas tipo IgG y en menor cantidad las IgM, por el contrario, la prueba SAT – EDTA, detecta Inmunoglobulinas tipo IgM y pequeñas cantidades de IgG (Castro *et al*, 2006). Según Tizard (1995); las Inmunoglobulinas tipo IgG, pueden perdurar hasta 6 meses después de la vacunación, mientras que las IgM, están presentes por varios meses o algunas veces hasta años después de la vacunación. Tal hecho se suscita en este caso, ya que 33 sueros siendo positivos para SAT–EDTA, resultaron negativos para RB (ver Cuadro 5.22).

Cuadro 5.22: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y SAT–EDTA, para la Etapa 3.

		RB		
		(+)	(-)	TOTAL
SAT – EDTA	(+)	11	33	44
	(-)	1	315	316
TOTAL		12	348	360

RB: Rosa de Bengala, SAT – EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA,

Elaboración: El Autor

5.3.3.2.- Correlación de los resultados entre RB y iELISA

La correlación entre RB y iELISA fue “regular” (valor Kappa = 0,263; p = 0,086), para la Etapa 3 (154 – 378 días posvacunación). Estas dos pruebas detectan Inmunoglobulinas tipo IgG, pero la sensibilidad de iELISA, es más alta que RB (Van Aert *et al*, 1984; Samartino *et al*, 1999 y Rojas & Alonso 1994; citados por Nielsen, 2002) por ello que 29 sueros siendo positivos para iELISA, fueron negativos para RB (ver Cuadro 5.23), a esto probablemente se debe la baja correlación entre estas dos pruebas.

Cuadro 5.23: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y iELISA, para la Etapa 3

		RB		TOTAL
		(+)	(-)	
iELISA	(+)	7	29	36
	(-)	4	320	324
TOTAL		11	349	360

RB: Rosa de Bengala, iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto

Elaboración: El Autor

5.3.3.3.- Correlación de los resultados entre SAT – EDTA y iELISA

La correlación entre SAT-EDTA y iELISA fue “mínima” (valor Kappa = 0,185; p < 0,05), para la Etapa 3 (154 – 378 días posvacunación), debido a que SAT–EDTA detecta Inmunoglobulinas tipo IgM y iELISA, IgG. Otra razón por la que existe una baja correlación es que en la Etapa 3, las Inmunoglobulinas que deben estar presentes son las IgM ya que como se mencionó anteriormente, las IgG, pueden perdurar hasta 6 meses después de la vacunación, mientras que las IgM, pueden estar presentes hasta después de varios meses o hasta años; sin embargo en el Cuadro 5.24, se puede observar que 105 sueros son negativos para SAT–EDTA mientras que para iELISA, resultan positivos, esto probablemente se debe a que los 105 sueros son positivos con

tan solo 1,87 unidades por ml para iELISA, motivo por el cual se puede tratar de sueros falsos positivos.

Cuadro 5.24: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas SAT – EDTA y iELISA, para la Etapa 3

		SAT – EDTA		
		(+)	(-)	TOTAL
iELISA	(+)	30	105	135
	(-)	14	211	225
TOTAL		44	316	360

SAT – EDTA: “Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA, iELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” indirecto

Elaboración: El Autor

VI. CONCLUSIONES

1. La vacunación con la Cepa 19 estimuló la aparición de la inmunoglobulina M (IgM), al cabo de 7 días y alcanzó títulos máximos a los 14 días (960 U.I.). Luego, en el día 35, su concentración en el suero fue reduciendo, pero sin desaparecer, permaneciendo detectables hasta el día 217. Las inmunoglobulinas G (IgG), aparecieron casi al mismo tiempo que las IgM (7 – 14 días), y alcanzaron títulos máximos entre los 35 y 56 días posvacunación (15 unidades/ml), siendo reconocidas hasta el día 203.
2. En la Etapa 1 (0 – 42 días posvacunación) y en la Etapa 2 (49 – 140 días posvacunación), hay mayor cantidad de Inmunoglobulina M (IgM), por lo tanto la mejor concordancia fue entre las pruebas SAT-EDTA y RB (valor Kappa = 0,880), puesto que la primera prueba detecta la inmunoglobulina M (IgM) y aunque RB reconoce la inmunoglobulina G (IgG), también detecta IgM, pero en menor cantidad. En la Etapa 3 (154 – 378 días posvacunación), ninguna correlación fue buena, ya que SAT-EDTA reconoce IgM, mientras que iELISA

y RB, detectan IgG, sin embargo debería existir una buena correlación entre éstas dos últimas pruebas, pero tal hecho no ocurre, debido a que iELISA, posee una mayor sensibilidad.

3. La vida media de los anticuerpos posvacunales depende de la edad de vacunación, cuanto más joven es el animal, menor tiempo retiene tales anticuerpos, motivo por el cual, la edad óptima para vacunar terneras es entre los 4 y 6 meses de edad.
4. La vida media de los anticuerpos posvacunales en terneras que son hijas de madres positivas a Brucelosis, no se diferencia de la vida media de anticuerpos de terneras, cuyas madres son negativas.
5. La Cepa RB 51 no provoca interferencias con el diagnóstico, ya que al carecer de la cadena O, no genera anticuerpos que confundan con el diagnóstico de las pruebas serológicas.

VII. RECOMENDACIONES

1. No se debe vacunar terneras en edades tempranas (menor a 3 meses) ni a edades tardías (mayores a 7 meses) puesto que en el primer caso la inmunidad pasiva, proveniente de la madre, bloquea la inmunidad activa y en el segundo caso, las terneras con esa edad retienen mayor tiempo los anticuerpos provocando interferencias con el diagnóstico.
2. En lugares con alta prevalencia de Brucelosis, es recomendable realizar la prueba Rosa de Bengala, debido a que ofrece una aproximación diagnóstica en pocos minutos, y por su simplicidad es muy útil como prueba de despistaje inicial o screening, pero en lugares con baja prevalencia, es recomendable realizar pruebas confirmatorias como iELISA “Enzyme Linked Immunosorbent

Assay” indirecto, por su alta sensibilidad y especificidad. Cuando se sospeche de que existen infecciones recientes, es recomendable aplicar la prueba SAT-EDTA (“Serum Agglutination Test” en presencia de EDTA).

3. Se puede revacunar animales a edad adulta (mayores a 12 meses), con la Cepa RB51, puesto que no ocasiona interferencias con el diagnóstico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ACHA P. & SZYFRES B. 2003. Brucellose. In: mondiale de la santé animale, O. (Ed), Zoonoses et maladies transmissibles communes á l´ homme et aux animaux. Volume 1: bactérioses et mycoses. Nueva Editorial Interamericana, Paris, 26-52.

AGUIRRE N., MANZINI V., ECHAIDE S., VALENTÍN B., DE LUCCA G., AUFRANC C., CANAL A., VIGLIOCO A., NIELSEN K. 2001. Dinámica de anticuerpos en hembras Holando Argentino vacunadas con *Brucella abortus* cepa 19 utilizando siete pruebas serológicas. Anuario 2001. Producción Animal.

Disponibile en: http://rafaela.inta.gov.ar/anuario2001/a2001_84.htm

ARÉSTEGUI M., GUALTIERI C., DOMÍNGUEZ J., SCHAROVSKY G. 2001. El Género *Brucella* y su interacción con el Sistema Mononuclear Fagocítico. Veterinaria México. Vol. 32. No. 002. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal de México, 131 – 139.

ARIZA J. 2000. Brucelosis: Aspectos actuales de principal interés. Servicio Enfermedades Infecciosas, C.S.U. de Bellvitge. Control Calidad SEIMC.

BLASCO J. Y GAMAZO C. 1994. Brucelosis Animal. Investigación y Ciencia.

Disponible en: <http://coli.usal.es/web/educativo/articulos/art07/art07.htm>

BERCOVICH Z. 2000. The use of skin delayed – type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review.

BIRMINGHAM J., TABATABAI L., DEYOE B., JESKA E., NUESSEN M., 1982.

Generation of chemotactic factor for granulocytes and monocytes from serum by fractions of Brucella Abortus. Immunology 46, 17 – 22.

BLOOD D., HENDERSON J. RADOSTITS O. 1987. Enfermedades causadas por diversas especies de Brucella. In: Unknown (Ed). Medicina Veterinaria. Interamericana. México, 522-540.

CALVA, J. 2007. Determinación de la seroprevalencia de anticuerpos contra Brucella spp. en trabajadores de nueve camales del norte del país. Carrera de Bioquímica Clínica. Universidad Central del Ecuador.

CASTRO, H., GONZÁLEZ, S. & PRAT, M. 2005. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica. Clínica. Latinoamericana..Vol.39, No.2, Buenos Aires, 203-216.

CASTRO H., GONZÁLEZ S., PRAT M., BALDI P. 2006. Detección de anticuerpos anti-Brucella spp. en cerdos mediante técnicas de aglutinación y ELISA indirecto en las

provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 38. No. 2. Buenos Aires.

CERERO O., SALADO J. CASTILLO J., RODRÍGUEZ E., CASANOVA R. 2000. Brucellose. Santa Clara.

D' ANATRO . 2003. Aislamiento y tipificación de *Brucella abortus*. Jornada de Actualización sobre Brucelosis Bovina. D.L.L.A.V.E. “Miguel C. Rubino”.

DÍAZ R., LEIVA J., RUBIO M., & DORRONSORO I. 2000. Diagnóstico de la Brucelosis humana. En: Diagnóstico de brucelosis animal. **DÍAZ E., HERNÁNDEZ L., VALERO G & ARELLANO B.,** INIFAP, México.

DÍAZ E., LEAL M. & CANTÚ A. 2005. Brucelosis Bovina. In: Diagnóstico de Brucelosis Animal. Díaz E., Hernández L., Valero, G. & Arellano B., EDITORS. México, 3 – 5, 17 – 19.

ESTEIN S. 1999. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la Epidemitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. Revistas electrónicas UACH. Vol 31. No.1. Valdivia.

ESTEIN S. 2006. Brucelosis: Inmunidad y Vacunación. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. 7. No. 5.

FERNÁNDEZ, P. 1995. Análisis de Supervivencia. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Universitario – Universitario Juan Canalejo. Coruña, 130–135. Disponible en www.fisterra.com

GARCÍA J. 2003. Materia de Sanidad Animal.

GODFROID J. & BOULAERT. 1995. Prescriptions pour le diagnostique serologique de la brucellose. CERVA-Bélgica.

LÓPEZ, A. 2007. Brucella.

Disponible en: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap7/>

MAG-SESA. 1999. Prevención y Control de la brucelosis bovina en Ecuador. Tech.rep., Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria, Quito.

MAG. 2006. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. Panorama de la Cadena Agroindustrial de la carne y subproductos.

MONTES I. 2000. Diagnóstico de la Brucelosis. Servicio de Microbiología. Hospital Virgen del Puerto. Cáceres.

MORALES, C. 1998. Diagnóstico de Brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). Archivos de Medicina Veterinaria. Vol. 30. No. 1. Valdivia.

MORILLA A. & GONZÁLEZ D. 1998. Introducción al diagnóstico inmunológico de las enfermedades de los animales domésticos. Inifap.SAGAR. México.

NIELSEN K., 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbio, 447-459

O.I.E. 2002. Manual standards for diagnostic tests and vaccines, 4th edition. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00048.htm.

OLIVEIRA S., SOEURT G., SPLITTER G. 2002. Molecular and cellular interactions between Brucella abortus antigens and hosts immune responses. Vet Microbiol 90, 417- 424.

OPS-OMS.2001. Panel: Zoonosis de importancia para la economía y para la salud pública, brucelosis y tuberculosis bovina: Control y eliminación. Xxii reunión a nivel ministerial en salud y agricultura. Brasil.

ORTIZ E., CABRERA E., IZQUIERDO M. 2007. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP- BRU para el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Veterinaria Organización. Vol. 7. No. 4. La Habana.

PASTORET P., BLANCOU J. VANNIER & VERSCHUEREN C. 1997. Veterinary vaccinology. Amsterdam, 554-583

REINA M. 2003. Métodos en Biología Celular: ELISA, 17-18. Disponible en: <http://www.ub.cs/biocel/wbe/tecnicas/elisa.htm>

RIVERS R., ANDREWS E., GONZÁLEZ – SMITH A., DONOSO G., OÑATE A. 2006. Brucella abortus: Inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. 38. No. 1, 7 – 18.

RODRÍGUEZ Y., RAMÍREZ SÁNCHEZ W., ANTÚNEZ G., PÉREZ B., RAMÍREZ PÉREZ Y., IGARZA A. 2005. Brucelosis Bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Revista electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. 6. No. 9. España.

RON J. 2003. Validación de Técnicas Diagnósticas para la detección de Brucelosis y Estudio Epidemiológico en una región andina del Ecuador. Tesis de Maestría en Sanidad Animal. Instituto de Medicina Tropical, Príncipe Leopoldo, Departamento de Sanidad Animal Tropical. Ámberes – Bélgica.

RON J., SAEGERMAN C., WALRAVENS K., BRANDT J., BENÍTEZ W., CELI M., PROAÑO F, CHÁVEZ M., BERKVENNS D. 2007. Bayesian validation of diagnostic techniques and estimation of the prevalence of bovine brucellosis in the northern Sierra of Ecuador. Quito.

SAMARTINO, L. 2003. Conceptos Generales sobre Brucelosis Bovina. Jornada de actualización sobre Brucelosis Bovina, Rocha.

SAMARTINO L., SALUSTIO E. GREGORET R., 2003. Evaluación de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en hembras bovinas preñadas. Jornada de actualización sobre Brucelosis Bovina.

SAG. 2001. Vacunación con cepa RB51. Programa oficial de erradicación de Brucelosis Bovina en Chile. Ministerio de Agricultura.

SCHURIG G., SRIRANGANATHAN N., CORBEL M. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90, 479-496.

SZYFRES B. 2000. *Vaccinology*.

SERRA J., GODOY P. 2000. Incidencia, etiología y epidemiología de la Brucelosis en un área rural de la provincia de LLeida. *Revista Española Salud Pública*. No. 1, 45 – 53.

TIZARD I. 1995. *Inmunología Veterinaria*. Texas University. 5th Edición. McGraw-Hill. Interamericana, 285-303.

VADEMÉCUM VETERINARIO. 2006

VILLARROEL M., GRELL M., SÁENZ R. 2000. Reporte de primer caso humano de aislamiento y tipificación de *Brucella abortus* RB51. *Archivos de Medicina Veterinaria*. Vol. 32. No. 1. Valdivia.

YOUNG E. 1997. Especies de *Brucella*. In: *Enfermedades Infecciosas*. G. Mandell, J. Bennet & R. Dolin., editors. Buenos Aires., pp 2300-2320.

CENTRO INTERNACIONAL DE ZONOSIS

ANEXOS

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS

Prueba Rosa de Bengala (RB)

HOJA N° 1

Especie: bovinos

Fecha:

Fecha muestreo

Procedencia:

N° de Lote 3 BGT 25

Fecha exp:

Resp JR. MFM

PLACA 1

P ()

S ()

N ()

SC(+)	IA 3	IA 7	IA 11	IA 15	IA 19
SC(-)	IA 4	IA 8	IA 12	IA 16	IA 20
IA 1	IA 5	IA 9	IA 13	IA 17	IA 21
IA 2	IA 6	IA 10	IA 14	IA 18	IA 22

PLACA 2

P ()

S ()

N ()

IA 23	IA 27	IA 31	IA 35	IA 39	IA 43
IA 24	IA 28	IA 32	IA 36	IA 40	IA 44
IA 25	IA 29	IA 33	IA 37	IA 41	IA 45
IA 26	IA 30	IA 34	IA 38	IA 42	IA 46

Anexo A: Hoja de Trabajo diario de la prueba Rosa de Bengala (RB)

Anexo B: Preparación de la hoja de protocolo iELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	(1/270)	(1/540)	(1/1080)	(1/2160)	(1/4320)	(1/8640)	(1/8640)	BS	BB
B	(1/270)	(1/540)	(1/1080)	(1/2160)	(1/4320)	(1/8640)	(1/8640)	BS	BB
C	M4	M5							
D	M4	M5							
E									
F									
G									
H									

- (1/270) = Dilución de la curva de calibración, en doble filas (filas A y B)
 BS = Tampón para diluir curva de calibración (Control negativo)
 BB = Tampón GS – EDTA – Tween 80 (Control de Tampón)
 M1 = Muestra No. 1
 SBFneg = Suero bovino Francia negativo

Fuente: Ron (2003)

Anexo C: Resultados de las tres pruebas diagnósticas para todos los muestreos realizados después de la vacunación

Días posvacunación	7 días			14 días			21 días			28 días		
	Prueba de diagnóstico	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA
604	+	120	3,75	+	100	0	+	100	3,75	+	60	
605	+	200	1,87	+	200	0	+	100	1,87	+	80	
607	+	200	7,5	+	200	0	+	100	7,5	+	100	
608	+	320	15	+	50	3,75	+	160	15	+	120	
609	+	400	0	+	60	0	+	120	1,87	+	60	
610	+	640	3,75	+	400	0	+	400	3,75	+	100	
611	+	480	0	+	240	0	+	320	1,87	+	120	
612	+	800	7,5	+	400	0	+	960	7,5	+	400	
613	+	400	7,5	+	100	3,75	+	240	7,5	+	200	
614	+	640	0	+	240	0	+	240	3,75	+	240	
615	+	1920	3,75	+	400	0	+	400	7,5	+	400	
616	+	400	15	+	60	1,87	+	200	30	+	240	
617	+	2560	3,75	+	400	0	+	800	3,75	+	400	

618	+	320	0	-	50	0	+	100	1,87	+	60
619	+	100	0	+	100	0	+	240	3,75	+	400
620	+	800	3,75	+	100	0	+	240	15	+	200
621	+	7680	3,75	+	240	0	+	1920	7,5	+	480
622	+	320	7,5	+	960	1,87	+	120	7,5	+	60
623	-	15	1,87	-	15	1,87	-	15	1,87	-	-
624	+	60	3,75	+	30	3,75	+	50	3,75	+	50
625	+	640	3,75	+	120	0	+	200	7,5	+	120
626	+	800	0	+	320	0	+	320	3,75	+	80
627	-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	3,75	-	-
628	-	30	1,87	-	-	3,75	-	25	3,75	-	25

42 días			49 días			56 días			63 días			70 días	
RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB11	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - ED
+	50	1,87	+	30	3,75	+	25	3,75	+	25	3,75	+	25
+	50	1,87	+	50	1,87	+	50	1,87	+	50	1,87	+	25
+	50	7,5	+	50	15	-	50	7,5	-	30	3,75	-	25
+	50	7,5	+	50	7,5	+	50	3,75	-	30	3,75	-	50
+	50	3,75	+	50	3,75	-	50	1,87	-	40	1,87	-	40
+	100	7,5	+	60	7,5	-	60	7,5	-	40	7,5	-	50
+	100	3,75	-	100	3,75	+	100	3,75	-	50	3,75	-	25
+	200	7,5	+	120	7,5	+	100	7,5	+	60	7,5	+	60
+	100	7,5	+	100	7,5	+	60	7,5	+	80	3,75	+	60
+	100	7,5	+	100	7,5	+	100	7,5	-	100	3,75	-	50
+	200	15	+	120	15	+	100	15	+	100	7,5	-	50
+	160	30	+	200	30	+	160	30	+	120	15	+	50
+	200	7,5	+	120	7,5	+	100	7,5	+	100	3,75	+	60
-	50	1,87	-	30	1,87	-	-	1,87	-	-	0	-	-
+	240	15	+	50	3,75	+	200	15	+	100	7,5	+	100
+	100	15	+	400	15	+	50	7,5	+	100	15	-	60
+	400	15	+	200	15	+	200	15	+	200	15	+	200
-	25	7,5	-	30	3,75	-	30	3,75	-	25	3,75	-	20
-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	0	-	-	1,87	-	-
+	25	3,75	-	20	3,75	-	25	3,75	-	-	3,75	-	-
-	40	3,75	-	30	3,75	+	25	3,75	-	25	3,75	-	25
+	50	1,87	+	60	15	-	40	1,87	-	30	1,87	-	30
-	-	3,75	-	-	3,75	-	-	3,75	-	-	3,75	-	-
-	-	3,75	-	-	3,75	-	-	3,75	-	-	3,75	-	-

84 días			98 días			112 días			126 días			140 días	
RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA
-	15	1,87	-	15	1,87	-	-	1,87	-	25	0	-	-

+	25	0	-	15	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	25	1,87	-	-	1,87	-	-	0	-	-	0	-	-
-	25	1,87	-	-	1,87	-	-	0	-	-	0	-	-
-	40	1,87	-	25	1,87	+	240	0	+	100	0	+	60
-	25	1,87	-	25	1,87	+	25	1,87	+	25	1,87	+	40
-	25	0	-	20	0	-	15	0	-	15	0	-	15
+	60	3,75	+	50	1,87	-	30	0	-	30	0	-	50
+	80	3,75	-	50	3,75	-	30	3,75					
-	25	3,75	-	50	3,75	-	50	1,87	-	15	1,87	-	25
-	40	3,75	-	30	1,87	-	30	1,87	-	50	1,87	-	40
-	50	15	-	50	7,5	-	25	7,5	-	25	3,75	-	15
+	60	1,87	+	50	0	+	60	0	-	50	0	-	80
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
+	50	3,75	-	50	3,75	-	50	3,75	-	50	1,87	-	30
-	30	0	-	25	3,75	-	25	1,87	-	25	1,87	-	25
+	100	7,5	+	100	7,5	+	60	3,75					
-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	0	-	-	1,87	-	-
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	0	-	-	3,75	-	-
-	25	3,75	-	30	1,87	-	15	0	-	15	0	-	15
-	30	0	-	20	0	-	15	3,75	-	15	1,87	-	15
-	-	1,87	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	3,75	-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	1,87	-	-

168 días / 0 días			175 días/7 días			182 días/14 días			189 días/21 días			196 días/28 días	
RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1,87	-	-
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	1,87	-	-
-	-	0	-	-	0	SP	SP	SP	-	15	0	-	-
-	30	0	+	50	0								
-	20	0	+	25	1,87	-	25	1,87	-	25	1,87	-	25
-	-	0	SP	SP	SP	-	-	0	-	15	3,75	-	-
-	50	1,87	-	50	1,87	-	50	1,87	-	50	1,87	-	50
-	25	0	+	30	3,75	+	30	3,75	-	25	1,87	-	25
-	-	3,75	-	-	1,87	-	15	1,87	-	25	1,87	-	25
-	60	0	+	60	0	+	80	1,87	+	100	3,75	+	100
-	-	0	-	-	0	-	-	3,75	-	-	0	-	-
-	30	1,87	-	30	1,87	-	25	1,87	-	25	1,87	-	25
SP	SP	SP	-	25	1,87	-	25	0	-	15	0	-	15
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	0	-	-	0	-	15	0	-	15	0	-	15
-	-	0	-	-	3,75	-	-	0	-	-	0	-	-

-	30	0	-	20	1,87	-	30	0	-	25	0	-	20
-	15	0	-	15	0	-	15	0	-	15	0	-	15
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1,87	-	-
-	-	1,87	-	15	1,87	-	30	1,87	-	15	3,75	-	-

210 días/42 días			217 días/49 días			224 días/56 días			238 días/70 días			252 días/84 días	
RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	0	-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	0	-	-
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
+	20	1,87	-	20	1,87	-	25	1,87	-	20	1,87	-	25
-	-	3,75	-	-	3,75	-	-	3,75	-	-	3,75	-	-
-	30	1,87	-	30	3,75	-	25	1,87	-	30	0	-	20
-	30	7,5	-	30	7,5	-	25	3,75	-	15	1,87	-	15
-	15	1,87	-	15	1,87	-	15	1,87	-	15	1,87	-	-
-	50	1,87	+	60	1,87	-	50	0	-	50	0	+	60
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	25	1,87	-	25	1,87	-	15	1,87	-	15	3,75	-	-
-	-	0	-	15	0	-	-	7,5	-	-	7,5	-	-
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	0	-	-	1,87	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	1,87	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	15	0	-	-	0	-	15	0	-	15	0	-	15
-	15	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1,87	-	-
-	-	0	-	-	0	-	-	1,87	-	-	0	-	-

280 días/112 días			294 días/126 días			322 días/154 días			350 días/182 días		
RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA	RB	SAT - EDTA	iELISA
-	-	0	-	15	0	-	-	0	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
-	20	0	-	20	3,75	-	-	1,87	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0

-	30	1,87	-	30	1,87	-	30	1,87	-	-	0
-	25	1,87	-	25	1,87	-	15	1,87	-	-	1,87
-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	1,87	-	-	0
+	50	0	-	60	1,87	-	50	0	-	15	0
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
-	-	1,87	-	-	1,87	-	15	0	-	-	0
-	15	0	-	-	1,87	-	-	0	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	15	0	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	-	1,87	-	-	3,75
-	-	0	-	-	1,87	-	-	0	-	-	0
-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	15	1,87
-	15	0	-	15	1,87	-	-	0	-	15	0
-	-	0	-	-	1,87	-	-	0	-	-	0

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	II
Abstract.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimiento.....	V
Índice de contenidos.....	XI
Listado de Tablas.....	XIX
Listado de Cuadros.....	XX
Listado de Gráficos.....	XXII
Listado de Figuras.....	XXIII
Listado de Anexos.....	XXV
1.- INTRODUCCIÓN.....	
1.1.- Antecedentes y Justificación.....	1
2.- OBJETIVOS.....	3
2.1.- General.....	3
2.2.- Específicos.....	3
3.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1.- Brucelosis.....	4
3.1.1.- Antecedentes Históricos.....	4

3.1.2.- Distribución Geográfica.....	5
3.1.3.- Pérdidas Económicas.....	5
3.1.3.1.- Pérdidas directas.....	6
3.1.3.2.- Pérdidas indirectas.....	6
3.2.- El género <i>Brucella</i>	7
3.2.1.- Etiología.....	7
3.2.2.- Estructura antigénica de <i>Brucella</i>	8
3.2.2.1.- El Lipopolisacárido (LPS).....	9
3.2.3.- Resistencia y Supervivencia.....	10
3.2.4.- Diseminación.....	11
3.2.4.1.- Diseminación entre rebaños.....	12
3.2.4.1.1.- Movimiento de los animales.....	12
3.2.4.1.2.- Contacto directo con rebaño infectado.....	13
3.2.4.1.3.- Contacto indirecto con rebaño infectado.....	13
3.2.4.2.- Diseminación dentro del rebaño.....	13
3.2.5.- Patogenia.....	15
3.2.5.1.- Puertas de entrada de <i>Brucella</i>	15
3.2.5.1.1.- Oral.....	15
3.2.5.1.2.- Intrauterina.....	15
3.2.5.1.3.- Ocular.....	16
3.2.5.1.4.- Piel.....	16
3.2.5.1.5.- Respiratoria.....	16
3.2.5.1.6.- Pezón.....	16
3.2.5.1.7.- Vía congénita o vertical.....	17
3.2.5.2.- Factores que influyen en la susceptibilidad.....	17

3.2.5.2.1.- Edad.....	17
3.2.5.2.2.- Preñez.....	17
3.2.5.2.3.- Inmunidad o Resistencia.....	18
3.2.5.2.4.- Razas.....	18
3.2.5.3.- Período de Incubación.....	18
3.2.5.4.- Dosis infectante.....	19
3.2.5.5.- Progresión de la enfermedad en el animal.....	19
3.2.5.5.1.- Penetración.....	19
3.2.5.5.2.- Permanencia.....	19
3.2.5.5.3.- Bacteremia.....	20
3.2.5.6.- Localización de <i>Brucella</i>	20
3.2.5.6.1.- En vaca preñada.....	20
3.2.5.6.1.1.- El Aborto.....	20
3.2.5.6.2.- En vaca no preñada y en machos.....	21
3.2.5.7.- Eliminación de <i>Brucella</i>	21
3.2.5.7.1.- Ubre.....	21
3.2.5.7.2.- Útero.....	22
3.2.5.7.3.- Semen.....	22
3.2.6.- Mecanismos de defensa de <i>Brucella</i>	23
3.3.- Diagnóstico.....	23
3.3.1.- Diagnóstico Directo.....	23
3.3.1.1.- Hemocultivos.....	24
3.3.1.2.- Subcultivo.....	24
3.3.1.3.- Identificación.....	25
3.3.1.4.- Tipificación.....	25

3.3.2.- Diagnóstico Indirecto.....	25
3.3.2.1.- Pruebas de Diagnóstico.....	25
3.3.2.1.1.- Condiciones de una prueba diagnóstica.....	26
3.3.2.1.1.1.- Validez.....	26
3.3.2.1.1.1.1.- Sensibilidad y Especificidad.....	26
3.3.2.1.1.1.1.1.- Los “Falsos positivos”.....	27
3.3.2.1.1.1.1.2.- Los “Falsos negativos”.....	28
3.3.2.1.1.2.- Reproductividad.....	29
3.3.2.1.1.3.- Seguridad.....	29
3.3.2.1.1.3.1.- Valor predictivo positivo.....	30
3.3.2.1.1.3.2.- Valor predictivo negativo.....	30
3.3.2.1.2.- Pruebas en suero.....	31
3.3.2.1.2.1.- Prueba Rosa de Bengala.....	31
3.3.2.1.2.2.- Aglutinación lenta en tubo de Wright.....	32
3.3.2.1.2.3.- Prueba de aglutinación con 2 – mercaptoetanol.....	33
3.3.2.1.2.4.- ELISA (Enzyme linked inmunoabsorbent assay).....	34
3.3.2.1.2.4.1.- ELISA indirecto (ELISA-I).....	34
3.3.2.1.2.4.2.- ELISA directo.....	35
3.3.2.1.2.4.3.- ELISA competitivo (ELISA-C).....	36
3.3.2.1.3.- Pruebas en leche.....	37
3.3.2.1.3.1.- Prueba del anillo en leche o “Milk Ring Test”.....	37
3.4.- Inmunización de animales mediante Vacunas.....	38
3.4.1.- Cuidados en la vacunación.....	38
3.4.2.- Tipos de vacunas.....	39
3.4.2.1.- <i>Brucella abortus</i> Cepa 19.....	39

3.4.2.1.1.- Influencia de la vacunación sobre el diagnóstico.....	40
3.4.2.1.2.- Ventajas.....	42
3.4.2.1.3.- Desventajas.....	43
3.4.2.2.- <i>Brucella abortus</i> Cepa RB51.....	43
3.4.2.2.1.- Revacunación.....	44
3.4.2.2.2.- Ventajas.....	45
3.4.2.2.3.- Desventajas.....	45
3.5.- Respuesta Inmunológica.....	46
3.5.1.- Inmunidad mediada por células.....	46
3.5.1.1.- Macrófagos.....	47
3.5.1.2.- Neutrófilos.....	47
3.5.1.3.- Células asesinas (Natural Killer).....	47
3.5.2.- Inmunidad Humoral.....	48
3.5.2.1.- Inmunoglobulinas.....	48
3.5.2.1.1.- Evolución de las inmunoglobulinas en animales vacunados e infectados....	48
3.6.- Epidemiología.....	49
3.6.1.- La rucelosis a nivel mundial.....	49
3.6.2.- La Brucelosis en el Ecuador.....	50
3.6.2.1.- Regiones de alta prevalencia.....	50
3.6.2.2.- Regiones de baja prevalencia.....	51
3.6.2.3.- Región indemne.....	51
3.7.- Estrategias de Prevención y Control en el Ecuador.....	51
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
4.1.- Características del Campo Experimental.....	54
4.1.1.- Ubicación.....	54

4.1.2.- Características agroclimáticas.....	55
4.2.- Etapas realizadas.....	55
4.2.1.- Etapas de campo.....	55
4.2.1.1.- Materiales.....	55
4.2.1.2.- Selección e Identificación de animales.....	56
4.2.1.3.- Vacunación.....	57
4.2.1.4.- Revacunación.....	57
4.2.1.5.- Conformación de grupos de trabajo.....	58
4.2.1.6.- Esquema de muestreo.....	60
4.2.2.- Etapa de Laboratorio.....	60
4.2.2.1.- Pruebas de Diagnóstico utilizadas en la Investigación.....	60
4.2.2.1.1.- Protocolo de las pruebas diagnósticas.....	61
4.2.2.1.2.- Prueba de aglutinación rápida en placa “Rosa de Bengala”.....	61
4.2.2.1.2.1.- Materiales.....	61
4.2.2.1.2.2.- Reactivos.....	62
4.2.2.1.2.3.- Protocolo.....	62
4.2.2.1.2.4.- Validación.....	63
4.2.2.1.2.5.- Interpretación.....	63
4.2.2.1.3.- Prueba de aglutinación lenta en tubo o de Wright “Serum Agglutination Test (SAT) con EDTA.....	64
4.2.2.1.3.1.- Materiales y Equipos.....	64
4.2.2.1.3.2.- Reactivos.....	64
4.2.2.1.3.3.- Soluciones y tampones.....	64
4.2.2.1.3.4.- Protocolo.....	65
4.2.2.1.3.4.- Lectura de placas e interpretación de resultados.....	66

4.2.2.1.4.- Prueba “Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay” indirecto (iELISA).....	67
4.2.2.1.4.1.- Materiales y Equipos.....	67
4.2.2.1.4.2.- Reactivos.....	67
4.2.2.1.4.3.- Tampones.....	68
4.2.2.1.4.4.- Soluciones.....	70
4.2.2.1.4.5.- Protocolo.....	70
4.2.2.1.4.6.- Interpretación de resultados.....	73
4.3.- Análisis Estadístico.....	73
4.3.1.- Diagramas de caja.....	73
4.3.2.- Análisis de Supervivencia de los anticuerpos utilizando el Límite del producto de Kaplan Meier.....	74
4.3.3.- El índice KAPPA.....	76
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
5.1.- Resultados de las pruebas de diagnóstico.....	79
5.1.1.- Resultados en muestreos previos a la vacunación.....	79
5.1.1.1.- Terneras hijas de madres rectoras a RB.....	80
5.1.1.2.- Terneras hijas de madres no rectoras a RB.....	81
5.1.2.- Resultados en muestreos posteriores a la vacunación.....	82
5.1.2.1.- Tiempo de aparición de Inmunoglobulinas de tipo IgM (7 días posvacunación).....	83
5.1.2.2.- Tiempo de aparición de Inmunoglobulinas de tipo IgG (14 -21-28-42 días posvacunación).....	86
5.1.2.3.- Nivel de persistencia de IgM en grupos de terneras con diferentes edades de vacunación.....	87

5.1.2.4.- Nivel de persistencia de IgG en grupos de terneras con diferentes edades de vacunación.....	95
5.1.2.5.- Respuesta humoral de los diferentes grupos.....	102
5.1.2.6.- IgM vs IgG.....	104
5.1.3.- Resultados en muestreos posteriores a la revacunación.....	106
5.2.- Análisis de Supervivencia.....	106
5.2.1.- Método de Kaplan Meier por grupos de diferente edad al momento de la vacunación.....	106
5.2.1.1.- Método de Kaplan Meier con la prueba RB.....	106
5.2.1.2.- Método de Kaplan Meier con la prueba SAT-EDTA.....	109
5.2.1.3.- Método de Kaplan Meier con la prueba iELISA.....	113
5.2.2.- Método de Kaplan Meier en hijas de madres rectoras a RB.....	116
5.2.2.1.- Método de Kaplan Meier con la prueba RB.....	116
5.2.2.2.- Método de Kaplan Meier con la prueba SAT-EDTA.....	118
5.2.2.3.- Método de Kaplan Meiere con la prueba Ielisa.....	120
5.3.- Correlación entre los resultados de las pruebas serológicas (índice KAPPA).....	123
5.3.1.- Correlación de los resultados en la Etapa 1.....	123
5.3.1.1.- Correlación de los resultados entre RB y SAT-EDTA.....	123
5.3.1.2.- Correlación de los resultados entre RB y iELISA.....	124
5.3.1.3.- Correlación de los resultados entre SAT-EDTA y iELISA.....	125
5.3.2.- Correlación de los resultados en la Etapa 2.....	126
5.3.2.1.- Correlación de los resultados entre RB y SAT-EDTA.....	126
5.3.2.2.- Correlación de los resultados entre RB y iELISA.....	127
5.3.2.3.- Correlación de los resultados entre SAT-EDTA y iELISA.....	127
5.3.3.- Correlación de los resultados en la Etapa 3.....	128

5.3.3.1.- Correlación de los resultados entre RB y SAT-EDTA.....	128
5.3.3.2.- Correlación de los resultados entre RB y iELISA.....	129
5.3.3.3.- Correlación de los resultados entre SAT-EDTA y iELISA.....	129
6.- CONCLUSIONES.....	131
7.- RECOMENDACIONES.....	133
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	134

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A: Hoja de trabajo diario de la prueba Rosa de Bengala (RB).....	142
Anexo B: Preparación de la hoja de protocolo iELISA.....	143
Anexo C: Resultados de las pruebas RB, SAT-EDTA y iELISA en todas los muestreos.....	144

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 4.1: Identificación y datos de animales en estudio.....	56
Cuadro 4.2: Conformación de grupos de trabajo.....	58
Cuadro 4.3: Terneras hijas de madres rectoras a RB y Terneras hijas de madres no reactoras a RB.....	59
Cuadro 4.4: Esquema de toma de muestras.....	60
Cuadro 4.5: Etapas de tiempo y comparaciones realizadas.....	76
Cuadro 4.6: Tabla de doble entrada utilizada para la prueba KAPPA.....	77
Cuadro 5.1: Resultados de las pruebas diagnósticas en animales aún no vacunados...	79
Cuadro 5.2: Resultados de las pruebas diagnósticas a los 7 días posvacunación.....	83
Cuadro 5.3: Resultados de las pruebas diagnósticas a los 14, 21, 28 y 42 días posvacunación.....	87

Cuadro 5.4: Resultados de la prueba SAT-EDTA, para el Grupo A.....	89
Cuadro 5.5: Resultados de la prueba SAT-EDTA, para el Grupo B.....	91
Cuadro 5.6: Resultados de la prueba SAT-EDTA, para el Grupo C.....	93
Cuadro 5.7: Resultados de la prueba iELISA, para el Grupo A.....	96
Cuadro 5.8: Resultados de la prueba iELISA, para el Grupo B.....	98
Cuadro 5.9: Resultados de la prueba iELISA, para el Grupo C.....	100
Cuadro 5.10: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba RB.....	108
Cuadro 5.11: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba SAT-EDTA.....	110
Cuadro 5.12: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba iELISA.....	114
Cuadro 5.13: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba RB.....	117
Cuadro 5.14: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba SAT-EDTA.....	119
Cuadro 5.15: Método para calcular la curva de supervivencia de Kaplan Meier con la prueba iELISA.....	121
Cuadro 5.16: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y SAT – EDTA para la Etapa 1.....	124
Cuadro 5.17: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y iELISA para la Etapa 1.....	125
Cuadro 5.18: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas SAT-EDTA y iELISA, para la Etapa 1.....	125

Cuadro 5.19: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y SAT – EDTA, para la Etapa 2.....	126
Cuadro 5.20: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y iELISA, para la Etapa 2.....	127
Cuadro 5.21: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas SAT–EDTA y iELISA, para la Etapa 2.....	128
Cuadro 5.22: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y SAT–EDTA, para la Etapa 3.....	128
Cuadro 5.23: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas RB y iELISA, para la Etapa 3.....	129
Cuadro 5.24: Relación entre los resultados obtenidos en las pruebas SAT – EDTA y iELISA, para la Etapa 3.....	130

LISTADO DE FIGURAS

Figura 5.1: Diagrama de caja del Grupo A, con la prueba SAT-EDTA.....	90
Figura 5.2: Cinética de Ac del Grupo A, utilizando la prueba SAT-EDTA.....	90
Figura 5.3: Diagrama de caja del Grupo B, con la prueba SAT – EDTA.....	92
Figura 5.4: Cinética de Ac del Grupo A, utilizando la prueba SAT-EDTA.....	92
Figura 5.5: Diagrama de caja del Grupo C, con la prueba SAT – EDTA.....	94
Figura 5.6: Cinética de Ac del Grupo C, utilizando la prueba SAT – EDTA.....	94
Figura 5.7: Diagrama de caja del Grupo A, con la prueba iELISA.....	97
Figura 5.8: Cinética de Ac del Grupo A, utilizando la prueba iELISA.....	97
Figura 5.9: Diagrama de caja del Grupo B, con la prueba iELISA.....	99
Figura 5.10: Cinética de Ac del Grupo B, utilizando la prueba iELISA.....	99
Figura 5.11: Diagrama de caja del Grupo C, con la prueba iELISA.....	101

Figura 5.12: Cinética de Ac del Grupo C, utilizando la prueba iELISA.....	101
Figura 5.13: Cinética de anticuerpos por grupos con diferentes edades, utilizando la prueba SAT-EDTA.....	102
Figura 5.14: Cinética de anticuerpos por grupos con diferentes edades, utilizando la prueba iELISA.....	102
Figura 5.15: Cinética de las Inmunoglobulinas de tipo IgG e IgM, mediante las pruebas iELISA y SAT- EDTA.....	104
Figura 5.16: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos A, B y C, con la prueba RB.....	109
Figura 5.17: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos A, B y C, con la prueba SAT-EDTA.....	112
Figura 5.18: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos A, B y C, con la prueba Ielisa.....	115
Figura 5.19: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos 1 y 2, con la prueba SAT – EDTA.....	118
Figura 5.20: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos 1 y 2, con la prueba SAT-EDTA.....	120
Figura 5.21: Distribución de supervivencia de anticuerpos de los grupos 1 y 2, con la prueba iELISA.....	122

LISTADO DE GRÁFICOS

Gráfico 3.1: Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de <i>Brucella</i> . El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO).....	10
Gráfico 3.2: Representación esquemática de los resultados de la prueba de seroaglutinación de algunas vacas infectadas de " hatos problema".....	29
Gráfico 3.3: Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con cepa 19 entre 4 y 6 meses de edad.....	41
Gráfico 3.4: Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con la vacuna cepa 19 a los 8 meses de edad.....	41
Gráfico 4.1: Procedimiento para la realización de la prueba SAT.....	65

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1: Especies que integran el género <i>Brucella</i> , hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.....	8
Tabla 3.2: Supervivencia de <i>Brucella</i> en el medio ambiente.....	11
Tabla 3.3: Técnicas de Diagnóstico con su respectiva sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de Brucelosis.....	38
Tabla 3.4: Manejo de la vacuna <i>Brucella abortus</i> Cepa 19.....	40
Tabla 3.5: Manejo de la vacuna <i>Brucella abortus</i> Cepa RB51.....	44
Tabla 3.6: Investigaciones sobre Brucelosis, realizadas en las Universidades ecuatorianas.....	53
Tabla 4.1: Relación entre el grado de translucidez, dilución del suero a investigar y Unidades Internacionales, según diluciones del suero control positivo.....	66
Tabla 4.2: Diluciones de la curva de calibración, unidades y “cut off”.....	72

Tabla 4.3: Interpretación de la prueba KAPPA.....78