



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA A BRUCELOSIS EN
BÚFALOS DE AGUA (*Bubalus bubalis*) EN CUATRO UNIDADES
DE PRODUCCIÓN DE LOS ESTADOS DE TABASCO Y VERACRUZ
DE LA REGIÓN TROPICAL DE LA REPÚBLICA MEXICANA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ROBERTO ANTONIO GARCÍA MUÑOZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO

MVZ. JOSÉ JUAN LIRA AMAYA

AMECAMECA, ESTADO DE MÉXICO, MAYO DE 2018.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo el cual representa una trayectoria completa de esfuerzos y logros a mi mamá PETRA GARCÍA MUÑOZ quien me ha brindado desde siempre su incondicional apoyo en cada momento, usted siempre ha estado a mi lado en las buenas y en las malas gracias por todo lo que me ha ofrecido y por saberme guiar por el camino correcto, nadie lo podría hacer mejor que usted y porque siempre me ha dado lo mejor del mundo que es su valioso apoyo y su invaluable cariño, sin usted no lo hubiera logrado, mil gracias por ser conmigo la mejor mamá.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por haberme permitido alcanzar este logro, por acompañarme siempre e iluminar mi sendero.

A mi mamá PETRA GARCÍA MUÑOZ por su invaluable apoyo y por todo lo que me ha brindado.

A mis directores:

Doctor JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO por sus enseñanzas, por su contribución en mi desarrollo académico y sobre todo por brindarme su valioso apoyo, su tiempo, su amistad y mucha de su paciencia, de corazón muchas gracias por todo doctor.

MVZ. JOSÉ JUAN LIRA AMAYA por el apoyo brindado para la realización de este proyecto, gracias.

A mis Revisores:

Dra. VIRGINIA GUADALUPE GARCÍA RUBIO y M.S.P. MARIA AURORA TORRES VELAZQUEZ, gracias por su apoyo en las correcciones pero sobre todo gracias por brindarme un parte de su valioso tiempo.

A la Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca, y a cada uno de mis profesores por haber contribuido en mi formación académica.

Al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET, INIFAP), por permitir ampliar mis conocimientos en esta área y las facilidades brindadas para el trabajo de laboratorio.

ÍNDICE

	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
III.	JUSTIFICACIÓN.....	8
IV.	HIPÓTESIS.....	10
V.	OBJETIVOS	11
VI.	MARCO TEÓRICO.....	12
	6.1 Aspectos relevantes del búfalo de agua (<i>Bubalus bubalis</i>)	12
	6.1.1 Sistema digestivo del búfalo de agua	18
	6.1.2 Parámetros productivos del búfalo de agua	21
	6.2 Brucelosis	23
	6.3 Agente etiológico	25
	6.4 Transmisión	30
	6.5 Patogenia	33
	6.6 Signos clínicos	35
	6.7 Situación epidemiológica	36
	6.8 Diagnóstico	39
	6.8.1 Prueba de tarjeta o Rosa de Bengala	42
	6.8.2 Prueba de Precipitación de Rivanol	43
	6.8.3 Prueba de Fijación de Complemento	44
	6.8.4 Prueba de ELISA	45
	6.8.5 Prueba de PCR	46
	6.9 Vacunación	46
	6.10. Inmunidad ante <i>Brucella</i>	48
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	49
	7.1 Localización	49
	7.2 Toma y procesamiento de muestras	49
	7.3 Diseño experimental	49
	7.4 Prueba de ELISA	50
	7.5 Interpretación de la prueba	50

	7.6 Análisis estadístico y epidemiológico	51
VIII.	RESULTADOS	52
IX.	DISCUSIÓN	57
X.	CONCLUSIONES	66
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXO 1	74
	ANEXO 2	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1	Parámetros relativos a la tasa de paso en búfalos, vacunos y ovejas	20
2	Especies más representativas del género <i>Brucella</i>	26
3	Tiempo de supervivencia de <i>Brucella</i> en diferentes fómites	31
4	Distribución de la población muestreada en las cuatro unidades de producción.....	53
5	Determinación de prevalencia a Brucelosis en búfalos de agua en unidades de producción de Veracruz y Tabasco	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.		
1	Búfalo de agua de raza Mediterránea	14
2	Búfalos de agua de la raza Murrah	15
3	Hembra bufalina de la raza Murrah	15
4	Búfalo de agua de la raza Jafarabadi	16
5	Búfalo de agua de la raza Carabao	17
6	Membrana externa de la pared celular de <i>Brucella</i>	28
7	Mapa de la situación epidemiológica de la brucelosis en animales	39
8 y 9	Toma de muestra sanguínea en la Unidad de Producción Veracruz 2	52
10 y 11	Realización de la prueba de ELISA	54
12	Lectura de resultados en el espectrofotómetro con filtro de 450 nm	55

I. INTRODUCCIÓN

Los búfalos de río (*Bubalus bubalis*) y de pantano (*Bubalus arnee*), se consideran originarios de Asia, desde donde fueron llevados a África, Europa, Oceanía y por último, traídos al continente Americano a Estados Unidos, Venezuela, Argentina y Brasil. Actualmente la población de búfalos ha crecido vertiginosamente y se encuentra presente en casi todos los países americanos, con la excepción de Chile y de Canadá; se estima que en el continente americano existen más de 3 800 000 ejemplares, los países latinoamericanos con mayor población bufalina son Brasil, con 3 500 000 cabezas; Venezuela con 150 000, Colombia con 85 000 y Argentina con 70 000 (Calderón *et al.*, 2010).

A pesar de que la introducción en Latinoamérica del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) fue desde hace 88 años, fue hasta la década de los 70 cuando comienza su relevancia como especie de interés zootécnico en la producción de proteína animal (Rosales *et al.*, 2015). La introducción de búfalos de agua a Estados tropicales de México como Veracruz y Tabasco es un fenómeno relativamente reciente y aún se desconoce mucho sobre la situación demográfica y epidemiológica de esta especie (Suazo, 2011).

A pesar de que estos rumiantes han sido por muchas décadas alimentados con productos fibrosos y de baja calidad nutricional con niveles bajos de proteína y energía, el búfalo de agua es una especie bovina con gran potencial para la producción de carne, leche y trabajo (Angulo *et al.*, 2010); esto se debe a que esta especie posee algunas características morfológicas y físicas que facilitan una mayor

adaptación a condiciones más variables que el ganado bovino del género *Bos* (*taurus* e *indicus*) (Calderón *et al.*, 2010); debido a esto, la producción de búfalos de agua representa una opción importante como fuente de ingresos en aquellos establecimientos ganaderos o unidades de producción que se ubican en zonas poco aprovechables por los bovinos, como son los terrenos bajos, anegables y pantanosos, con climas tropical y subtropical y en campos con pastizales naturales de bajo valor nutritivo (Martínez *et al.*, 2006).

En el aspecto productivo los búfalos de pantano (*Bubalus carabanesis*) y de río (*Bubalus bubalis*), tienen una diferente capacidad de producción lechera, siendo la del segundo de dos a cuatro veces superior a la del primero, debido a que los búfalos de pantano se usan más como animales de tiro, por tal motivo los búfalos de agua o río se encuentran entre los animales de mayor producción de leche y de carne de las zonas tropicales cálidas, húmedas y de las zonas subtropicales. (Calderón *et al.*, 2010).

Buena parte de las unidades de producción bufalinos son destinados a la producción de leche y carne, actividad desarrollada a partir de la década del 90; y carne, además de las utilidades que prestan en la industria de la piel, alcanzando valores que duplican a las pieles de bovinos (Martínez *et al.*, 2006); por lo que debido a las características de adaptabilidad que posee y a la alta calidad de sus productos el interés en la producción de búfalo de agua es cada vez mayor (Calderón *et al.*, 2010).

En la gran mayoría de los casos, los búfalos de agua comparten el hábitat con los bovinos de las unidades de producción, esta situación no significa ausencia de dificultades para su producción conjunta, ya que se pueden presentar problemáticas de tipo sanitario, debido a que los agentes de ciertas enfermedades infecciosas pueden transmitirse entre ambas especies puesto que la producción bovina y bufalina se ve afectada por una gran variedad de enfermedades que influyen negativamente en la producción, afectando así los parámetros zootécnicos tanto productivos y reproductivos (Martínez *et al.*, 2006).

Muchas de estas patologías son de origen infeccioso, y se transmiten de un animal a otro y algunas otras son consideradas como zoonóticas contagiando al ser humano y generando problemas de salud pública (Motta *et al.*, 2014).

Dentro de las enfermedades de mayor riesgo destaca la brucelosis que es una enfermedad infectocontagiosa que afecta la salud de los animales y del hombre ubicándose así como una de las principales zoonosis de origen bacteriano de importancia global, pudiendo ocasionar enfermedad con una dosis infecciosa tan baja de diez bacterias, esta enfermedad afecta a distintas especies de interés zootécnico entre estas los bovinos, así como también a algunas otras especies de bovinos silvestres, ocasionando importantes pérdidas económicas como consecuencia de infertilidad y baja productividad (Meglia *et al.*, 2011).

Así pues la gravedad de esta zoonosis incurre en un riesgo directo con las personas que trabajan con ganado bovino, o de manera indirecta, como es en el caso de las personas que consumen productos lácteos no pasteurizados provenientes de

animales infectados con esta enfermedad, ya sea de forma directa o indirecta, la problemática para la salud pública es la misma y una de las consecuencias de esta infección es un periodo de convalecencia prolongado y los elevados costos del tratamiento para los seres humanos y de igual manera las pérdidas que repercuten a la productividad ganadera debido a costos de tratamiento y baja de la producción (Peña *et al.*, 2014).

En América Latina, las pérdidas económicas debidas a Brucelosis bovina se estiman cercanas a los 600 millones de dólares (Rosales *et al.*, 2015); siendo así la Brucelosis una de las patologías que más preocupan a productores pecuarios y profesionales de la salud animal, por el gran impacto productivo y económico que tiene ésta sobre los índices de productividad de las unidades de producción y por ser además el búfalo naturalmente receptivo (Martínez *et al.*, 2006).

Así pues, esta enfermedad representa uno de los problemas de mayor importancia que afecta la producción ganadera debido a la problemática que engloba la presencia de enfermedades de tipo reproductivo, cuyas manifestaciones más sobresalientes son, los nacimientos de crías débiles, reabsorciones embrionarias, nacimientos de crías muertas (mortinatos), abortos, muertes fetales e infertilidad (Motta *et al.*, 2012).

En el caso del búfalo de agua, solo pocas búfalas desarrollan los signos clínicos de la enfermedad (abortos); sin embargo, muchas de ellas diseminan *B. abortus* en leche, lo cual es un grave riesgo para la salud pública; por tal motivo, la detección

de la enfermedad es de suma importancia para no correr el riesgo de infección o diseminación por animales asintomáticos a esta enfermedad (Rosales *et al.*, 2015).

En la actualidad, el diagnóstico de laboratorio para animales de producción está basado en técnicas serológicas como son las pruebas de aglutinación rápida para tamizaje y técnicas confirmatorias como ELISA indirecto, competitivo y fluorescencia polarizada (FPA) (Rosales *et al.*, 2015).

En México la brucelosis bovina afecta de manera importante a la población económicamente activa, generándose un impacto en la micro y macroeconomía, a nivel federal, la brucelosis en animales está regulada por la norma oficial mexicana vigente (NOM-041-ZOO-1995) (Peña *et al.*, 2014).

Como se ha mencionado, principalmente en el trópico mexicano existen unidades de producción de búfalos, en las que se desconoce la situación epidemiológica de muchas enfermedades en esta especie, por lo que en este trabajo se pretende conocer dicha situación específicamente para la brucelosis en dos unidades de producción ubicadas en el Estado de Veracruz y dos en el Estado de Tabasco.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día la producción ganadera en el área de bovinos en algunas zonas del país tiende a innovar su productividad utilizando nuevos métodos y nuevas opciones de crianza animal con la finalidad de mejorar la producción. Dentro de estos nuevos cambios se podrían señalar algunos convencionales como lo es el mejoramiento genético del ganado vacuno, y algunos otros no tan comunes ni tradicionales como la introducción de nuevas especies en el entorno ganadero, como es el caso de la crianza de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) como un animal de producción.

Esta innovación ha adquirido un aumento considerable, teniendo una gran difusión en las unidades de producción bovina de las zonas tropicales y subtropicales del país donde a su vez la producción ganadera con bovinos domésticos (*Bos indicus* y *Bos taurus*), es de gran relevancia.

De tal manera, que la forma que la convivencia que existe entre el ganado vacuno y el búfalo de agua en el mismo entorno de las unidades de producción ha traído consigo considerables beneficios como es el caso de un mejoramiento en la productividad por parte del búfalo de agua, teniendo ciertas características favorables, tales como una mejor conversión alimenticia, mayor adaptabilidad a ecosistemas adversos, mayor rusticidad, longevidad u mayores tasas reproductivas; atributos que hacen muy deseable a esta especie para la productividad pecuaria; sin embargo, al ser una especie relativamente nueva en el ámbito productivo y sobre todo al tener esta una procedencia silvestre con poco control sanitario la hace también ser una especie un tanto desconocida en cuestión de sanidad, ya que al

ser un bovino silvestre puede presentar enfermedades que sean contagiosas al ganado vacuno o viceversa pudiendo ser posibles hospederos de enfermedades propias del ganado vacuno convirtiendo así a esta especie como una fuente de infección o caso contrario un vector de enfermedades bovinas. De tal forma que esta interacción entre ambas especies puede traer impactos negativos como es el riesgo de transmisión, diseminación, propagación y/o fuente de reservorio potencial de diferentes enfermedades infecto-contagiosas de gran riesgo sanitario, como es el caso de la brucelosis bovina, que es una enfermedad de distribución mundial de carácter altamente contagioso al afectar a diferentes especies animales, y de denominación zoonótica al ser una enfermedad que afecta la salud humana de forma directa por el contacto que tienen los productores, médicos veterinarios, personal que trabaja en las unidades de producción, y todas aquellas personas que tengan algún tipo de contacto con el ganado bovino y de forma indirecta debido al consumo de leche o productos lácteos no pasteurizados que contengan a este microorganismo patógeno teniendo como consecuencia una grave problemática de salud pública.

III. JUSTIFICACION

La brucelosis es una de las enfermedades infecto-contagiosas de distribución mundial y de denominación zoonótica, más importantes para la salud pública, esta enfermedad afecta la productividad ganadera, así como también a otras especies domésticas o silvestres y también afecta la salud del ser humano.

Dentro del ambiente productivo, las bacterias del genero *Brucella* afectan a distintas especies animales una de ellas, por ejemplo; es el caso del ganado bovino que es una de las especies de producción más importantes, en la cual las consecuencias que en esta conlleva la infección por este microorganismo son altamente perjudiciales debido al impacto que esta especie genera dentro de la sociedad.

De igual manera una de las especies silvestres que es afectada por la brucelosis es el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), especie que ha tenido gran relevancia como una fuente alternativa para la producción de alimentos de origen animal; sin embargo, a diferencia de las especies domésticas convencionales en el búfalo de agua no existe un control sanitario tan estricto como por ejemplo con el ganado vacuno, lo cual hace que a esta especie se le considere como un riesgo que pueda contribuir al contagio de esta enfermedad.

En México, la situación epidemiológica de la brucelosis en bovinos tiene ciertas variaciones teniendo así algunas regiones que engloban a Estados que están libres de esta enfermedad; por otra parte, se encuentran algunos otros tienen una situación de control, y algunos otros están en situación de erradicación. En la región

sureste del trópico mexicano en los estados de Tabasco y Veracruz la situación de seroprevalencia de brucelosis bovina se encuentra en fase de control.

Así, resulta importante conocer la situación de seroprevalencia de brucelosis en el búfalo de agua, ya que en esta región la población de esta especie es significativa y debido a esto, puede representar un punto de distribución de esta especie tanto de animales sanos y/o animales seropositivos a la infección de forma sintomática o asintomática, representando así un gran factor de riesgo para la estabilidad productiva óptima del ganado bovino en el país y así como también un grave riesgo de salud pública ya que esta enfermedad es de carácter zoonótico y debido a que se han presentado infecciones en los seres humanos constituye una problemática de tipo sanitaria.

En el año 2006, México ocupó el vigésimo primer lugar mundial en Brucelosis humana y el segundo lugar en el continente americano, con una incidencia de 1.74 casos por cada 100 000 habitantes, dicha incidencia aumentó a 2.97 en el año 2011 (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

Debido a esto es necesario realizar un adecuado estudio para detectar la presencia de brucelosis en las unidades de producción con búfalos que a su vez interactúan con ganado bovino, todo esto con la finalidad de tener un adecuado control sanitario en las unidades de producción y de esta forma preservar la estabilidad sanitaria de la producción ganadera.

IV. HIPOTESIS

Dada el estatus zoonosario de control a la brucelosis en los Estados de Tabasco y Veracruz, la prevalencia de brucelosis en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) se encontrará menor al 3 %.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la seroprevalencia a brucelosis en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en cuatro unidades de producción de los estados de Tabasco y Veracruz de la región tropical de la república mexicana.

OBJETIVO ESPECIFICO

Establecer mediante la prueba serológica de ELISA, la prevalencia de brucelosis en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en dos unidades de producción en los Estados de Tabasco y dos en Veracruz, México.

VI. MARCO TEORICO

6.1 Aspectos relevantes del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*)

El búfalo de agua es una especie animal que pertenece a la clase de los mamíferos, subclase ungulata, orden de los artiodáctilos, suborden rumiante, familia de los bóvidos, subfamilia bovina, tribu bovini (Hortal *et al.*, 2016).

Como especie se divide en dos tipos o subespecies, las cuales son; el búfalo de río (*Bubalus bubalis*) y el búfalo de pantano (*Bubalus arnee*), estas dos subespecies tienen diferencias fenotípicas y genotípicas. El búfalo de agua o de río, por ejemplo, tiene 50 pares de cromosomas mientras que el de pantano tiene 48. De manera normal se puede realizar cruzamientos entre estas dos subespecies resultando de estas un individuo de 49 pares de cromosomas (Martínez *et al.*, 2006).

Actualmente se reconocen 19 razas de búfalos en el mundo de las cuales 16 son originarias de la región indo-paquistaní tales como; Murrah, Jafarabadi, Surti, Nagpuri, Nili-Ravi, Kundi, Meshana, Pandharpuri, Manda, Jerangi, Kalahandi, Sambalpur, Bhadawari, Tharai, Toda y South Kanara (Rosales, 2009).

El interés zootécnico que representa el búfalo de agua está orientado hacia el doble propósito refiriéndose a este la producción de carne y leche, y así mismo en algunos casos también es orientada hacia otro fin zootécnico como lo es la producción de trabajo, refiriéndose a esta como la utilización de estos animales para la tracción. Inicialmente a principios del siglo XX cuando el búfalo de agua comenzó a llegar a algunos países de Latinoamérica como Argentina se intentó hacer cruzamientos entre el búfalo de agua y bovinos para destinar el resultado de esta cruce hacia la producción lechera; sin embargo, estos intentos resultaron ser un fracaso debido a que no se consideró la incompatibilidad cromosómica entre estas dos especies ya

que el búfalo de agua tiene 50 cromosomas y en el bovino existen 60 cromosomas (Crudeli *et al.*, 2014).

Esta especie incluye 19 razas de las cuales las cuatro más conocidas mundialmente son Mediterránea, Murrah, Jafarabadi y Carabao; actualmente, la población bufalina mundial ronda los 170 millones de cabezas, siendo Asia el continente que concentra la mayor cantidad de búfalos (Almaguer, 2007).

Mediterránea: es una raza originada en Italia, está definida como una raza en Europa y otras zonas costeras del mediterráneo. Presenta como características distintivas de esta raza sus colores comunes, que son el negro, gris oscuro y marrón oscuro. De igual forma presenta cuernos de tamaño mediano dirigidos hacia atrás y hacia los costados con las puntas serradas hacia arriba y hacia adentro formando así una especie de media luna. Dentro de sus parámetros del tamaño los adultos machos tienen un peso promedio de 700 a 800 kg y las hembras 600 a 650 kg, esta raza presenta un cuerpo compacto, macizo, profundo, ancho, con patas cortas y robustas (Fig. 1) (Crudeli *et al.*, 2014).



Figura 1. Búfalo de agua de raza Mediterránea (Crudeli *et al.*, 2014).

Murrah: esta es una raza originaria del noroeste de la India, el color característico de esta raza es el negro azabache, los cuernos son de color negro, tamaño corto y de forma espiralada desde su misma base orientados hacia los costados y espiralados hacia atrás. Los adultos tienen un peso promedio de 600 a 800 kg en machos y en hembras es de 500 a 600 kg. Las hembras poseen una ubre bien desarrollada con venas bien marcadas y cuartos bien encuadrados así mismo la bajada de la leche es rápida características las cuales hacen a esta raza una excelente productora de leche, otro atributo que favorece a esta raza es su fácil adaptación a climas fríos (Fig. 2 y 3) (SENASA, 2004).



Figura 2. Búfalos de agua de la raza Murrah (SENASA, 2004).



Figura 3. Hembra bufalina de la raza Murrah (SENASA, 2004).

Jafarabadi: son originarios de la India, el color propio de esta raza es el color negro, aunque también son aceptables manchas de color blancas en la cabeza y en las partes inferiores de las patas. Como características anatómicas propias de esta raza, tienen una frente muy prominente y convexa, una cabeza grande, los cuernos son pesados, gruesos, fuertes y anchos se orientan hacia abajo terminando en un rulo espiralado hacia atrás. Los machos adultos tienen un peso de 700 a 1500 kg y las hembras 650 a 900 kg, es la raza de búfalos de agua de mayor tamaño (Fig. 4) (Crudeli *et al.*, 2014).



Figura 4. Búfalo de agua de la raza Jafarabadi (Crudeli *et al.*, 2014).

Carabao: el búfalo de agua denominado de tipo carabao, es un animal cuya característica principal y de la cual se refiere a su denominación es de pantano, el color de pelaje de este tipo de búfalo es gris púrpureo, con cuernos macizos

dirigidos hacia atrás, largos y abiertos, puede presentar algunas manchas de color blancas en las patas frente y cuello, son de conformación compacta, tienen una frente plana, un morro ancho, en las hembras la ubre es pequeña y dirigida hacia atrás, genéticamente tienen la característica de poseer 48 cromosomas, un rasgo distintivo de este tipo de búfalo es que fenotípicamente no hay distinción significativa entre hembras y machos, el fin zootécnico para el cual es destinado el búfalo carabao es trabajo, producción de carne, en menor escala la producción de leche, y como subproducto el cuero (Fig. 5) (Almaguer, 2007).



Figura 5. Búfalo de agua de la raza Carabao (Almaguer, 2007).

Cabe señalar que en los búfalos de agua en condiciones de temperaturas altas en climas tropicales y subtropicales los hace mejores ganadores de peso lo cual los hace buenos productores de carne y de igual manera los hace eficientes

productores de leche. En el particular caso de las hembras la búfala no necesita esperar al “flushing” de pasto verde en primavera para entrar en celo cuyo proceso reproductivo lo tienen durante marzo a junio la única limitante es que el celo se corta cuando comienza a descender la temperatura (SENASA, 2004).

En México y algunos países de Latinoamérica especialmente Venezuela, Colombia y Brasil, el búfalo de agua ha tenido una rápida difusión como una especie productiva debido a su gran rusticidad, longevidad y fuerza, características propias de esta especie que le han ayudado a generar un gran impacto y la ha colocado como una de las especies de mayor productividad especialmente en las zonas subtropicales y tropicales cálidas y húmedas de los países en que esta especie ha tenido mayor difusión (Hortal *et al.*, 2016).

Debido a las características anatómicas y fisiológicas exclusivas de esta especie, la producción bufalina se ha vuelto muy atractiva para el desarrollo ganadero en regiones donde las condiciones climáticas son desfavorables, esto es debido a que posee una gran rusticidad y resistencia, así mismo el búfalo de agua parece tener un buen comportamiento en condiciones de alimentación adversas tales como forrajes o pastos de baja calidad con limitados aportes nutritivos debido a que esta especie tiene mayor conversión de nitrógeno dietario en proteína microbiana en el rumen y una mejor utilización de la fibra (Almaguer, 2007).

6.1.1 Sistema digestivo del búfalo de agua

Aparentemente las diferencias anatómicas existentes en el búfalo de agua comparadas con las de los bovinos son realmente poco significativas; por ejemplo, el rumen-retículo en los búfalos es muy similar comparado con el de los vacunos,

sin embargo, el del búfalo es más pesado y tiene una mayor capacidad de entre el 5-10% (Martínez *et al.*, 2006) debido a que este presenta un mayor tamaño el cual varía entre 40 y 100 kg dependiendo del tamaño y peso del animal (López *et al.*, 2005).

En el caso de animales jóvenes existen diferencias en algunos aspectos fisiológicos en el aparato digestivo, tal es el caso de que el rumen del bucerro comienza a funcionar a edades más tempranas preparándolos mejor para utilizar los alimentos fibrosos. En el caso del omaso el del búfalo tiene menor tamaño sin en cambio contiene el mismo número de láminas que el del bovino. El abomaso en esta especie difiere muy poco en la distribución de elementos celulares en la mucosa y su habilidad digestiva se ve más afectada por la temperatura del aire que en el caso de los vacunos (Martínez *et al.*, 2006).

El búfalo presenta una excelente fermentación ruminal lo que favorece su población microbiana la cual es mayor comparada con la del bovino, produce más saliva y su pH es menor. Estas características traen como resultado una mejor digestibilidad de la proteína cruda, de la celulosa y la producción de ácidos grasos volátiles; por otro lado, poseen papilas ruminales más desarrolladas característica que les permite incrementar la superficie de absorción de los productos de la fermentación ruminal de manera que hay una mayor digestibilidad de la fibra cruda. En comparaciones realizadas entre los búfalos de agua con otras especies se encontró que estos tienen una tasa de pasaje de sólidos y líquidos más lenta; por lo que el tiempo medio de retención del alimento es mucho menor, esto es atribuido a la eficiencia en la masticación y la mayor degradación de la fibra en el rumen (Cuadro 1) (López *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Parámetros relativos a la tasa de paso en búfalos, vacunos y ovejas.

INDICADORES	BUFALO	VACUNO	OVEJA
K_1 (%/h) ¹	2.46b	2.99a	2.84ab
K_2 (%/h) ²	11.37a	10.02b	10.76ab
TMR (h) ³	57.73b	64.55a	58.42b

¹ k_1 (%/h): Tasa de paso por el retículo-rumen

² k_2 (%/h): Tasa de paso por el ciego-colon

³ TMR (h): Tiempo medio de retención en el tracto gastrointestinal

Letras diferentes en las filas indican diferencias estadísticas (P<0.05)

Fuente: (López *et al.*, 2005)

En otro aspecto el tiempo de la rumia que tienen los búfalos de agua es menor comparado con el del bovino, siendo este de 425 min/día y 625 min/día; respectivamente, esto se debe a una mayor contracción y una menor velocidad de pasaje del alimento por el rumen de los búfalos (Martínez *et al.*, 2006).

Otro de los factores que diferencian el aparato digestivo de los búfalos de agua y los bovinos es la población microbiana que estos tienen en el rumen, en estudios realizados, han demostrado las diferencias en cuanto a cantidad de microorganismos existentes en el rumen de búfalos y vacunos alimentados con forrajes, se encontró que los búfalos poseen un mayor número de bacterias (1.6 vs. 1.36×10^8 células / ml), de zoosporas fúngicas (7.3×10^6 vs. 3.8×10^6 células/ ml), y una menor población de protozoos ciliados que los vacunos. De igual forma en dietas a base de cereales, la población total de protozoos es menor para los vacunos (26×10^4 vs. 14.2×10^4 células/ml), al igual que la población total de bacterias (21.6×10^9 vs. 17.4×10^9 células/ml), cuando fueron comparados con los búfalos (Wanapat *et al.*, 2000).

6.1.2 Parámetros productivos del búfalo de agua.

Dentro de las ventajas productivas que ofrece el búfalo de agua se tiene que es un animal que puede complementar algunas necesidades de la población, pues la carne de búfalo contiene hasta un 39% menos colesterol que la carne de bovino y con un sabor muy semejante, de igual manera la leche que produce esta especie contiene mayor cantidad de sólidos y de grasas lo cual permite que se puedan producir subproductos lácteos como quesos refinados de excelente calidad (Domínguez *et al.*, 2013).

La producción láctea en promedio que tienen las búfalas es de aproximadamente siete meses que es normalmente cuando se desteta al bucerro. La leche de búfala se caracteriza por su alto contenido de grasa, la producción de leche oscila entre 7 y 12 litros por día con una mayor cantidad de sólidos que la leche de vaca. Contiene 33% menos de colesterol, 48% más de proteína, 59% más de calcio y 47% más de fósforo, también existen diferencias con respecto al color, presenta una coloración más blanca que la leche de vaca, esto es debido a que tiene menor cantidad de carotenos, además contiene el doble de ácido linoleico conjugado, el cual es una sustancia anticancerígena natural que actúa también sobre los efectos secundarios de la obesidad, arterosclerosis y la diabetes. En la producción e industrialización de productos lácteos la leche de búfala presenta un rendimiento del 40% mayor en comparación a la leche de vaca; por ejemplo, para la elaboración de 1 kg de mantequilla se necesitan 14 litros de leche de búfala, en comparación con la leche vacuna que se necesitan 20 litros para elaborar la misma cantidad de mantequilla, de manera similar se necesitan 5 litros de leche de búfala para elaborar

1 kg de queso mozzarella de alta calidad mientras que utilizando leche de vaca se necesitan de 8 a 10 litros (Rosales, 2009).

Así pues la crianza de búfalo de agua como animal productivo en la ganadería convencional, trae consigo algunas cuestiones que deben ser tomadas en cuenta que derivan y son resultado de la convivencia en el mismo entorno de las unidades de producción con el ganado vacuno, como es el caso del riesgo de transmisión, diseminación o reemergencia de ciertas enfermedades como la brucelosis que afecten a la salud animal y consecuentemente a la productividad de estos puesto que hay diversas enfermedades a las que el búfalo de agua es susceptible las cuales puede portar y transmitir de manera particular el riesgo existente de transmisión de enfermedades de carácter zoonótico; es decir, de contagio para los seres humanos, comprometiendo así la eficiencia productiva y la salud animal y humana, cayendo en un problema de tipo sanitario (Moreno *et al.*, 2002).

Tanto los animales domésticos como los silvestres y su ecosistema representan salud y bienestar para la población humana, por que suministran alimentos de alto contenido proteico o son utilizados como animales de trabajo. Esta relación propicia un riesgo para la salud pública, que emerge de la interface humano- animal y ecosistema, el cual se puede describir como la exposición continua, directa o indirecta de los humanos con los animales, sus productos y subproductos, así como el medio ambiente donde se desenvuelven. Existen evidencias de que el 70% de las zoonosis que afectan a los humanos en la actualidad tienen su origen en los animales silvestres; además, se considera que estos son los responsables de la persistencia e incluso la reemergencia de múltiples zoonosis (Flores, 2010).

6.2 Brucelosis

En la gran mayoría de los casos, los búfalos de agua al ser incluidos en la productividad ganadera, comparten el hábitat con los bovinos de las unidades de producción, aparentemente sin perjudicar significativamente la salud y la eficacia zootécnica en ambas especies. Sin embargo, esta situación no significa ausencia de dificultades para su producción conjunta, ya que se pueden presentar cuestiones de tipo sanitarias que involucren seriamente un grave problema de salud pública, ya que los agentes causales de ciertas enfermedades infecciosas pueden transmitirse entre ambas especies, por ejemplo la Brucelosis, siendo una de las patologías que más preocupan a productores y profesionales en este sentido, por el gran impacto sanitario, productivo y económico que tiene ésta sobre los índices de productividad de las unidades de producción y por ser además el búfalo naturalmente receptivo (Martínez *et al.*, 2006).

La Brucelosis es una de las principales zoonosis de origen bacteriano de importancia global, pudiendo ocasionar enfermedad con una dosis tan baja de diez bacterias; se trata de una enfermedad infectocontagiosa de etiología bacteriana que afecta a distintas especies de mamíferos entre ellas a los bovinos por igual ocasionando importantes pérdidas económicas como consecuencia de la baja productividad, anomalías reproductivas e infertilidad (Meglia *et al.*, 2011).

Debido a que esta enfermedad tiene un alto margen de contagio también puede afectar a otras especies domésticas ya sea tradicionales y no tradicionales entre ellas el búfalo de agua (Rosales *et al.*, 2015); representando así una limitante sanitaria y económica en la cría de bovinos y de búfalos. Puesto que dicha enfermedad es una importante zoonosis reemergente de distribución mundial

siendo considerada problema de salud pública (Calderón *et al.*, 2010; Guzmán-Hernández *et al.*, 2016). En el ganado vacuno al igual que en los búfalos de agua esta enfermedad se caracteriza por provocar abortos en el último tercio de gestación; y además, constituye una zoonosis que afecta con más frecuencia a los veterinarios, trabajadores rurales y aquellas personas vinculadas a la cadena productiva lo cual constituye un grave riesgo para la salud pública, así como el contagio para otros animales supuestamente sanos (Rosales *et al.*, 2015).

La infección afecta en todas las edades, pero persiste mayormente en animales sexualmente maduros, en los cuales las pérdidas de productividad son de gran importancia, principalmente por el descenso de la producción láctea al igual que la infertilidad como secuela, aumentando así el periodo entre lactancias y de la misma forma afectando el periodo entre partos que puede prolongarse durante varios meses más disminuyendo así la eficiencia reproductiva del ganado; de igual manera ocurre por desecho de vacas, en los casos de muertes por metritis aguda seguida de retención placentaria. En los animales infectados en etapa de gestación, por lo general se observa las concentraciones más altas de *Brucella abortus* en el contenido del útero gestante, en el feto y en las membranas fetales estructuras que deben considerarse como fuentes importantes de la infección, debido a esto se considera que cuanto más avanzada sea la gestación en el momento de la exposición, mayor es el riesgo de infección (Gasque, 2008).

Siendo así la Brucelosis una limitante sanitaria y económica en la cría de bovinos y de búfalos de agua en las unidades de producción. La infección latente y la prolongada incubación del patógeno limitan la eficiencia de los programas de

erradicación de la infección, lo cual constituye un grave problema para el control sanitario y la erradicación total de esta enfermedad (Calderón *et al.*, 2010).

Esta es una de las enfermedades que tiene una amplia distribución mundial y posee enorme importancia económica sobre todo en el ganado lechero. La incidencia varía considerablemente en distintas unidades de producción, en diferentes regiones y países (Gasque, 2008).

6.3 Agente etiológico

Las especies de *Brucella* spp. son patógenos intracelulares facultativos que establecen y mantienen las infecciones crónicas en una amplia variedad de hospederos mamíferos ya sea domésticos o silvestres (Morales *et al.*, 2012). La clasificación taxonómica para esta bacteria se presenta de la siguiente manera: Dominio: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Proteobacteria alfa, Orden: Rhizobiales, Familia: Brucellaceae, Género: *Brucella* (SINAVE, 2013).

Existen seis especies clásicas dentro de este género bacteriano las cuales son; *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae* (Cuadro 2) (Getachew *et al.*, 2016).

Actualmente investigaciones sobre este microorganismo han reportado nueve especies de *Brucella* de las cuales cuatro especies son de carácter zoonótico como lo son *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*, que por lo general están asociadas a ganado bovino, perros, ovejas, cabras y cerdos; respectivamente. Otras especies tales como *B. microti*, *B. neotomae* en ratones, *B. ovis* en ovejas, *B. pinnipediae* en mamíferos marinos son especies cuyo hospedero

es específico lo cual no representa un riesgo de contagio zoonótico como tal (Calderón *et al.*, 2015).

Recientemente se ha descubierto la existencia de cepas nuevas de *Brucella* como cepas no identificadas aisladas de babuinos, zorros y ranas. Mientras tanto, existe una cepa en particular es el caso de *Brucella inopinata* la cual fue aislada de una infección humana (Garin *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Especies más representativas del género *Brucella*.

Especie de <i>Brucella</i>	Hospederos principales
<i>B. melitensis</i>	Ovinos, caprinos y camélidos
<i>B. abortus</i>	Tenera, búfalo, carnero, yak, bovinos
<i>B. suis</i>	Porcinos, liebre, reno, roedores, caribú
<i>B. canis</i>	Caninos
<i>B. ovis</i>	Ovinos
<i>B. neotomae</i>	Roedores
<i>B. ceti</i>	Delfín, ballena, marsopa
<i>B. pinnipedialis</i>	Foca
<i>B. microti</i>	Zorro rojo, roedor de campo
<i>B. inopinata</i>	Casos reportados en humanos

Fuente: (SINAVE, 2013)

Brucella abortus es el agente causal de la brucelosis bovina en ganado vacuno y en el búfalo de agua, se trata de un microorganismo Gram negativo, inmóvil y no

esporulado, oxidasa y ureasa positivo, no encapsulado ni flagelado e intracelular facultativo (Garin *et al.*, 2014). Posee una envoltura celular compleja compuesta por una membrana citoplasmática, una membrana externa la cual está en contacto con el medio y presenta un componente denominado lipopolisacárido, una membrana interna y un espacio periplásmico intermedio donde se encuentran proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. Debido a esto los componentes de su envoltura celular tienen mucho que ver con su resistencia a los factores ambientales (SINAVE, 2013). El lipopolisacárido (LPS) o también conocido con el nombre de endotoxina, es una unidad estructural y es el componente más abundante, antigénico y principal de la membrana externa. Como componente de esta bacteria es un antígeno inmunodominante y dependiendo de su naturaleza clasifica a las bacterias de este género en especies de fenotipo liso (L) y de fenotipo rugoso (R), en las bacterias que son consideradas como cepas lisas, el lipopolisacárido presente en ellas está constituido por tres elementos como lo son; Lípido A, el Polisacárido central o núcleo, y el polisacárido O también denominado como cadena O (Fig. 6) (Ortiz *et al.*, 2007).

B. abortus se encuentra dentro de las especies de brucela que son clasificadas de fenotipo liso. Así mismo la membrana externa de la bacteria de *Brucella* contiene otros componentes tales como glucanos circulares, polisacárido B, fosfolípidos y proteínas de membrana externa, este último componente al igual que el Lipopolisacárido son reconocidos como factores de virulencia potenciales (SAGARPA, 2009).

Este patógeno intracelular facultativo, infecta a los macrófagos y células epiteliales del hospedero produciendo una respuesta inflamatoria que afecta a las células del sistema reticuloendotelial así como a las células placentarias durante la gestación (Calderón *et al.*, 2010).

Se ha observado que cepas virulentas de esta bacteria tienen una capa proteica protectora en su exterior, que les permite vivir dentro de las células y producir infecciones generalizadas crónicas, esto le confiere la capacidad de evadir los mecanismos inmunológicos (Gasque, 2008).

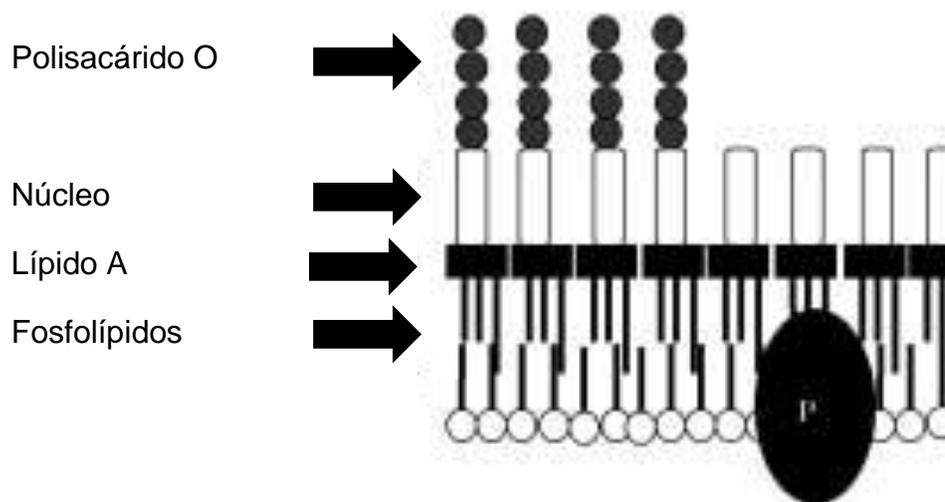


Figura 6. Membrana externa de la pared celular de *Brucella* (Castro *et al.*, 2005).

Las especies de *Brucella* pueden ser clasificadas como lisas o rugosas de acuerdo al aspecto de las colonias en medio sólido. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de lipopolisacárido (LPS), expresado en mayor proporción en

superficie LPS-S y LPS-R, teniendo una mayor patogenicidad las cepas lisas (SINAVE, 2013).

Una de las características de *B. abortus* que la diferencian de otro tipo de enterobacterias relacionadas a ella, es la presencia de fosfatidilcolina en la membrana externa, puesto que las otras bacterias similares a *B. abortus* contienen otro tipo de sustancia en su membrana externa, tal condición hace diferenciar a esta bacteria. Otro componente estructural de este microorganismo es un polisacárido denominado hapteno negativo que es químicamente idéntico al polisacárido O; sin embargo, existe una diferencia entre ambos polisacáridos la cual consiste en que el hapteno negativo no está unido al núcleo. Dentro de la estructura celular interna de esta bacteria se encuentran proteínas citoplasmáticas las cuales algunas de ellas son de interés diagnóstico, tales como la glicoproteína A2 termorresistente que aparece en la fase activa de la infección y la proteína periplásmica BP26, estas proteínas forman parte de un antígeno denominado CP, empleado en pruebas de ELISA (Castro *et al.*, 2005).

B. abortus, está representado por siete biovarios, siendo el más difundido el biovar número 1. No obstante, se ha demostrado la presencia de los biovarios 1, 2, 3, 4 y 6, en América Latina (Zavala *et al.*, 2011). Se ha documentado que otras especies de *Brucella*, como *B. suis* (biovar 1 y 3) y *B. melitensis* son capaces de infectar al ganado bovino, aunque la infección no está asociada con la aparición de signos clínicos propios de la enfermedad (Calderón *et al.*, 2015).

La patogenicidad de la bacteria es muy compleja, pudiendo además ocasionar infecciones congénitas, generando animales infectados persistentemente, de muy

difícil identificación ya que no inducen una respuesta inmune detectable (Meglia *et al.*, 2011).

6.4 Transmisión

El patógeno es altamente contagioso y es de muy fácil propagación ya sea por el lamido de animales infectados o de materiales producidos por el aborto, y de igual forma el contagio hacia el ser humano es muy alto, debido al contacto directo con animales positivos a la infección o el consumo de productos lácteos no pasteurizados (Muflihanah *et al.*, 2013).

La principal fuente de contaminación para *Brucella abortus* es el tracto gastrointestinal (Sousa *et al.*, 2015). Así pues, esta enfermedad es fácilmente transmisible por la ingestión, penetración por la conjuntiva, a través de la piel o por contaminación de la ubre durante el ordeño. El pastoreo en áreas contaminadas representa otra forma de infección ya que *Brucella abortus* puede sobrevivir en los pastizales durante periodos variables, según las condiciones climáticas. En climas templados, la capacidad infecciosa de esta bacteria puede persistir durante 100 días en invierno y 30 en verano teniendo así este microorganismo una gran capacidad de sobrevivir y persistir en el ambiente. Aunque por otro lado estas bacterias son bastante sensibles al calor, así una suspensión diluida de brucelas se destruye rápidamente al ser sometida a la pasteurización o al exponerla a temperaturas de 60°C por 30 minutos (Cuadro 3) (SINAVE, 2013).

Cuadro 3. Tiempo de supervivencia de *Brucella* en diferentes fomites.

Material	Tiempo de supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas o pelo almacenadas	110 días
Agua a 37°C y pH 7.5	Menos de 24 horas
Agua a 8°C y pH 6.5	Más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8°C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeña	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días
Materia fecal húmeda	240 días
Secreciones post parto de animales	1-2 meses

Fuente: (SINAVE, 2013).

De igual manera el consumo de agua contaminada con secreciones, membranas fetales infectadas y el contacto con fetos abortados o neonatos, se consideran las formas más frecuentes de la propagación. *B. abortus* presenta otro factor de virulencia el cual es el sistema de secreción tipo IV. Las moléculas efectoras secretadas por este sistema les permiten permanecer en su hospedero (SAGARPA, 2009).

La transmisión por vía respiratoria es menos frecuente y tiene lugar cuando los animales se encuentran estabulados y al estar agrupados se contagian mediante la inhalación de polvo y partículas que transportan a la bacteria (Ortiz *et al.*, 2007).

Durante y después de un aborto o de un parto las hembras infectadas diseminan la bacteria a través de secreciones o descargas vaginales y en los fetos siendo estos últimos la principal fuente de contaminación puesto que vierten al medio ambiente bacterias las cual son transmitidas a otras hembras a través del contacto con la placenta, descargas vaginales, fetos y líquidos fetales (Carrisoza *et al.*, 2014). En el caso del búfalo de agua solamente pocos animales que se infectan logran desarrollar signos clínicos propios de la enfermedad tales como abortos espontáneos; sin embargo, algunas hembras infectadas aparentemente sanas, eliminan *Brucella abortus* en leche (Calderón *et al.*, 2010).

En toros infectados el microorganismo se secreta por el semen; por lo tanto, aumenta la propagación de la enfermedad si se utiliza la inseminación artificial con semen contaminado lo que da lugar a una infección por vía intrauterina (Ortiz *et al.*, 2007). *Brucella abortus*, tiene predilección por el útero grávido, testículos, glándulas sexuales accesorias, ubre, ganglios linfáticos y en menor escala las capsulas articulares y en bolsas sinoviales (Gasque, 2008).

Existe una transmisión congénita provocada por la infección dentro del útero, dicha infección puede permanecer latente en las becerras durante sus primeros meses de vida, el animal puede permanecer serológicamente negativo debido al fenómeno de tolerancia inmunológica, hasta su primer parto, momento en el que comienza a eliminar a la bacteria. Es por ello que, en las infecciones congénitas, o en los primeros meses de vida, representan riesgos relevantes debido a que actúan como

reservorios y fuentes potenciales de infección en su vida reproductiva (Carrisoza *et al.*, 2014).

Es importante destacar que la infección en animales depende de la edad, estado reproductivo e inmunológico, resistencia natural, ruta de infección y virulencia de la cepa infectiva (Calderón *et al.*, 2015).

6.5 Patogenia

Las bacterias que penetran en el organismo y sobreviven a la primera barrera de defensa a nivel de las mucosas alcanzan los ganglios linfáticos regionales una vez en ellos utiliza el sistema linfático para su propagación y después se incorporan al torrente sanguíneo entre los diez y 21 días constituyendo así el estadio bacteriémico que se caracteriza e identifica por la elevación de la temperatura corporal (Ortiz *et al.*, 2007).

La capacidad del microorganismo para sobrevivir y replicarse dentro de diferentes células del huésped explica el alto grado de patogenicidad que este tiene, puesto que la replicación en los trofoblastos placentarios está asociada con el aborto y la persistencia de la bacteria en los macrófagos y otros tipos de células del sistema inmunológico conduce a infecciones crónicas (Muflihanah *et al.*, 2013); por lo general el proceso de infección es de carácter granulomatoso crónico, infecta las células del sistema de fagocitos mononucleares (Sousa *et al.*, 2015).

Al ser fagocitada esta bacteria por el macrófago, mecanismo por el cual en teoría debería de ser destruida al formarse el fagolisosoma, tiene la capacidad de evitar la maduración del fagosoma y crear su nicho intracelular en el retículo endoplasmico, sitio en el que se aloja y se multiplica (Aguilar *et al.*, 2011).

En el medio intracelular *B. abortus* produce distintas formas de adaptación para asegurar su supervivencia, una de ellas es permanecer en el fagosoma intacto y bloquear la función posterior con el lisosoma, por la presencia de la cadena O y los lípidos de ornitina que interactúan directamente con la membrana del fagosoma, protegiéndose así de la acción de los péptidos catiónicos y enzimas líticas presentes en los gránulos lisosómicos (Ortiz *et al.*, 2007).

Esta bacteria presenta especial afinidad por el endometrio grávido y por la placenta fetal de los bovinos por lo que proliferan extensamente en los trofoblastos del tejido placentario que rodea al feto la predilección de la bacteria por estos tejidos se atribuye a la presencia del *D*-eritritol demostrado como fuente de energía para el crecimiento de la brucela (Meza *et al.*, 2010). Penetra en células epiteliales del corion y se reproduce causando placentitis, también produce endometritis con ulceraciones en la capa epitelial que reviste el útero e induce una respuesta inflamatoria en las membranas, este proceso obstruye la circulación fetal y provoca cierto grado de necrosis en los cotiledones (Gasque, 2008); así mismo, infecta macrófagos del hospedero provocando una respuesta inflamatoria que afecta a las células del sistema reticuloendotelial y de la placenta durante la gestación lo que produce muerte y expulsión embrionaria (Calderón *et al.*, 2010).

El periodo de incubación de *Brucella abortus* resulta sumamente variable e inversamente proporcional al desarrollo del feto, de tal forma que cuando más adelantada sea la preñez más corto será el periodo de incubación así pues si la hembra se infecta por vía oral en la época de servicio el periodo de incubación puede prolongarse unos 200 días, mientras que si existe infección seis meses

después de la inseminación artificial o monta natural el periodo de incubación es de cerca de dos meses (Tizard, 2009).

Después del aborto o parto normal *B. abortus* no solo permanece en el útero y en los ganglios linfáticos, sino que la infección se vuelve crónica y las bacterias se localizan en los ganglios, las glándulas mamarias y pueden permanecer en el sistema reticuloendotelial de la ubre entre un periodo de gestación y otro incluso durante años secretándose en la leche (Ortiz *et al.*, 2007).

6.6 Signos clínicos

Los signos clínicos más comunes y sobre todo característicos de la Brucelosis en hembras son el aborto en la segunda mitad o último tercio de la gestación, metritis que puede causar infertilidad seguida de esterilidad, mastitis, retención placentaria, endometritis, estros repetidos o recurrentes y eventualmente trastornos locomotores debido a la presencia de higromas articulares particularmente en miembros anteriores (Gasque, 2008). Otro signo atribuido a Brucelosis es la placentitis necrosante fibrinosa con producción de exudado amarillento de olor fétido que contiene fibrina, restos necróticos e infiltrados perivascuales provenientes del útero (Sousa *et al.*, 2015).

De igual forma en bovinos machos la infección causada por *Brucella abortus* produce signos clínicos que se observan ocasionalmente tales como orquitis y epididimitis, tumefacción aguda en uno o ambos sacos escrotales aumentado hasta dos veces su tamaño, abscesos testiculares, se pueden encontrar aglutininas en el plasma seminal, tumefacción testicular crónica y necrosis testicular que fácilmente pueden ser destruibles (Tizard, 2009).

De manera consecuente en hembras infectadas, se reduce la producción láctea, que se ha estimado hasta en un 25%; así mismo, la eficiencia reproductiva tiende a disminuir por el surgimiento de enfermedades secundarias como metritis, endometritis y algunos trastornos reproductivos como reabsorción embrionaria. En general las hembras infectadas con la enfermedad, pero que no están gestantes, no presentan signos de esta patogenicidad, por lo que pueden pasar desapercibidas (Calderón *et al.*, 2015).

En el caso específico de la brucelosis en búfalos de agua, pocos animales logran desarrollar signos clínicos de esta enfermedad como lo son los abortos espontáneos; sin embargo, algunas hembras infectadas eliminan *B. abortus* por la leche lo que las convierte en portadoras asintomáticas que incrementan el riesgo de diseminación de la enfermedad (Calderón *et al.*, 2010).

6.7 Situación epidemiológica.

La brucelosis se produce en todo el mundo, incluidos los países mediterráneos de Europa, África del norte y del este, India, Asia central, México, América central y del sur (Morales *et al.*, 2012).

La aparición de la Brucelosis Bovina en el continente americano, no tiene registros oficiales que determinen su presencia y localización por vez primera. Algunos autores consideran que su origen se remonta a la época de la conquista, en donde por la importación de animales domésticos de España y otros países europeos se introdujo al continente. Según algunos datos, esta enfermedad se distinguió particularmente por ser la causa de varios abortos en Mississippi y Louisiana en el año de 1864. En 1876 fue demostrada la naturaleza contagiosa del aborto bovino y

de igual forma se cree que la enfermedad fue conocida en Texas y Nuevo México desde 1885. En 1898 la enfermedad de la brucelosis fue diagnosticada clínicamente en Venezuela, y entre 1907-1908 se presentó una epidemia en Perú (Tizard, 2009).

Esta enfermedad es una de las zoonosis de mayor distribución a nivel mundial, de gran importancia tanto en salud pública como producción pecuaria, constituyendo una barrera para el comercio de animales y los subproductos de origen animal lo cual afecta la economía de los países que no han podido erradicar esta patogenicia (Ortiz *et al.*, 2007).

En algunos países de Latinoamérica como Ecuador las pérdidas anuales por brucelosis en el ganado se estiman en alrededor de 5.5 millones de dólares debido a abortos, reducción de leche y mortalidad. En la India, donde la Brucelosis es endémica se han establecido prevalencias entre el 6.5 % al 16.4 % y pérdidas de 3.4 billones de dólares por la enfermedad en diferentes especies de animales domésticos, los bovinos y los búfalos representan el 95.8 % del total de las pérdidas generadas (Calderón *et al.*, 2015).

La prevalencia de brucelosis varía considerablemente entre países, en Latinoamérica las tasas que se registran van desde 0.5 hasta el 10 %, con cifras del 0.04% en Uruguay; 10.2 % en el norte y el 0.06 % en el sur de Brasil, 0.2 % en Chile, 3.15 % en Paraguay, 2.27 % en Bolivia y Argentina 2.10 %, en Colombia oscila entre el 2.4 al 5 % (Calderón *et al.*, 2015).

En Brasil, el primer informe de la brucelosis en búfalo de agua se realizó en 1969, donde se encontró 40.9 % de seropositividad (27/66) de los búfalos. Logrando realizar el primer aislamiento de la bacteria a partir de los contenidos de un higroma articular (Sousa *et al.*, 2015).

En algunos países la incidencia ha disminuido como resultado de las medidas sanitarias aplicadas en bovinos, ovejas y cabras. La enfermedad persiste en áreas del Mediterráneo, Oriente Medio, Golfo Pérsico y en algunos países de Latinoamérica (Calderón *et al.*, 2015).

En México, la existencia de la brucelosis bovina fue confirmada desde 1905, y a partir de esta fecha ha causado grandes pérdidas a la ganadería y así mismo constituye uno de los más importantes problemas de salud pública para el país (Martínez *et al.*, 2011).

La distribución de la brucelosis es mundial y en México es considerada como una enfermedad endémica (Aguilar *et al.*, 2011). El estado de Sonora se encuentra libre de Brucelosis causada por especies lisas y el 30.75% del territorio nacional está reconocido en fase de Erradicación (reconocidos en esta fase los Estados de Baja California Sur, Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit, Quintana Roo y Yucatán, así como algunas regiones de Aguascalientes, de Baja California, Chiapas, Guanajuato, Huasteca de Hidalgo, y de Puebla). En los estados de Tabasco y Veracruz la brucelosis bovina se encuentra en fase de control (Fig. 7) (SAGARPA, 2017).

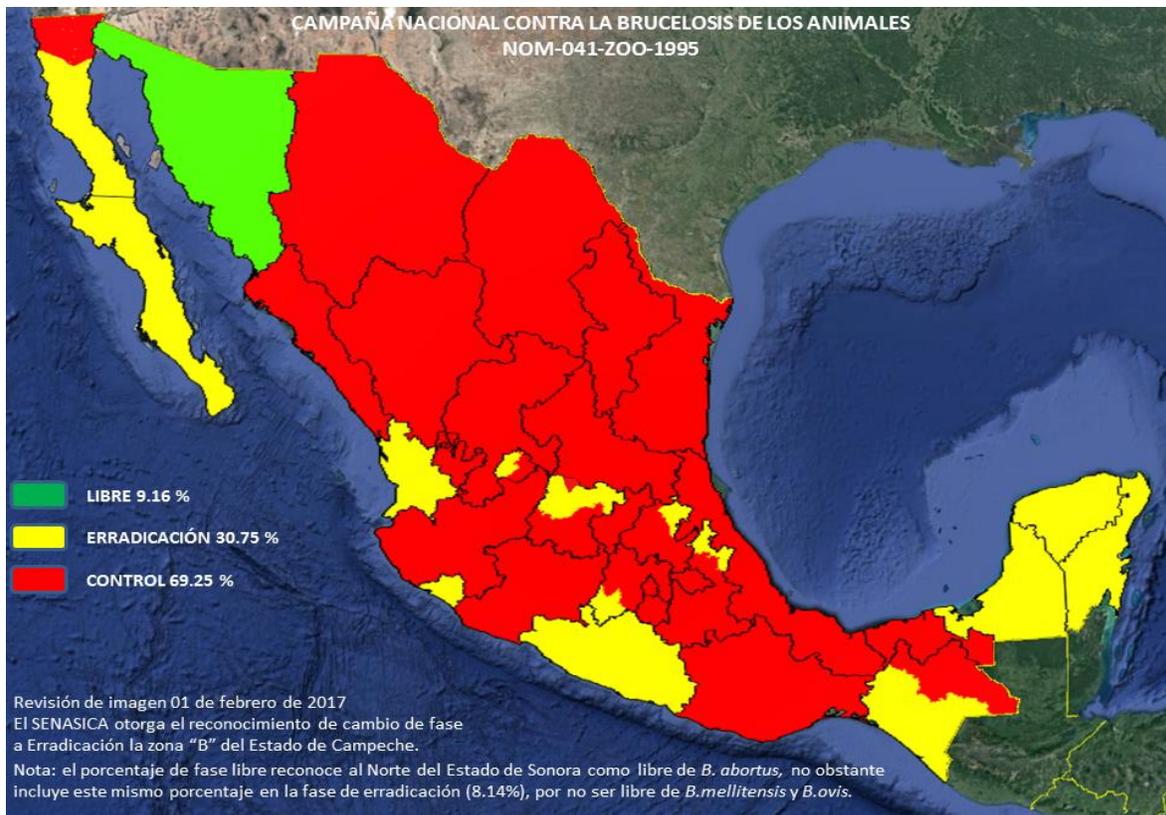


Figura 7. Mapa de la situación epidemiológica de la brucelosis en animales (SAGARPA, 2017).

6.8 Diagnóstico.

Actualmente en algunos estados de la república mexicana se realiza el diagnóstico de enfermedades que son la principal causa de abortos en los rumiantes entre ellos el búfalo de agua. El resultado de estos estudios muestra que hasta la fecha se han encontrado anticuerpos contra ciertas bacterias las cuales su infección en el hospedero produce un cuadro clínico cuyo único signo visible es el aborto, lo que quiere decir que los agentes infecciosos que originan este tipo de enfermedades están o en algún momento han estado presentes en los hatos bufalinos puesto que

no se trata de anticuerpos generados por vacunas, esto es debido a que en el búfalo de agua no se inyecta contra alguna de estas enfermedades causantes de fallas en la reproducción, esto implica que desde una cuarta parte y hasta un poco más de la mitad de estas poblaciones han estado en contacto con los agentes causales de tales afecciones (Domínguez *et al.*, 2013).

Por otro lado, las pruebas serológicas están prescritas por un tratado internacional de acuerdo con la OIE, tales pruebas como: Prueba de ELISA indirecta, ELISA Competitiva, Prueba de antígenos buferados de *Brucella* (Prueba de Rosa de Bengala y prueba de aglutinación de placa buferada), Prueba de Fijación del Complemento y Ensayo de Polarización de Fluorescencia. Actualmente, el esquema de diagnóstico para la Brucelosis en México, se basa en técnicas de laboratorio tales como aislamiento bacteriano poco utilizado, y pruebas serológicas las cuales determinan la presencia de anticuerpos mediante pruebas de aglutinación (Mejía y Lemus, 2012); en sangre, leche, suero lácteo, flujo vaginal y plasma seminal (Tizard, 2009).

Las hembras que adquieren la infección pueden presentar serorreacción de seis semanas a seis meses después del contagio (SINAVE, 2013). Para el diagnóstico de Brucelosis bovina la respuesta inmune de tipo celular es la más importante; sin embargo, el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos serológicos a partir de las respectivas muestras (Aguilar *et al.*, 2011).

Así mismo como en toda infección durante el desarrollo de la enfermedad se forman anticuerpos cuya presencia es detectable mediante pruebas serológicas *in vitro*, dichos anticuerpos están ligados a fracciones séricas las cuales son las inmunoglobulinas. Los anticuerpos están principalmente dirigidos contra la fracción

O de la cadena de lipopolisacárido la cual es una estructura característica de las cepas lisas de esta bacteria (Cantú *et al.*, 2007).

En el diagnóstico de la enfermedad una de las estructuras de la membrana externa de *Brucella* es determinante para realizar una correcta interpretación de los resultados, tal estructura es el Lipopolisacárido (LPS) el cual es el principal determinante antigénico que despierta la respuesta inmune humoral, ya sea por medio de la vacunación, o por la infección natural de los animales a las cepas de campo, de manera que por estas mismas razones juega un papel muy importante en el diagnóstico de la enfermedad (SAGARPA, 2009).

Para realizar una correcta interpretación en el diagnóstico de brucelosis resulta de gran interés conocer la evolución de las inmunoglobulinas así mismo es de gran importancia diferenciar este proceso en la infección y en la vacunación, en ambas primero aparecen las IgM y luego las IgG, la diferencia es que en la infección las IgG tienden a incrementarse y a persistir. En terneras vacunadas entre los 3 y 8 meses de edad, las IgG tienden a desaparecer alrededor de los 6 meses después de la vacunación con la cepa 19; por lo general, las IgM pueden diferenciar reacciones heteroespecíficas, originadas por bacterias que tienen antígenos de superficie comunes con bacterias de género *Brucella* (Tizard, 2009).

Poco después de la infección aparecen las aglutininas IgM y en dos semanas alcanzan su nivel máximo, los anticuerpos IgG subsiguientes alcanzan su nivel máximo transcurrido de uno a dos meses y llegan a ser los principales anticuerpos detectables en las pruebas diagnósticas en infecciones crónicas. Actualmente se dispone de procedimientos serológicos utilizados en el diagnóstico de dicha patogenicidad algunos de ellos se basan en pruebas serológicas como lo son las

pruebas de tarjeta o rosa de bengala, rivanol, fijación del complemento y ELISA indirecto y competitivo (Martínez *et al.*, 2011).

6.8.1 Prueba de tarjeta o Rosa de Bengala.

Es una prueba sencilla y rápida que es empleada como prueba de detección inicial clasifica animales positivos y negativos. Consiste en hacer reaccionar el suero del paciente con el antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 una concentración del 8% para el diagnóstico en bovinos (Aguilar *et al.*, 2011). Esta prueba es un método de aglutinación rápida en placa, cualitativa con una sensibilidad de 95.2% y una especificidad del 98.5%. En esta prueba diagnóstica se detecta la presencia de anticuerpos circulantes de IgG, IgA e IgM de origen vacunal o de infecciones naturales, se basa en la inhibición-inactivación de algunas aglutininas inespecíficas a pH bajo. Para esta prueba se utiliza antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 inactivada teñida y concentrada al 8% con rosa de bengala con pH de 3.6 (NOM-041-ZOO-1995).

Es una de las pruebas diagnósticas comúnmente utilizadas para el caso de muestras de suero sanguíneo ya que detecta anticuerpos IgG1 e IgM contra cepas lisas de *Brucella*, puede ser realizada como prueba tamiz además tiene la ventaja de ser un procedimiento cualitativo y rápido (Mejia *et al.*, 2012).

El resultado es interpretado como positivo o negativo basándose en la ausencia o presencia de aglutinación debida a la reacción antígeno-anticuerpo del suero (Getachew *et al.*, 2016). Sin embargo, existe el riesgo de dar resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con bacterias como *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinias*

y *Pseudomonas*, por lo que es conveniente utilizarla solo como prueba de tamiz y realizar las respectivas pruebas confirmatorias (Aguilar *et al.*, 2011).

6.8.2 Prueba de Precipitación de Rivanol

Funciona como una prueba complementaria y confirmatoria, ya que tiene una mayor especificidad, pero menor sensibilidad, lo cual permite diferenciar los animales infectados naturalmente de aquellos que han sido vacunados, que se pueden confundir con falsos positivos (González, 2015).

Detecta anticuerpos específicos IgG y otras macroglobulinas contra cepas lisas de *Brucella*, su realización se sugiere para efectos de campaña, en sueros de bovinos que previamente resultaron positivos a la prueba de tarjeta, por lo que se considera una prueba complementaria (Mejia *et al.*, 2012).

Se trata de una prueba diagnóstica del tipo cuantitativa y cualitativa, la cual consiste en mezclar el suero sospechoso con un colorante de acridina el cual precipita las inmunoglobulinas de la muestra principalmente las IgM, quedando en solución solo las IgG, las cuales son las directamente involucradas con la respuesta inmune ante una infección de *Brucella* (Aguilar *et al.*, 2011). Se le adiciona una sustancia (lactato) Rivanol, además del antígeno en concentración del 4% de *B. abortus* cepa 1119-3 inactivada teñida con una mezcla verde brillante y cristal violeta, con pH de 5.8 a 6.2 para que precipiten los anticuerpos IgM y el sobrenadante de esto contendrá a los anticuerpos IgG que serán aglutinados con antígenos en la prueba, reaccionando solo aquellos sueros con anticuerpos de infección (González, 2015).

Se consideran positivos a todos aquellos sueros de animales no vacunados que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de las diluciones, en el

caso del ganado vacunado, la aglutinación completa en una dilución mayor o igual a 1/50 se considera una prueba positiva (NOM-041-ZOO-1995).

6.8.3 Prueba de Fijación de Complemento.

La prueba de fijación de complemento ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico confirmatorio de la brucelosis bovina debido a su gran sensibilidad y especificidad ya que es capaz de detectar el isotipo IgG1, por esta razón resulta más precisa comparativamente con otras técnicas serológicas y el diagnóstico bacteriológico. Determina títulos de anticuerpos fijadores del complemento contra cepas lisas de *Brucella* spp. Esta prueba sirve como prueba confirmatoria en sueros de bovinos, caprinos, ovinos u otras especies, es la técnica de referencia internacional. La OIE sugiere su uso, así como ELISA (por sus siglas en inglés, Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) por considerarlas pruebas sensibles y específicas (Mejía *et al.*, 2012).

Se basa en la activación del complemento por la vía clásica en donde es necesaria la presencia de una unión antígeno anticuerpo para iniciar la reacción (fase invisible). Cuando existen anticuerpos contra *Brucella*, se da la reacción antígeno anticuerpo y el complemento se une a esta reacción (Ag-Ac-C'), siendo incapaz de unirse al sistema hemolítico, que es un segundo sistema antígeno anticuerpo (fase visible), observándose una sedimentación de los glóbulos rojos con anticuerpos o hemolisina. En ausencia de anticuerpos contra *Brucella* en el primer sistema durante la fase invisible, el complemento queda libre, uniéndose al segundo sistema antígeno anticuerpo o sistema hemolítico observándose una hemólisis (NOM-041-ZOO-1995).

6.8.4 Prueba de ELISA.

A grandes rasgos la prueba de ELISA consiste en que un anticuerpo se une a un antígeno y forma un complejo antígeno-anticuerpo y por medio de un conjugado formado por IgG y una enzima peroxidasa como medio para detectar una reacción entre el anticuerpo y el antígeno, en esta prueba diagnóstica existen dos tipos de procedimientos los cuales son ELISA indirecto y ELISA competitiva. El ELISA de tipo indirecto tiene como antígeno el LPS liso de *B. abortus* cepa S1119-3 o S99 y un anticuerpo monoclonal específico para la cadena pesada de la IgG1 bovino marcado con peroxidasa como conjugado. A pesar de que el ELISA indirecto posee una elevada sensibilidad no es capaz de diferenciar los anticuerpos resultantes de la vacunación con *B. abortus* cepa 19 de los inducidos por la infección con la cepa de campo (Ortiz *et al.*, 2007).

Sugiriendo la utilización del ELISA indirecto como prueba tamiz de elevada sensibilidad con respecto a Rosa de Bengala y del ELISA competitivo con respecto a la prueba Fijación del Complemento como prueba confirmatoria y diferencial del estatus de infección o vacunación de los animales reactores positivos en la prueba indirecta (Mejía *et al.*, 2012).

La técnica de ELISA competitivo se emplea como prueba confirmatoria en el diagnóstico de la brucelosis debido a que este inmuno ensayo presenta mayor especificidad que el ELISA indirecto y es capaz de eliminar la mayoría de las reacciones debidas a los anticuerpos residuales producidos en respuesta a la vacunación con *B. abortus* cepa 19, ya que en el ELISA competitivo el antígeno que se emplea es el LPS liso de *B. abortus* cepa S1119-3 y el anticuerpo monoclonal M 84 como conjugado (Ortiz *et al.*, 2007).

6.8.5 Prueba PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica diagnóstica que tiene como características principales un alto grado de especificidad y sensibilidad, la cual ha facilitado el desarrollo diagnóstico de detección basado en ácidos nucleicos para identificar bacterias, virus y parásitos de importancia médica. Actualmente, la PCR es poco empleada como herramienta diagnóstica a nivel de campo a pesar de su reconocida ventaja sobre la prueba oficial rosa de bengala y a sabiendas de su utilidad en fase inicial de la enfermedad donde las pruebas serológicas son poco confiables (Bolívar, 2013).

6.9 Vacunación.

La vacunación es la medida más efectiva para reducir la prevalencia de brucelosis y asimismo ha contribuido de una manera excelente al éxito de varios programas de control en el mundo, hoy en día los esfuerzos para la erradicación de la enfermedad se concentran en la extensiva evaluación de la respuesta inmune adquirida e inducida por la vacunación con la finalidad de demostrar cuales son los mecanismos involucrados en la respuesta a la vacunación (Rivera *et al.*, 2016).

De tal modo que la vacunación es un elemento que va estrechamente ligado y que influye de una forma importante en la detección diagnóstica de la enfermedad en las pruebas serológicas ya que dentro de la inmunización provocada por las vacunas existen diferencias, principalmente relacionadas con la edad del animal en el momento de la vacunación. La norma oficial mexicana (NOM-041-ZOO-1995) para la campaña contra la brucelosis animal, señala que pueden usarse las vacunas S19 y RB51 en sus dosis normal y reducida como vacunas para prevenir la

brucelosis bovina. Hasta antes de 1998 la inmunización del ganado bovino en México se realizaba con la cepa S19 de *B. abortus* utilizando de una manera eficiente la dosis reducida en hembras adultas, la cual induce inmunización efectiva al ganado y no ocasionando abortos en más de 1 % de los animales vacunados (Cantú *et al.*, 2007). La desventaja de esta vacuna es que induce presencia de anticuerpos en el suero y en la leche los cuales interfieren en el diagnóstico al presentar resultados falsos positivos en las pruebas rutinarias (Cantú *et al.*, 2007). En la brucelosis se producen 4 tipos de inmunoglobulinas las cuales son, la IgM, IgG1, IgG2, y la IgA. En el caso de los animales vacunados con la vacuna de cepa 19 de *B. abortus* las primeras inmunoglobulinas que suelen aparecer son las IgM las cuales aparecen entre los 4 y 6 días postvacunación alcanzando así esta inmunoglobulina sus títulos máximos entre los 13 y 16 días, posteriormente la concentración de IgM tiende a disminuir, pero sin desaparecer durante varios meses o años. Seguida de las IgM aparecen posteriormente las IgG entre los cinco y diez días después de la vacunación y alcanzan los títulos máximos de concentración entre los 28 y 42 días, sus títulos son más bajos que los de las IgM y descienden rápidamente y tienden a desaparecer en animales jóvenes (Ortiz *et al.*, 2007). Cuando un animal está infectado los dos tipos de inmunoglobulinas aparecen de forma simultánea; sin embargo, los primeros en desaparecer son las IgM mientras que las IgG alcanzan niveles más altos y aunque tienden a disminuir, persisten durante la infección. En las infecciones crónicas predominan las IgG2 (Ortiz *et al.*, 2007).

La vacuna RB51 es una vacuna altamente atenuada y estable obtenida a partir de la cepa virulenta 2308, la cual es una mutante rugosa y al tener incompleta la cadena

O evita la seroconversión otorgando así una inmunización efectiva contra brucelosis y al mismo tiempo evita los riesgos inconvenientes de otras cepas vacunales. El uso de la vacuna RB51 ha desplazado casi por completo a la S19 del mercado nacional, el criterio oficial es que si una vaca inmunizada con RB51 da resultados positivos a las pruebas serológicas convencionales se le considera infectada (Cantú *et al.*, 2007).

En el búfalo de agua cuando se realiza la vacunación de hembras gestantes con RB51 los terneros nacidos no presentan seroconversión, las hembras tampoco presentan abortos y es nula la posibilidad de que presenten infecciones persistentes. De igual manera cuando se realiza la revacunación con la misma vacuna no cambia el estado serológico convencional mostrando así que múltiples vacunaciones de adultos normales y hembras preñadas pueden llevarse a cabo, aumentando la inmunidad sin afectar el estado serológico (Rivera *et al.*, 2016).

6.10. Inmunidad ante *Brucella*

En la modulación de la respuesta inmunitaria las citocinas juegan un papel muy importante, ya que los patógenos pueden inducir una respuesta mediada por células Th1 o una respuesta humoral, actualmente denominada Th2, así ambos tipos de células se caracterizan por presentar diferente secreción de interleucinas. Por ejemplo, las células Th1 se caracterizan por la producción de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12. Mientras que Th2 secreta IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Prácticamente la citocina que representa la respuesta Th1 es el IFN γ , mientras que la respuesta Th2 está caracterizada por la producción de IL-4 (Rivera *et al.*, 2016).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Localización. En el presente estudio se incluyeron cuatro unidades de producción (UP) de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), las primeras dos ubicadas en el municipio de Sayula, Veracruz perteneciente a la zona sur del Estado, la región cuenta con clima subhúmedo con lluvias en verano (100%) y con una temperatura que oscila entre los 24 y 28 °C, la precipitación pluvial anual es de 1500 mm. Las dos unidades restantes localizadas en la región centro del Estado de Tabasco, que se localiza entre los paralelos 18°20' latitud norte y 17°43'al sur; el clima predominante en la región es cálido húmedo-seco con lluvias durante el verano y con una precipitación anual de 1900 mm.

7.2 Toma y procesamiento de muestras. Se colectaron un total de 214 muestras sanguíneas de búfalos de agua denominadas Veracruz 1 (n=58) y Veracruz 2 (n=61); Tabasco 1 (n=49) y Tabasco 2 (n=46). La toma de muestras se realizó a partir de la punción de la vena yugular y/o caudal utilizando el sistema vacutainer con alto vacío, empleando tubos sin anticoagulante, lo que facilitó la obtención del suero. El total de las muestras colectadas se almacenaron a 4 °C y se transportaron para su análisis al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET, INIFAP) en Jiutepec, Morelos, donde se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento.

7.3 Diseño experimental. En el presente trabajo se desarrolló un estudio de prevalencia transversal con la selección de unidades de producción y tamaño de muestra por conveniencia.

7.4 Prueba de ELISA (indirecta). Se utilizó un Kit comercial para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* (CHEKIT Brucellose-serum de Laboratorios IDEXX®) el cual es un inmunoanálisis enzimático para la detección de anticuerpos frente a *Brucella abortus* en suero de bovinos (en este caso se empleó para búfalos). Cada muestra se analizó por duplicado (Ver anexo 1).

7.5 Interpretación de la prueba.

Para la validación de la placa, la densidad óptica del control positivo no debió ser superior a 2.00 y la densidad óptica del negativo no excedió de 0.50. La diferencia de la densidad óptica entre los controles positivo y negativo debió ser ≥ 0.30 . Las placas fueron leídas dentro de un periodo máximo de 2 horas después de la adición de la solución de frenado de la reacción.

Se obtuvo el valor medio de la densidad óptica de las muestras duplicadas. La densidad óptica del control positivo (DO pos) así como la densidad óptica de las muestras (DO muestra) se corrigió restando el valor de la densidad óptica del control negativo (DO neg).

Control positivo:

Muestra:

OD pos – OD neg

OD muestra – OD neg

El valor de cada muestra se calculó con relación al control negativo y positivo con la siguiente fórmula:

Valor de la muestra (%)= $(OD \text{ muestra}-OD \text{ neg}) / (OD \text{ pos}-OD \text{ neg}) \times 100$

Interpretación de la muestra individual

Valor: < 80% es NEGATIVO y $\geq 80\%$ POSITIVO

7.6 Análisis estadístico y epidemiológico. La prevalencia fue estimada utilizando la fórmula:

$$P = \frac{np}{T} * 100$$

Donde:

P= prevalencia

np= número de sueros positivos

T= total de sueros analizados

Se estimó la prevalencia por unidad de producción, por sexo y edad (adultos y bucerros); por unidades de producción en cada estado (Veracruz y Tabasco) y la prevalencia general de los animales bajo estudio.

VIII. RESULTADOS

Se examinaron un total de 214 muestras de suero sanguíneo de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) de las razas Murrah y Mediterránea cuyo propósito es el pie de cría con mantenimiento en pastoreo, así como la producción de carne; las cuatro unidades de producción se localizaron en el trópico mexicano ubicadas dos de ellas en el estado de Tabasco y las otras dos en el estado de Veracruz (Figuras 8 y 9).



Figuras 8 y 9. Toma de muestra sanguínea en la Unidad de Producción Veracruz 2 (Fotografías tomadas por el MVZ José Juan Lira Amaya).

La población de animales muestreados se presenta en el siguiente cuadro (Cuadro 4). En la que se estimó una prevalencia general de 17.75% (38/214).

Cuadro 4. Distribución de la población muestreada en las cuatro unidades de producción.

Tipo de animal	Unidad de producción			
	Veracruz 1	Veracruz 2	Tabasco 1	Tabasco 2
Hembras adultas	51	52	49	46
Sementales	0	1	0	0
Becerras (hembras y machos)	7	8	0	0
Total	58	61	49	46

Mediante la realización de la prueba de ELISA con un kit comercial (CHEKIT-Brucellose-Serum de IDEXX Laboratories®) se logró determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en búfalos de agua de las unidades de producción antes mencionadas. De acuerdo a las especificaciones de la prueba se realizó la lectura con el espectrofotómetro o “lector de ELISA” utilizando un filtro de 450 nanómetros (nm) (Ver Anexo 2). Cada una de las muestras obtenidas de los búfalos fue analizada por duplicado lo que permitió disminuir el sesgo por algún error durante el procesamiento; para realizar los cálculos correspondientes se utilizó el promedio de las dos lecturas (Figuras 10 y 11).



Figuras 10 y 11. Realización de la prueba de ELISA.

Para determinar si el resultado de la prueba es negativo o positivo, al valor promedio (de la muestra) se le resta el valor del control negativo y esto se divide entre la diferencia del valor del control positivo menos el valor del control negativo, finalmente se multiplica por 100. Para interpretar el resultado, los valores menores a 80% son negativos y los mayores a 80% son positivos (Ver Anexo 2), (Figura 12).



Figura 12. Lectura de resultados en el espectrofotómetro con filtro de 450 nm.

En las cuatro unidades de producción se encontraron de animales cuyo suero sanguíneo resulto ser positivo a la detección de anticuerpos de *Brucella abortus*; sin embargo, las prevalencias obtenidas por unidad de producción fueron diferentes en la unidad de producción Veracruz 2 se estimó la prevalencia más alta con 31.14 % de los animales; seguida de Tabasco 1 con 22.45 %, Tabasco 2 con 8.69% y finalmente la unidad de producción Veracruz 1 con el valor más bajo de las cuatro unidades de producción con 6.89%.

Al realizar un análisis más detallado de acuerdo al tipo de animal dentro de cada unidad de producción se determinó que en las unidades de producción del Estado de Veracruz, se tuvo la posibilidad de hacer un muestreo de toda la población donde se incluyeron las hembras que son empleadas como pie de cría, un semental y algunas de las crías (buceros) aunque para ambas unidades de producción no se

consideró si eran hembras o machos; por su parte, en las unidades de producción del Estado de Tabasco solo se permitió realizar el muestreo en las hembras del pie de cría. Los resultados de los animales seropositivos se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Determinación de prevalencia a Brucelosis en búfalos de agua en unidades de producción de Veracruz y Tabasco.

	Unidad de producción			
	Veracruz 1	Veracruz 2	Tabasco 1	Tabasco 2
	Prevalencia (%)			
Hembras adultas	7.84 (4/51)	34.61 (18/52)	22.45 (11/49)	8.69 (4/46)
Sementales	0 (0/0)	0 (0/1)	0 (0/0)	0 (0/0)
Buceros (hembras y machos)	0 (0/7)	12.5 (1/8)	0 (0/0)	0 (0/0)
Subtotal	6.89 (4/58)	31.14 (19/61)	22.45 (11/49)	8.69 (4/46)
Promedio por Estado	19.33 (23/119)		15.78 (15/95)	
Prevalencia general	17.75 (38/214)			

Es importante resaltar que este tipo de prueba (ELISA) puede considerarse de escrutinio, pues ofrece un panorama general de la situación epidemiológica de la población bajo estudio frente a un agente etiológico, en este caso *Brucella abortus*, y debe interpretarse que los animales seropositivos en algún momento han estado en contacto con dicho agente y no necesariamente se encuentran enfermos al momento de realizar el muestreo. Para el caso de las cuatro unidades de producción se tiene como antecedente que no se realizan actividades de medicina preventiva como por ejemplo la vacunación y para el caso de las cuatro unidades de producción es importante considerar que existe la convivencia dentro de las mismas con ganado bovino.

IX. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio indican una prevalencia significativa a brucelosis de un 17.75 % en búfalos de agua de los estados de Veracruz y Tabasco; por lo que, la hipótesis propuesta se desecha debido a que supera la expectativa planteada que era de una prevalencia no mayor al 3% que es lo reportado para bovinos en la campaña nacional para dichos Estados.

Estos resultados permiten pensar que la presencia de ciertas infecciones por microorganismos de carácter zoonótico como es el caso de brucelosis, están presentes en poblaciones bufalinas; y que pudiese ser atribuido a infecciones naturales puesto que en el caso del búfalo de agua las medidas de control sanitario no han tenido gran difusión como es el caso con otras especies por ejemplo con el ganado bovino cuyas medidas de sanidad para la brucelosis se encuentran reguladas por la NOM-041-ZOO-1995. A pesar de que la prueba de ELISA empleada en este estudio identifica inmunoglobulinas de tipo IgG, al ser una prueba no considerada dentro de las aprobadas para la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis, se requiere de realizar pruebas para la confirmación de que los anticuerpos detectados no son producidos por la vacunación en caso dado que se haya realizado, o bien incluso realizar la toma de muestras como por ejemplo hisopados vaginales en las búfalas que resultaron seropositivas para tratar de realizar el aislamiento de *Brucella abortus* como lo realizado por Dos Santos *et al.* (2017); o bien pruebas de diagnóstico directo como la PCR; no obstante, esto no se hizo porque no consideró en los objetivos de este trabajo.

La identificación de anticuerpos específicos a *Brucella abortus* y el hecho que no existan antecedentes de vacunación hacen pensar en la posibilidad de la infección natural, como se había mencionado con anterioridad esto representa un riesgo para la diseminación e infección de esta enfermedad abortiva hacia el ganado bovino de esta región y de forma secundaria la distribución hacia otras regiones del país, ya que los animales enfermos son la principal fuente de diseminación de la enfermedad, lo cual tendría como consecuencia grandes pérdidas económicas en la industria ganadera debido a los daños que la enfermedad implica y así mismo un grave riesgo para la salud pública al tratarse de una enfermedad de carácter zoonótico (Guzmán *et al.*, 2016).

De tal forma, la convivencia del búfalo de agua con el ganado bovino puede traer consigo riesgos de transmisión de ciertos agentes infecciosos que producen enfermedades que afecten el desarrollo en la industria pecuaria y la salud pública, como es el caso de la brucelosis. En un estudio realizado en Argentina en el año 2006, fueron analizadas 125 muestras de suero sanguíneo de búfalos de agua de cuatro distintas unidades de producción, en las que se realizó el muestreo de la siguiente forma: UP1 17 muestras, UP2 20, UP3 45 y UP4 43 muestras, las cuales fueron analizadas con las pruebas serológicas de Antígeno Buferado en Placa (Prueba de aglutinación en placa), Seroaglutinación en Tubo (Prueba de aglutinación en tubo) y 2-Mercaptoetanol como prueba confirmatoria, una vez procesadas las muestras y desechados los que resultaron falsos positivos se obtuvo el resultado final con una prevalencia del 4.8% de seropositividad, cabe señalar que en los resultados encontrados existieron diferencias en las distintas unidades de

producción las cuales pueden deberse a que se realizan distintos manejos en cuestión sanitaria es decir vacunación en hembras de entre tres y ocho meses de edad y diagnóstico serológico con segregación de positivos, estas diferencias se deben a que la integración del búfalo de agua en las unidades de producción así como en las actividades sanitarias ha sido un cambio relativamente nuevo a diferencia del manejo de ganado vacuno por lo que queda a disposición del productor las medidas sanitarias que decida tomar en su unidad de producción, tales hechos indican la presencia del agente infeccioso productor de la brucelosis en los búfalos de agua los cuales muestran cierta resistencia al no presentar signos clínicos como lo es el aborto de las hembras gestantes (Martínez *et al.*, 2006). El mismo año que se realizó este estudio, la prevalencia de la brucelosis bovina en Argentina fue del 2.15%, esto comparado con los resultados obtenidos los cuales muestran una mayor seropositividad en búfalos de agua, lo que podría significar que los búfalos realmente representarían un riesgo de contagio para sus cohabitantes bovinos (SENASA, 2006).

En otro estudio realizado en una unidad de producción bufalina lechera en Venezuela en el 2015, se determinó la presencia de brucelosis en esta especie animal, dicho estudio consistió en muestrear a 80 animales cuyos animales tuvieron antecedentes de vacunación con la vacuna RB51, los sueros sanguíneos fueron analizados con la prueba de Rosa de Bengala como prueba tamiz la cual determino una seropositividad del 51.25% (41/80) animales reactivos. No obstante, los resultados de seropositividad fueron de 8.75% (7/80) con las pruebas confirmatorias de 2-Mercaptoetanol y del 6.25% (5/80) con la prueba de Fluorescencia polarizada

(Rosales *et al.*, 2015). Por lo anterior y teniendo el antecedente que no se realiza la vacunación en ninguna de las unidades de producción estudiadas, sería recomendable realizar otras pruebas confirmatorias para esclarecer si los anticuerpos detectados en este estudio son debidos al contacto con el agente.

Los resultados encontrados en este trabajo para la prevalencia general (17.75%) son de cierta forma parecidos con los reportados en un estudio realizado en el Estado de Veracruz en el año 2011, en donde fueron estudiadas tres unidades de producción de búfalos de agua, con un total de 565 animales muestreados, las muestras fueron procesadas con la prueba de rosa de bengala y se determinó un 13% de seropositividad de manera general en donde en las tres unidades de producción presentaron animales positivos, a los que posteriormente se les realizó la prueba de rivanol con carácter confirmatorio y se demostró una prevalencia final del 7% de animales positivos (Suazo, 2011). Sin embargo, si se realiza una comparación entre las unidades de producción del Estado de Veracruz, los resultados encontrados en esta investigación (31.14 y 6.89 %) divergen por mucho lo reportado en el trabajo mencionado con anterioridad (13 %).

Con estos resultados se puede inferir la presencia de esta enfermedad en esta especie animal y sobre todo en esta región de la república mexicana, lo cual afirma la teoría planteada sobre la existencia de la enfermedad de brucelosis en el búfalo de agua y sobre todo el riesgo que se plantea al ser el microorganismo infectante el mismo que afecta a la especie bovina, así como a la especie bufalina.

En otro estudio realizado en el año 2010 en el municipio de Lorica, en Colombia, en donde se analizaron 133 muestras de búfalos pertenecientes a tres de las

principales unidades de producción bufalina de dicho municipio, se estimó una prevalencia del 12.03% a brucelosis por medio de la prueba de rosa de bengala, los reactores positivos fueron confirmados con la prueba de ELISA Competitiva la cual confirmó una prevalencia total del 3% (Calderón *et al.*, 2010); por lo que es importante, realizar en las muestras de este estudio alguna prueba confirmatoria como la prueba de rivanol y determinar si los anticuerpos que se detectaron son debidos a anticuerpos vacúnales o bien a que los animales se infectaron de manera natural.

En otra investigación realizada en Maranhao, Brasil donde el objetivo fue diagnosticar *Brucella* spp. Mediante pruebas serológicas, el aislamiento bacteriano y el análisis molecular; en 390 muestras de suero de búfalo a través de pruebas serológicas como la prueba en placa de rosa de bengala y 2-mercaptoetanol como prueba confirmatoria, se determinó mediante esta última que 16 animales eran positivos; a los que posteriormente, se les tomaron muestras con hisopos vaginales aislando de tres de ellos colonias bacterianas con las características de *Brucella* spp. y que fueron confirmados mediante la prueba de PCR. Estos resultados confirmaron la infección de *Brucella* spp. (Dos Santos *et al.*, 2017).

Analizando los resultados de seropositividad de esta enfermedad en la especie bufalina en las investigaciones señaladas anteriormente en Latinoamérica, así como en el trópico mexicano y comparándolos con el presente trabajo se determina una alta prevalencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* encontrada en las unidades de producción muestreadas, la prevalencia fue considerable al comparar las prevalencias reportadas en otros trabajos.

Estos datos, como se ha mencionado anteriormente demuestran que la enfermedad se encuentra presente en el ganado bufalino del trópico mexicano así como en el de algunos países de Latinoamérica en donde a pesar que la difusión de esta especie como especie multipropósito (leche, carne, trabajo) ha tenido una gran relevancia, han sido pocas las investigaciones que determinen el estado sanitario de esta especie y a su vez las medidas sanitarias de control y erradicación de la enfermedad deben ser más difundidas para lograr una mayor certeza en el momento del diagnóstico.

De tal forma que los esfuerzos realizados para el control y erradicación de la enfermedad no dependen únicamente de los factores involucrados en contacto directo con el entorno ganadero sino a su vez depende de los programas y campañas realizadas por las dependencias correspondientes, para que los esfuerzos realizados tengan efectividad y las determinadas medidas que se tomen sean efectuadas de manera correcta, puesto que algunas medidas que en determinado momento se llegan a tomar pueden ser realizadas de manera incorrecta o inclusive se realizan sin estudios previos que en cierto modo garanticen la eficacia de estas acciones.

En un estudio realizado en Trinidad y Tobago se demostró que la vacuna RB51 no protege adecuadamente ante la infección de brucelosis en el búfalo de agua diferencia contrastante con el ganado bovino, esto puede deberse a que el búfalo de agua presenta mayor resistencia ante infecciones naturales de *Brucella* estos datos demuestran que es importante implementar medidas de control sanitarias adecuadas (Fosgate *et al.*, 2011).

Debido a que en la región en donde se encuentran los estados de Tabasco y Veracruz se encuentra en situación de control tal como lo menciona el SENASICA en el año 2017, se estimaba que los resultados positivos se encontrarían en un margen no mayor al 3%; sin embargo, es importante mencionar que debido a que el búfalo de agua es una especie la cual presenta una escasa seguridad y vigilancia epidemiológica en torno a las enfermedades que esta pueda presentar, puede existir la posibilidad de que en el momento de analizar las muestras de suero sanguíneo algún animal pueda presentar un resultado positivo, con presencia de anticuerpos ante la infección causada por *Brucella abortus*; sin embargo, esta situación no es del todo inesperada ya que como se ha mencionado anteriormente la escasa atención a las patologías transmisibles que esta especie puede portar y transmitir a las otras especies de producción zootécnico es un gran riesgo potencial.

Otro de los aspectos que se debe de considerar para el análisis de estos resultados al obtener muestras positivas ante la detección de anticuerpos a *Brucella* es que dichos anticuerpos tienen una escasa probabilidad de ser originados o causados por una inducción inmunológica proveniente de vacunación, es importante tener en cuenta esta observación ya que en posibles estudios futuros y teniendo en cuenta esta teoría puede ser posible que se disminuya en cierto grado la posibilidad de obtener falsos positivos.

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que en el trópico mexicano en particular las regiones de Tabasco y Veracruz se enfatice más en el control y la vigilancia de ciertas enfermedades contagiosas que producen aborto y en particular aquellas que son de carácter zoonótico puesto que la transmisión de estas

enfermedades hacia el ser humano se transforma en un problema de salud pública de magnitudes enormes, sobre todo en las unidades de producción en las cuales se encuentren en proceso de introducción de nuevas especies animales con fines zotécnicos, en las cuales no son llevadas a cabo las medidas zoosanitarias convencionales como los son pruebas diagnósticas, vacunación y desecho de animales positivos a ciertos agentes infecciosos como lo son la brucelosis tal como lo marca la NOM-041-ZOO-1995, las cuales se encuentren en convivencia en el mismo entorno con otras especies zotécnicas convencionales

Así mismo comenzar con una vigilancia adecuada en esta especie animal similar a las acciones realizadas dentro de la campaña nacional contra la brucelosis bovina la cual ha tenido resultados favorables ya que otros factores de riesgo que pueden tener influencia en la propagación de la enfermedad son el intercambio o préstamo de sementales, la compra de vientres y pie de cría, movilización de ganado, así como también los productos obtenidos de esta especie.

La brucelosis es una enfermedad ampliamente estudiada en el mundo debido a la importancia, al riesgo y la gravedad que esta representa como una enfermedad de carácter zoonótico, de igual manera por las pérdidas económicas que esta genera en el ámbito de la producción pecuaria y por las restricciones que origina en el mercado internacional. Así mismo en particular caso esta enfermedad representa un gran riesgo en el área de producción bovina debido a la reciente inclusión del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) en las unidades de producción como un animal productivo el cual ha demostrado una excelente capacidad de adaptación; sin embargo, esta condición propia de los búfalos de agua no representa ausencia total

de ciertas enfermedades que afecten al mismo tiempo a bovinos y a otras especies incluyendo al ser humano, de esta forma por el riesgo que este representa como fuente de contagio, diseminación e incubación de la enfermedad debido a la convivencia con los bovinos en las mismas unidades de producción.

Como se mencionó anteriormente el riesgo que esto implica no solo se centraliza en el aspecto productivo ni en el aspecto zoonosario ya que al tratarse de una enfermedad de carácter zoonótico implica un grave riesgo para el sector social y la salud humana.

X. CONCLUSIONES

Se identificaron anticuerpos específicos contra *Brucella abortus* en búfalos de agua de los Estados de Veracruz y Tabasco mediante el uso de una prueba comercial de ELISA estimando una prevalencia del 17.75% de los animales muestreados, lo que permite tener conocimiento de la situación seroepidemiológica para dicha especie en el trópico mexicano.

La brucelosis es una enfermedad difícil de erradicar; sin embargo, aplicando la tecnología disponible para prevenir y diagnosticar la enfermedad, eliminando los animales reactivos positivos, se puede llegar a erradicar siguiendo los pasos de los programas oficiales establecidos en el país como la campaña oficial contra la brucelosis bovina.

Sin embargo, se requiere de más estudios acerca de la enfermedad y de las enfermedades que causan abortos sobre todo en aquellas especies animales que son de nueva inclusión en el ámbito zootécnico, de igual forma es importante generar información que permita conocer la prevalencia como lo realizado en este estudio en los estados de Tabasco y Veracruz.

Es posible emplear la prueba de ELISA para estudios de escrutinio en los que se desea conocer el estado epidemiológico de la Brucelosis, es una prueba que tiene mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica y que puede ser competitiva referente al costo de la prueba en comparación con pruebas oficiales; sin embargo,

presenta como desventaja el requerir de equipo especializado (espectrofotómetro) para realizar la lectura.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar R. F. (2011) *Prevención de Brucelosis en rumiantes*, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Coyoacán México, INIFAP 7-9
- Almaguer P.Y. (2007) *El búfalo, una opción en la ganadería*. Universidad de Granma. Cuba. *REDVET* 8 (8) 1-20
- Angulo R., Noguera R., Berdugo J. (2010) *El búfalo de agua (Bubalus bubalis) un eficiente utilizador de nutrientes: aspectos sobre fermentación y digestión ruminal*, *livestock Research for Rural Development* 17 (6) 1-8.
- Bolívar A.M. (2013) *Reacción en cadena de la polimerasa como alternativa diagnóstica para Brucella abortus, Leptospira spp, Mycobacterium bovis y Mycobacterium paratuberculosis*. *REDVE*, 14 (3) 1-17.
- Calderón A., Tique V., Ensuncho C., Rodríguez V., (2010) *Seroprevalencia de Brucella abortus en búfalos de agua (Bubalus bubalis) en el municipio de Lorica, Córdoba, Rev. U.D.C.A.* 13 (2) 125-132.
- Calderón R. A., Angulo M. L., Tiquesalleg V., Rodríguez R. V., Ensuncho H. C. (2015), *Seroprevalencia de brucelosis bovina en dos localidades del Caribe Colombiano*. Córdoba Colombia. *Rev. Orinoquia* 19 (2), 203-209.
- Cantú A., Aparicio E. D., Hernández L., Adams G., Suarez F. (2007) *Estudio epidemiológico de un hato bovino con prevalencia media de brucelosis, vacunado con las mutantes rugosas de Brucella abortus RB51 y rfbK*, *Rev. Vet. Mex.* 38 (2) 197-205.

- Carrisoza U. I., Medina C. M., Palomares R. E., Díaz A. E. (2014) *Transmisión de Brucella abortus en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro. Rev Vet Mex, Universidad Nacional Autónoma de México. 2014 (1) 11-18*
- Castro H. A., González S.R., Prat M. I., (2005) *Brucelosis: una revisión práctica, inmunología actualización. Bahía blanca Buenos Aires. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 39 (2) 203-216.*
- Crudeli G. A., Patiño E. M., Maldonado V. P., Konrad J.L., (2014) *Pasado presente y futuro del búfalo en Argentina, sitio argentino de producción animal, Corrientes Argentina. 25 (2), 140-145*
- Domínguez A., G., Romero S., D., Martínez H., D., García V., Z., (2013) *Los búfalos de agua y las enfermedades infecciosas. Revista La Ciencia y el Hombre, Veracruz, México 25 (2) 1-14*
- Dos Santos L.S., Ribeiro D.L., Chavez N.P., Silva J.P., (2017), *Detection of Brucella sp. infection through serological, microbiological, and molecular methods applied to buffaloes in Maranhao State, Brazil, Maranhao Brazil, Trop Anim Health Prod 49(4): 675-679.*
- Flores C. R. (2010) *La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. México, D.F. (INIFAP) 423-429*

- Fosgate G.T., Diptee M. D., Ramnanan A., Adesiyun A. A., (2011), *Brucellosis in domestic water buffalo (Bubalus bubalis) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle*, Trop Anim Health Prod, 43 (8) 79-86
- Garin B., Mick V., Carrou G., Lorraine S., Claire P., Groussaud P. (2014), *Examination of Taxonomic Uncertainties Surrounding Brucella abortus bv. 7 by Phenotypic and Molecular Approaches*. Paris Francia. *AEM Journals*, 80 (5), 1570-1579.
- Gasque G. R., (2008) *Enciclopedia Bovina, C. U. UNAM*, México D.F., México. Ed. FMVZ
- Getachew T., Getachew G., Sintavehu G., Getenet M., Fasil A. (2016) *Bayesian estimation of sensitivity and specificity of Rose Bengal, Complement Fixation, and Indirect ELISA Test for the diagnosis of Bovine Brucellosis in Ethiopia, HINDAWI*, Sebeta, Ethiopia, 1 (1), 1-5.
- González A. R. (2015) *Determinación de la prevalencia de Brucelosis, Leptospirosis y tuberculosis en búfalos de agua (Bubalus bubalis), ubicados en el municipio de Colomba Costa Cuca, Quetzaltenango*, tesis de Licenciatura no publicada, Universidad de san Carlos de Guatemala, Guatemala, Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/35292237.pdf> Revisado 10 de septiembre del 2017
- Guzmán-Hernández R.L., Contreras-Rodríguez A., Ávila-Calderón E.D., Morales-García M.R. (2016) *Brucellosis: zoonosis de importancia en México*. Rev Chilena Infectol 2016; 33 (6): 656-662

- Hortal R., Calvo O., González G., Gutiérrez H., León V., Arellano R., Palomares R., Ruiz H., Díaz A. (2016) *Diagnóstico serológico de brucelosis en búfalos de agua (Bubalus bubalis) en la región norte de Chiapas, México*. Chiapas. Salud Animal. México. 7 (5): 17-29
- López A., J., R., Fundora S., O., Elías A., (2005), *¿Por qué el búfalo de agua presenta mayor eficiencia productiva que los vacunos?*, REDVET, 6 (11).
- Martínez D., Jacobo R., Cipolini M., Martínez E. (2006) *Brucelosis en búfalos del noroeste de la provincia de Corrientes* provincia de Corrientes Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 1 (1): 1-3
- Martínez D.I., Peniche A., Hernández S., Barradas F.T. (2011) *Evaluación de la cepa S19 Brucella abortus en el control de la brucelosis bovina en Actopan, Veracruz, México*. Salud Animal, México. 33 (1) 44-50.
- Meglia G., Gastaldo M., Álvarez N., Oriani S., Cerutti D., Dubarry J., Cisterna C., Perea J. (2011) *Influencia de la edad de vacunación con la vacuna B. abortus S19 en la respuesta serológica inducida en terneras, Córdoba España*. In Vet, 13, (1), 19-26
- Mejía Martínez K., Lemus C. (2012) *Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con ELISA para el diagnóstico de brucelosis bovina*, REDVET 13 (2) 1-14.
- Meza A., Morales S., Ara M., Manchego A., Calle S., Angulo C. (2010) *Seroprevalencia de Brucelosis Bovina en el distrito de Puerto Inca Huanuco, Lima Perú*. Rev Inv Vet (2) 223-226.

- Morales A., Castillo J., López A., Morales M., Valle J., Contreras A. (2012) *Caracterización de Brucella spp. en México por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), African Journal of Microbiology Research*, 6 (11), 2793-2796.
- Moreno R. J.F., Rentería E. T.B., Searcy B.R., Montaña G. B.F. (2002) *Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. Téc Pecu Méx* 40 (3): 243-249
- Motta G.J., Waltero G.I., Abeledo A., Fernández O. (2012) *Estudio retrospectivo de agentes infecciosos que afectan la reproducción bovina en el departamento del Caquetá Colombia. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Salud Animal* 34 (3) 159-164.
- Motta G.J., Clavijo H.J., Waltero G.I., Abeledo M. (2014) *Prevalencia de anticuerpos a Brucella abortus, Leptospira spp. y Neospora caninum en hatos bovinos y bubalinos en el departamento de Caquetá Colombia. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Salud Animal* 36 (2) 80-89.
- Muflihanah H., Hatta M., Rood E., Scheelbeek P., Abdoel T., Smits H. (2013) *Brucellosis seroprevalence in Bali cattle with reproductive failure in South Sulawesi and Brucella abortus biovar 1 genotypes in the Eastern Indonesian archipelago, BMC Veterinary Research* 9 (233) 2-11
- NOM-041-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
<https://www.gob.mx/senasica/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-041-zoo-1995-campana-nacional-contra-la-brucelosis-en-los-animales>.

- Ortiz E., Silva E., Izquierdo M., (2007) *Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina*, REDVET, La Habana Cuba, 8 (4), 57-88.
- Peña A., Cervini J., Padilla L., Delgadillo J. (2014) *Prevalencia de brucelosis bovina en la región de producción lechera de Jalisco, México*, Revista Iberoamericana de Ciencias, México D.F., 1 (2): 245-252.
- Rivera S., Forastiero A., Rios M., López C., Rosales D., Tamasaukas R., Agudo L. (2016) *IFN- γ como marcador de la respuesta inmunitaria en búfalos de agua vacunados con RB51*. REDVET 17 (6) 1-17.
- Rosales D., Lugon A., Andueza F., López A., Morales A., Bolivar A., (2015) *Pesquisa serológica y molecular de Brucella spp, en un rebaño bufalino lechero en la cuenca del sur del lago de Maracaibo, Venezuela*. Salud Animal 37: 112-117
- Rosales R., (2009), *El búfalo de agua en Costa rica, Alternativa para la producción de carne y leche*, ECAG, Costa Rica 50: 14-18
- SAGARPA (2009) CENID microbiología, *Brucelosis: Importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico*. Disponible en www.zoonosis.unam.mx/contenido/publicacion/archivos/libres/Brucelosis.pdf revisado 4 de nov del 2017
- SAGARPA (2017) Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. *Situación actual del control de la brucelosis en México junio de 2017*. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-brucelosis-en-mexico>. Revisado 20 de octubre de 2017.

- SENASA (2004) Servicio Nacional de Sanidad Animal. *El Búfalo*. Disponible en: www.senasa.gov.produccion-animal.com.ar. Revisado 12 de noviembre del 2017
- SINAVE (2013) Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, *Manual para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis*. Disponible en www.gobmx/salud/documentos/manuales/03_Manual_Brucelosis.pdf,
Revisado 26 de octubre del 2017
- Sousa M., Salvarani F., Bomjardim H., Fonseca A., Preis I., Brito M., Leite R., Barbosa J. (2015) *Infección transplacentaria e intrauterina por Brucella abortus en búfalos de agua (Bubalus bubalis)* *Pesq. Vet. Bras.*, 35 (11) 882-888.
- Suazo Cortez R., (2011), *Seroprevalencia de Brucelosis en búfalos de agua (Bubalus bubalis) en tres unidades de producción localizadas en los municipios de Isla y Juan Rodríguez Clara, Veracruz, México*, Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Tizard I.R. (2009) *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8a. Ed. Elsevier Saunders. 574 págs.
- Wanapat M., Ngarmsang A., Korkhuntut S., Nontaso N., Wachirapakorn C., (2000) *A comparative study on the rumen microbial population of cattle and swamp buffalo raised under traditional village conditions in the northeast of Thailand*. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 13 (7): 918-921
- Zavala I., Morales S., Huaman H., Angulo C. (2011) *Presencia de Brucelosis Bovina en el Distrito de Codo del Pozuzo, Huanuco, Lima, Perú*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22 (1), 72-75

ANEXO 1

Detección de anticuerpos frente a *Brucella abortus* CHEKIT Brucellose-Serum

Descripción y principio de la prueba

Las placas de microtitulación se suministran tapizadas con un antígeno inactivado. Las diluciones de las muestras que van a ser procesadas se incuban en los pocillos de dichas placas. Cualquier anticuerpo específico frente a *B. abortus* se une al antígeno que tapiza los pocillos y forma un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo. El material que no ha quedado unido se elimina de los pocillos mediante lavado. A continuación, se añade un conjugado formado por una IgG anti-rumiante unida a la enzima peroxidasa, el cual es susceptible de unirse a los anticuerpos que forman el complejo con el antígeno de *B. abortus*. El conjugado no unido se elimina mediante lavado, y un substrato TMB es añadido a los pocillos. El grado de color desarrollado (densidad óptica a medida 450 nm) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico frente a *B. abortus* presente en la muestra. La relevancia diagnóstica del proceso se obtiene comparando la densidad óptica de los pocillos con muestra, con la densidad óptica de los pocillos que contienen el control positivo.

Preparación de la solución de lavado

La solución de lavado 10x concentrada debe dejarse que adquiera la temperatura ambiente y agitarse para asegurar la solución de posibles sales precipitadas. Esta solución deberá diluirse 1/10 con agua destilada desionizada antes de emplearla.

Preparándose en condiciones estériles.

Protocolo del ensayo

1. Dispensar 90 µl de solución de lavado en cada pocillo de microtitulación

2. Dispensar 10 µl de sueros, así como de los controles, en los pocillos apropiados de la placa. Dilución final 1:10
3. Homogenizar el contenido de los pocillos mediante una breve y suave agitación de la placa
4. Cubrir la placa de microtitulación con una cubierta e incubar 60 minutos (\pm 5 minutos) a 37°C (\pm 2°C) en cámara húmeda
5. Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de solución de lavado tres veces. Aspirar los contenidos de todos los pocillos después de cada lavado. Después de la aspiración final, eliminar todo el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el siguiente reactivo
6. Dispensar 100 µl del conjugado CHEKIT-Brucellose-anti rumiante-Ig-PO en cada pocillo
7. Cubrir la placa de microtitulación con una cubierta e incubar durante 60 minutos (\pm 5 minutos) a 37°C (\pm 2°C) en cámara húmeda
8. Repetir el paso 5
9. Dispensar 100 µl de Substrato CHEKIT-TMB en cada pocillo
10. Incubar el substrato a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15 minutos
11. La reacción puede pararse dispensando 100 µl por pocillo de solución de frenado.
12. Leer los resultados con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm

Para la validación de la placa la densidad óptica del control positivo no debería ser superior a 2.000 y la densidad óptica del negativo no deberá exceder de 0.500. La

diferencia de la densidad óptica entre los controles positivo y negativo debe ser \geq 0.300.

Nota: Las placas deben ser leídas dentro de un periodo máximo de 2 horas tras la adición de la solución de frenado.

ANEXO 2.

Si el valor calculado es menor al 80% es negativa, si el valor es mayor a 80% es positiva							
Prevalencia estimada (6/214) = 3%							
		Lectura 1(a)	Lectura 2(b)	Promedio (a+b)/2			
Placa 1	Control (-)	0.044	0.044	0.044(c)			
	Control (+)	0.383	0.383	0.383(d)			
	Diferencia	0.339 (e) (d-c)	0.339	X_n	$(X_n - c)/e$	Cociente x 100	
	1	0.044	0.045	0.0445	0.001	0.1	Negativo
	2	0.054	0.085	0.0695	0.075	7.5	Negativo
	3	0.687	0.592	0.6395	1.757	175.7	Positivo
	4	0.395	0.453	0.424	1.121	112.1	Positivo
	5	0.227	0.176	0.2015	0.465	46.5	Negativo
	6	0.102	0.077	0.0895	0.134	13.4	Negativo
	7	0,125	0.066	0.0955	0.152	15.2	Negativo
	8	0.436	0.581	0.5085	1.370	137.0	Positivo
	9	0.093	0.1	0.0965	0.155	15.5	Negativo
	10	0.098	0.058	0.078	0.100	10.0	Negativo
	11	0.672	0.602	0.637	1.749	174.9	Positivo
	12	0.081	0.088	0.0845	0.119	11.9	Negativo
	13	0.051	0.055	0.053	0.027	2.7	Negativo
	14	0.097	0.086	0.0915	0.140	14.0	Negativo
	15	0.071	0.118	0.0945	0.149	14.9	Negativo
	16	0.596	0.586	0.591	1.614	161.4	Positivo
	17	0.44	0.453	0.4465	1.187	118.7	Positivo
	18	0.065	0.057	0.061	0.050	5.0	Negativo
	19	0.393	0.365	0.379	0.988	98.8	Positivo
	20	0.612	0.6	0.606	1.658	165.8	Positivo
	21	0.086	0.05	0.068	0.071	7.1	Negativo
	22	0.048	0.046	0.047	0.009	0.9	Negativo
	23	0.333	0.094	0.2135	0.500	50.0	Negativo
	24	0.52	0.097	0.3085	0.780	78.0	Negativo
	25	0.063	0.114	0.0885	0.131	13.1	Negativo
	26	0.263	0.071	0.167	0.363	36.3	Negativo
	27	0.462	0.595	0.5285	1.429	142.9	Positivo

28	0.054	0.052	0.053	0.027	2.7	Negativo
29	0.239	0.281	0.26	0.637	63.7	Negativo
30	0.092	0.101	0.0965	0.155	15.5	Negativo
31	0.055	0.054	0.0545	0.031	3.1	Negativo
32	0.543	0.468	0.5055	1.361	136.1	Positivo
33	0.086	0.085	0.0855	0.122	12.2	Negativo
34	0.213	0.179	0.196	0.448	44.8	Negativo
35	0.73	0.699	0.7145	1.978	197.8	Positivo
36	0.052	0.044	0.048	0.012	1.2	Negativo
37	0.488	0.44	0.464	1.239	123.9	Positivo
38	0.077	0.071	0.074	0.088	8.8	Negativo
39	0.184	0.167	0.1755	0.388	38.8	Negativo
40	0.446	0.451	0.4485	1.193	119.3	Positivo
41	0.541	0.581	0.561	1.525	152.5	Positivo
42	0.058	0.05	0.054	0.029	2.9	Negativo
43	0.04	0.043	0.0415	-0.007	-0.7	Negativo
44	0.692	0.668	0.68	1.876	187.6	Positivo
45	0.044	0.044	0.044	0.000	0.0	Negativo
46	0.045	0.057	0.051	0.021	2.1	Negativo

Si el valor calculado es menor al 80% es negativa, si el valor es mayor a 80% es positiva							
Prevalencia estimada (6/214) = 3%							
		Lectura 1(a)	Lectura 2(b)	Promedio (a+b)/2			
Placa 2	Control (-)	0.047	0.047	(c)			
	Control (+)	0.322	0.322	(d)			
	Diferencia	0.275 (e) (d-c)	0.275	X_n	$(X_n - c)/e$	Cociente x 100	
	1	0.137	0.119	0.128	0.295	29.5	Negativo
	2	0.1	0.077	0.0885	0.151	15.1	Negativo
	3	0.464	0.456	0.46	1.502	150.2	Positivo
	4	0.197	0.187	0.192	0.527	52.7	Negativo
	5	0.666	0.659	0.6625	2.238	223.8	Positivo

6	0.066	0.17	0.118	0.258	25.8	Negativo
7	0.551	0.581	0.566	1.887	188.7	Positivo
8	0.065	0.046	0.0555	0.031	3.1	Negativo
9	0.592	0.604	0.598	2.004	200.4	Positivo
10	0.165	0.092	0.1285	0.296	29.6	Negativo
11	0.212	0.211	0.2115	0.598	59.8	Negativo
12	0.174	0.15	0.162	0.418	41.8	Negativo
13	0.113	0.13	0.1215	0.271	27.1	Negativo
14	0.13	0.127	0.1285	0.296	29.6	Negativo
15	0.05	0.056	0.053	0.022	2.2	Negativo
16	0.051	0.05	0.0505	0.013	1.3	Negativo
17	0.051	0.057	0.054	0.025	2.5	Negativo
18	0.053	0.047	0.05	0.011	1.1	Negativo
19	0.043	0.049	0.046	-0.004	-0.4	Negativo
20	0.201	0.205	0.203	0.567	56.7	Negativo
21	0.054	0.052	0.053	0.022	2.2	Negativo
22	0.05	0.046	0.048	0.004	0.4	Negativo
23	0.045	0.046	0.0455	-0.005	-0.5	Negativo
24	0.045	0.044	0.0445	-0.009	-0.9	Negativo
25	0.056	0.055	0.0555	0.031	3.1	Negativo
26	0.052	0.06	0.056	0.256	25.6	Negativo
27	0.395	0.376	0.3855	1.231	123.1	Positivo
28	0.045	0.043	0.044	-0.011	-1.1	Negativo
29	0.051	0.05	0.0505	0.013	1.3	Negativo
30	0.054	0.046	0.05	0.011	1.1	Negativo
31	0.048	0.049	0.0485	0.005	0.5	Negativo
32	0.048	0.046	0.047	0.000	0.0	Negativo
33	0.084	0.084	0.084	0.135	13.5	Negativo
34	0.047	0.045	0.046	-0.004	-0.4	Negativo
35	0.204	0.207	0.2055	0.576	57.6	Negativo
36	0.048	0.045	0.0465	-0.002	-0.2	Negativo
37	0.067	0.068	0.0675	0.075	7.5	Negativo
38	0.048	0.046	0.047	0.000	0.0	Negativo
39	0.059	0.047	0.053	0.022	2.2	Negativo
40	0.064	0.054	0.059	0.044	4.4	Negativo
41	0.048	0.048	0.048	0.004	0.4	Negativo

	42	0.066	0.052	0.059	0.044	4.4	Negativo
	43	0.041	0.047	0.044	-0.011	-1.1	Negativo
	44	0.054	0.054	0.054	0.025	2.5	Negativo
	45	0.045	0.053	0.049	0.007	0.7	Negativo
	46	0.046	0.045	0.0455	-0.005	-0.5	Negativo

Si el valor calculado es menor al 80% es negativa, si el valor es mayor a 80% es positiva							
Prevalencia estimada (6/214) = 3%							
		Lectura 1(a)	Lectura 2(b)	Promedio (a+b)/2			
Placa 3	Control (-)	0.068	0.068	(c)			
	Control (+)	0.399	0.399	(d)			
	Diferencia	0.331 (e) (d-c)	0.331	X_n	$(X_n - c)/e$	Cociente x 100	
	1	0.411	0.436	0.4235	1.074	107.4	Positivo
	2	0.052	0.049	0.0505	-0.053	-5.3	Negativo
	3	0.048	0.061	0.0545	-0.041	-4.1	Negativo
	4	0.095	0.1	0.0975	0.089	8.9	Negativo
	5	0.053	0.054	0.0535	-0.044	-4.4	Negativo
	6	0.055	0.05	0.0525	-0.047	-4.7	Negativo
	7	0.211	0.207	0.209	0.426	42.6	Negativo
	8	0.059	0.059	0.059	-0.027	-2.7	Negativo
	9	0.189	0.174	0.1815	0.343	34.3	Negativo
	10	0.056	0.052	0.054	-0.042	-4.2	Negativo
	11	0.043	0.044	0.0435	-0.074	-7.4	Negativo
	12	0.051	0.047	0.049	-0.057	-5.7	Negativo
	13	0.046	0.05	0.048	-0.060	-6.0	Negativo
	14	0.051	0.058	0.0545	-0.041	-4.1	Negativo
	15	0.055	0.065	0.06	-0.024	-2.4	Negativo
	16	0.178	0.171	0.1745	0.322	32.2	Negativo
	17	0.424	0.409	0.4165	1.053	105.3	Positivo
	18	0.498	0.475	0.4865	1.264	126.4	Positivo
	19	0.089	0.102	0.0955	0.083	8.3	Negativo
	20	0.05	0.042	0.046	-0.066	-6.6	Negativo

21	0.051	0.054	0.0525	-0.047	-4.7	Negativo	
22	0.056	0.047	0.0515	-0.050	-5.0	Negativo	
23	0.043	0.05	0.0465	-0.065	-6.5	Negativo	
24	0.047	0.052	0.0495	-0.056	-5.6	Negativo	
25	0.05	0.051	0.0505	-0.053	-5.3	Negativo	
26	0.157	0.165	0.161	0.281	28.1	Negativo	
27	0.091	0.098	0.0945	0.080	8.0	Negativo	
28	0.371	0.358	0.3645	0.896	89.6	Positivo	
29	0.049	0.051	0.05	-0.054	-5.4	Negativo	
30	0.063	0.066	0.0645	-0.011	-1.1	Negativo	
31	0.052	0.048	0.05	-0.054	-5.4	Negativo	
32	0.05	0.051	0.0505	-0.053	-5.3	Negativo	
33	0.54	0.54	0.54	1.426	142.6	Positivo	
34	0.153	0.153	0.153	0.257	25.7	Negativo	
35	0.168	0.121	0.1445	0.231	23.1	Negativo	
36	0.052	0.046	0.049	-0.057	-5.7	Negativo	
37	0.491	0.478	0.4845	1.258	125.8	Positivo	
38	0.241	0.229	0.235	0.505	50.5	Negativo	
39	0.615	0.619	0.617	1.659	165.9	Positivo	
40	0.385	0.379	0.382	0.949	94.9	Negativo	
41	0.433	0.365	0.399	1.000	100.0	Positivo	
42	0.079	0.051	0.065	-0.009	-0.9	Negativo	
43	0.084	0.079	0.0815	0.041	4.1	Negativo	
44	0.059	0.058	0.0585	-0.029	-2.9	Negativo	
45	0.046	0.049	0.0475	-0.062	-6.2	Negativo	
46	0.08	0.154	0.117	0.148	14.8	Negativo	

Si el valor calculado es menor al 80% es negativa, si el valor es mayor a 80% es positiva							
Prevalencia estimada (6/214) = 3%							
		Lectura 1(a)	Lectura 2(b)	Promedio (a+b)/2			
Placa 4	Control (-)	0.047	0.047	(c)			
	Control (+)	0.355	0.355	(d)			
	Diferencia	0.308 (e) (d-c)	0.308	X_n	$(X_n - c)/e$	Cociente x 100	
	1	0.142	0.144	0.143	0.312	31.2	Negativo
	2	0.048	0.061	0.0545	0.024	2.4	Negativo
	3	0.189	0.179	0.184	0.445	44.5	Negativo
	4	0.05	0.045	0.0475	0.002	0.2	Negativo
	5	0.05	0.052	0.051	0.013	1.3	Negativo
	6	0.356	0.38	0.368	1.042	104.2	Positivo
	7	0.1	0.095	0.0975	0.164	16.4	Negativo
	8	0.055	0.055	0.055	0.026	2.6	Negativo
	9	0.075	0.073	0.074	0.088	8.8	Negativo
	10	0.098	0.081	0.0895	0.138	13.8	Negativo
	11	0.044	0.042	0.043	-0.013	-1.3	Negativo
	12	0.324	0.271	0.2975	0.813	81.3	Positivo
	13	0.048	0.044	0.046	-0.003	-0.3	Negativo
	14	0.076	0.075	0.0755	0.093	9.3	Negativo
	15	0.08	0.1	0.09	0.140	14.0	Negativo
	16	0.644	0.628	0.636	1.912	191.2	Positivo
	17	0.058	0.062	0.06	0.042	4.2	Negativo
	18	0.236	0.272	0.254	0.672	67.2	Negativo
	19	0.056	0.059	0.0575	0.034	3.4	Negativo
	20	0.105	0.1	0.1025	0.180	18.0	Negativo
	21	0.293	0.295	0.294	0.802	80.2	Positivo
	22	0.062	0.056	0.059	0.039	3.9	Negativo
	23	0.046	0.05	0.048	0.003	0.3	Negativo
	24	0.354	0.333	0.3435	0.963	96.3	Positivo
	25	0.131	0.123	0.127	0.260	26.0	Negativo
	26	0.049	0.048	0.0485	0.005	26.0	Negativo

27	0.044	0.054	0.049	0.006	0.6	Negativo
28	0.119	0.115	0.117	0.227	22.7	Negativo
29	0.045	0.046	0.0455	-0.005	-0.5	Negativo
30	0.052	0.048	0.05	0.010	1.0	Negativo
31	0.207	0.218	0.2125	0.537	53.7	Negativo
32	0.054	0.068	0.061	0.045	4.5	Negativo
33	0.318	0.328	0.323	0.896	89.6	Positivo
34	0.039	0.055	0.047	0.000	0.0	Negativo
35	0.041	0.057	0.049	0.006	0.6	Negativo
36	0.041	0.057	0.049	0.006	0.6	Negativo
37	0.081	0.097	0.089	0.136	13.6	Negativo
38	0.041	0.057	0.049	0.006	0.6	Negativo
39	0.01	0.13	0.07	0.075	7.5	Negativo
40	0.037	0.047	0.042	-0.016	1.6	Positivo
41	0.11	0.17	0.14	0.302	30.2	Positivo
42	0.046	0.062	0.054	0.023	2.3	Negativo
43	0.091	0.107	0.099	0.169	16.9	Negativo
44	0.037	0.051	0.044	-0.010	-1.0	Positivo
45	0.061	0.075	0.068	0.068	6.8	Negativo
46	0.044	0.06	0.052	0.016	1.6	Negativo
47	0.052	0.066	0.059	0.039	3.9	Negativo
48	0.045	0.059	0.052	0.016	1.6	Negativo
49	0.49	0.65	0.57	1.698	169.8	Positivo
50	0.097	0.107	0.102	0.179	17.9	Negativo
51	0.054	0.07	0.062	0.049	4.9	Negativo
52	0.044	0.058	0.051	0.013	1.3	Negativo
53	0.077	0.091	0.084	0.120	12.0	Negativo
54	0.038	0.054	0.046	-0.003	-0.3	Negativo
55	0.459	0.477	0.468	1.367	136.7	Positivo
56	0.037	0.051	0.044	-0.010	-1.0	Negativo
57	0.036	0.054	0.045	-0.006	-0.6	Negativo
58	0.03	0.07	0.05	0.010	1.0	Negativo
59	0.042	0.06	0.051	0.013	1.3	Negativo
60	0.03	0.07	0.05	0.010	1.0	Negativo

Si el valor calculado es menor al 80% es negativa, si el valor es mayor a 80% es positiva							
Prevalencia estimada (6/214) = 3%							
		Lectura 1(a)	Lectura 2(b)	Promedio (a+b)/2			
Placa 5	Control (-)	0.044	0.044	(c)			
	Control (+)	0.383	0.383	(d)			
	Diferencia	0.339 (e) (d-c)	0.339	X_n	$(X_n - c)/e$	Cociente x 100	
	1	0.056	0.072	0.064	0.059	5.9	Negativo
	2	0.064	0.08	0.072	0.083	8.3	Negativo
	3	0.08	0.096	0.088	0.130	13.0	Negativo
	4	0.069	0.081	0.075	0.031	3.1	Negativo
	5	0.079	0.085	0.082	0.112	11.2	Negativo
	6	0.07	0.09	0.08	0.106	10.6	Negativo
	7	0.088	0.094	0.091	0.139	13.9	Negativo
	8	0.07	0.09	0.08	0.106	10.6	Negativo
	9	0.079	0.087	0.083	0.115	11.5	Negativo
	10	0.41	0.432	0.421	1.112	111.2	Positivo
	11	0.085	0.093	0.089	0.133	13.3	Negativo
	12	0.083	0.087	0.085	0.121	12.1	Negativo
	13	0.083	0.091	0.084	0.118	11.8	Negativo
	14	0.08	0.1	0.09	0.136	13.6	Negativo
	15	0.083	0.091	0.087	0.127	12.7	Negativo
	16	0.092	0.098	0.095	0.150	15.0	Negativo