

**UNIVERSIDAD AUTONOMA  
“GABRIEL RENE MORENO”  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia**



**PREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN  
EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL  
(PROV. VELASCO)**

**Tesis de Grado presentada para obtener  
el Título de Medico Veterinario Zootecnista**

**Presentado por:**

David Centellas Patiño

**Asesores:**

**Dr. Fidel Villegas**

**Dr. Daniel W. Ardaya V.**

**Dr. Jose L. Quiroga C.**

**Santa Cruz – Bolivia  
2002**

## DECICATORIA

A **Dios** que sin su ayuda en todos estos años, no estaría hoy presentando mi trabajo final de grado.  
(Josue 1:9; Filipenses 4:13)

A mi padre **Germán Centellas Castillo**, que sin su esfuerzo y sacrificio no hubiera podido culminar mi formación profesional.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la fuerza y necesaria para estudiar y realizar mi tesis.

A la Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno, en especial al plantel docente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por compartir sus conocimientos, que me permiten hoy obtener esta profesión.

Al Laboratorio de Investigación y Diagnostico Veterinario (**LIDIVET**), por su colaboración en el análisis y procesamiento de datos.

A la Asociación de ganaderos de San Miguel (**ASOGASAM**), por su apoyo durante mi estadía en San Miguel de Velasco.

Al **Dr. Juan Carlos Pílon**, por su apoyo para la realización del presente trabajo.

A mis asesores por toda su colaboración.

A mi tribunal por la revisión y corrección de mi tesis.

Ami primo **Oscar A. Centellas Bravo**, por su apoyo incondicional durante toda mi formación y la realización de mi tesis.

## INDICE

CONTENIDO	Pgs.
<b>TITULO.....</b>	<b>I</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>III</b>
<b>INDICE.....</b>	<b>IV</b>
<b>INDICE DE CUADROS.....</b>	<b>V</b>
<b>I.- RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>III.- JUSTIFICATIVOS.....</b>	<b>4</b>
3.1.IMPORTANCIA CIENTIFICA.....	4
3.2. IMPORTANCIA SOCIAL.....	4
3.3. IMPORTANCIA ECONOMICA.....	4
3.4.IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA DEL BOVINO.....	4
3.5.APORTE DE DATOS.....	4
3.6. INFORMACION SOBRE LA ENFERMEDAD.....	5
<b>IV.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
4.1. HISTORIA.....	6
4.2. CONCEPTO.....	7
4.3. SINONIMIA.....	7
4.4. ETIOLOGÍA.....	8
4.4.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	8
4.4.2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.....	8
4.4.3. CARACTERISTICAS CULTIVO.....	9
4.4.4. CARACTERISCAS DE RESISTENCIA.....	9
4.5. DISTRIBUCIÓN.....	10
4.6. ESPECIES AFECTADAS.....	10

4.7. EPIDEMIOLOGÍA.....	10
4.8. TRANSMISIÓN.....	12
4.9. PERIODO DE INCUBACIÓN.....	14
4.10. PATOGENIA.....	14
4.11. SÍNTOMAS.....	15
4.12. ALTERACIONES HISTOLÓGICAS.....	17
LESIONES EN LA GLÁNDULA MAMARIA.....	17
LESIONES EN OTROS ORGANOS DEL GANADO.....	17
4.13. ALTERACIONES ANATÓMICAS.....	18
4.14. DIAGNÓSTICO.....	19
4.14.1. PRUEBA BACTERIOLOGICA.....	19
4.14.2. PRUEBAS SEROLOGICAS.....	20
4.14.2.1. SEROAGLUTINACION RAPIDA CON ANTIGENO BUFFERADO....	20
DESARROLLO DE LA PRUEBA.....	21
INTERPRETACIÓN.....	21
4.14.2.2. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN TUBO.....	22
4.14.2.3. FIJACIÓN DE COMPLEMENTO.....	22
4.14.2.4. PRUEBA DE CARD TEST (Rosa de Bengala).....	23
4.14.2.5. PRUEBA DE ELISA.....	23
ELISA INDIRECTA.....	26
ELISA COMPETITIVA.....	27
DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA COMPETITIVA.....	28
4.15. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	31
4.15.1. ENFERMEDADES BACTERIANAS.....	31
4.15.2. ENFERMEDADES VÍRICAS.....	32
4.15.3. ENFERMEDADES POR PROTOZOOS.....	32
4.15.4. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR HONGOS.....	32

4.16. INMUNOLOGÍA.....	33
4.17. TRATAMIENTO.....	34
4.18. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	35
4.18.1.ELIMINACIÓN MEDIANTE EXÁMENES Y SACRIFICIOS.....	37
4.18.2. INMUNIZACIÓN.....	39
4.19. VACUNAS.....	41
4.19.1. BRUCELLA ABORTUS CEPA 19.....	41
4.19.2. BRUCELLA ABORTUS 45/20.....	42
4.19.3. BRUCELLA ABORTUS RB 51.....	43
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
5.1. LOCALIZACIÓN DEL AREA DE TRABAJO .....	46
5.2. MATERIALES.....	46
5.3. MÉTODOS.....	47
5.3.1. MÉTODO DE MUESTREO.....	47
5.3.2. MÉTODO DE CAMPO.....	47
5.3.3. MÉTODO DE LABORATORIO.....	47
5.3.4. MÉTODO ESTADÍSTICO.....	48
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>VI. DISCUSION.....</b>	<b>56</b>
<b>VII. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>64</b>
<b>VI. ANEXO.....</b>	<b>69</b>
ANEXO 1 .....	70
ANEXO 2 .....	72
ANEXO 3.....	73



## INDICE DE CUADROS

	<b>Pgs.</b>
<b>CUADRO No 1 PREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco).....</b>	<b>51</b>
<b>CUADRO No 2 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco) POR EDAD.....</b>	<b>52</b>
<b>CUADRO No 3 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco)POR RAZA.....</b>	<b>53</b>
<b>CUADRO No 4 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco) POR SEXO.....</b>	<b>54</b>
<b>CUADRO No 5 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco ) POR COMUNIDAD.....</b>	<b>55</b>



# **PREVALENCIA DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL PROVINCIA VELASCO**<sup>1</sup>

Villegas, A.F.<sup>2</sup>; Ardaya, V.W.D.<sup>3</sup>; Quiroga, C.L.J.<sup>4</sup>

## **I. RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de la Brucelosis Bovina en el Municipio de San Miguel Provincia Velasco del departamento de Santa Cruz. El muestreo se realizó del 9 de mayo al 25 de mayo del 2002. El tamaño de la muestra fue de 406 animales se determinó mediante la formula para estimar una proporción del programa computarizado Epi Info 6, versión 604b to C Upgrade – October 1997, estas muestras se tomaron de Bovinos machos y hembras, a los cuales se les extrajo 4 – 5 ml. De sangre se la vena coxígea. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Investigación y Diagnostico Veterinario (LIDIVET – Santa Cruz), el método que se utilizó para el diagnostico fue la Prueba Bufferada de aglutinación en placa y los positivos confirmados mediante la prueba de Elisa competitiva. Tomándose las variables de edad, raza, sexo y comunidad, que nos muestra , 1.48% de positividad con intervalo de confianza de 0.54 – 3.19 ( 95%). En conclusión queda demostrada la presencia de anticuerpos brucélicos con una prevalencia baja y que la enfermedad no tiene predilección por edad, raza, sexo y comunidad.

---

<sup>1</sup> Borrador de Tesis de Grado presentada por Centellas, P. David, para obtener el titulo de Medico Veterinario

Zootecnista.

<sup>2</sup> Epidemiólogo de LIDIVET.

<sup>3</sup> Inmunólogo de LIDIVET.

<sup>4</sup> Sección Inmunólogo de LIDIVET

## II. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha venido realizando, distintos trabajos de investigación, tanto por parte de tesis, como de instituciones ligadas al ámbito pecuario. Debido a esto podemos ver el notorio interés, que existe en el medio por poder tener cada vez mayor conocimiento sobre la enfermedad y al mismo tiempo, profundizar aun mas los datos ya obtenidos anteriormente.

Es innegable, que en nuestro país el ganado vacuno, es una de las mas importantes fuentes de proteína de origen animal. Esto convierte al ganado vacuno, en una pieza importante dentro del movimiento económico, no solo de ganaderos, sino también del país; por consiguiente toda enfermedad, que provoque un retraso en el ciclo reproductivo en un animal en edad reproductiva, perdida de terneros, sacrificio de animales de alto valor genético, eliminación de productos y subproductos por contaminación con bacterias patógenas; traerán consigo grandes pérdidas económicas, dañando aun mas nuestra frágil economía no solo del sector ganadero y del país.

La brucelosis es una enfermedad del ganado que causa grandes perdidas económicas. En Latinoamérica, las perdidas económicas debidas a la brucelosis ascienden a un monto alrededor de \$us 600.000.000 anuales (Acha y Szifres, 1.986).

Además de recordar el papel fundamental, que juega el ganado vacuno dentro, de la difusión de la enfermedad como zoonosis, debido al contacto que tiene el hombre con estos animales; tanto en el manejo de los animales, como en el consumo de la leche contaminada con brucelosis. En Bolivia se ha reportado casos de humanos reactivos positivos a algunas pruebas, tales como Cruz, (1.977) que encontró 14 trabajadores de matadero positivos de 100 encuestados, en Vallegrande. Loaiza y col (1.992) en su encuesta de brucelosis bovina y humana de los mataderos de 7

capitales de departamento, encontró que de 234 empleados, 10 (4%) presentan positividad a las pruebas serológicas y 7 (3%) eran sospechosos. Hevia (1.986) mostró que de 200 personas entre trabajadores de lecherías, veterinarios y estudiantes de veterinarias de Santa Cruz, 22 (11%) reaccionaron positivamente a la prueba de aglutinación en placa.

El presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

- a) Determinar la prevalencia de la Brucelosis bovina en el municipio de San Miguel, provincia Velasco.
- b) Determinar la presencia de anticuerpos específicos de **Brucelas** en bovinos mediante la prueba bufferada y confirmación de los positivos con la prueba de ELISA.
- c) Evaluar la distribución de la brucelosis tomando en cuenta las variables: Edad, Raza, Sexo y Comunidad.
- d) Sugerir métodos de control adecuados.
- e) Enriquecer los datos estadísticos de la brucelosis bovina, en el departamento de Santa Cruz y por consiguiente Bolivia.

### **III. JUSTIFICATIVOS**

**3.1. Importancia Científica.-** Puesto que se han venido realizando otros trabajos de investigación en el área de la brucelosis, la renovación de la información actual con

respecto a la misma, se convierte en un aporte de datos para hacer un seguimiento a la enfermedad t servirá para sugerir medidas de control adecuados para el municipio.

**3.2. Importancia Social.-** Se aportarán datos importantes para tomar medidas de prevención y control de la enfermedad, trayendo consigo salud a la población.

Al prevenir una enfermedad zoonótica, habrá menos gasto en atención medica y habrá una población sana para seguir trabajando, dando como resultado movimiento de la economía.

Al estar el hombre en contacto con estos animales, en el manejo tanto de animales por parte de trabajadores, como el consumo de productos y subproductos de origen vacuno, hace que existan probabilidades muy altas de que estos terminen enfermos, siendo este aspecto de mayor incidencia en las haciendas.

**3.3. Importancia Económica.-** Además de conocer que la presencia de esta enfermedad, trae problemas reproductivos produciendo perdidas de terneros y vientres puesto que un animal enfermo debe ir al matadero.

**3.4. Aporte de Datos.-** Anteriormente ya se ha efectuado tesis de grado sobre brucelosis bovina, sin embargo todo trabajo de investigación llega a enriquecer el conocimiento de la enfermedad en nuestro país, con datos actualizados pudiendo servir, para futuros proyectos de ayuda a comunidades, aportando datos a instituciones, tanto nacionales como internacionales.

**3.5. Información sobre la Enfermedad.-** Al mismo tiempo de realizar el trabajo de investigación se dará a los estudiantes que consultan la biblioteca un texto de consulta o referencia para realizar trabajos o informes académicos.

## IV.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. HISTORIA

La brucelosis ha sido muy estudiada y desde antes 1.567 en Inglaterra se conoció la forma contagiosa del aborto en ganados vacunos (Smith y col.,1.973).

En 1.861 Martson contrajo una enfermedad febril en la zona del Mediterráneo, la descripción de su padecimiento hace suponer, casi con certeza, que estaba sufriendo brucelosis, por caracterizarse especialmente la fiebre intermitente que era la fiebre de Malta prevalente en la isla del mismo nombre (Smith y col., 1.973)

Posteriormente Franck (1.876) Lehnert (1.878) y Brauer (1.880) provocaron el aborto artificialmente, mediante la introducción de flujo vaginal y cubiertas embrionarias en la vagina de la vacas preñadas, confirmando así el contagio del padecimiento (Hutyura y col., 1.973).

En 1.887 Bruce aisló un pequeño organismo gram negativo de los soldados británicos estacionados en Malta, mas tarde denominado *Micrococcus melitensis*.

En 1.897 Bang, en Dinamarca descubrió que el aborto contagioso de las vacas era un pequeño bacilo al cual le dio el nombre de *Bacillus abortus*. En el mismo año Hughes escribió la primera monografía al respecto y propuso el nombre de fiebre ondulante. En 1.909, Hutyra descubrió un microorganismo que luego se denominó *Brucella suis*. (Smith y col., 1.973)

En 1.9018 y luego en 1.923 Evans, bacterióloga americana publicó pruebas convincentes de que el *Micrococcus melitensis* de las cabras y el *Bacillus abortus* de las vacas no podían diferenciarse morfológicamente, ni por su reacciones de cultivo y bioquímicas, pero que presentaban diferencias antigénicas demostrables

por absorción aglutininas, de donde Meyer y Shaw confirmaron estas observaciones proponiendo el nombre genérico de *Brucella* en honor de David Bruce (Smihy y col., 1.973).

El primer caso de fiebre ondulante humana producida por *Brucella abortus*, fue estudiado por Keefer en 1.924. El aislamiento de *Brucella melitensis* de personas cuyo único origen de la infección, ha sido la leche de vaca, indica que la madre bovina alberga el germen, y lo demostró Damon y Fagan en 1.947 (Hutyra y col.,1.973, Burrow, 1.974, Merchant y col., 1.970)

#### **4.2. CONCEPTO**

La brucelosis es una enfermedad infecciosa, aguda o crónica de los bovinos, ovinos, caprinos, canino, equinos, el hombre u otras especies, causadas por bacterias del genero *Brucella*. Se caracteriza por aborto al final de la gestación y como secuela cifras elevadas de infertilidad en ambos sexos, en menor grado orquitis o infección de las glándulas sexuales accesorias en el macho, interfiriendo así en la reproducción.( Blood y col, 1992; Merck y col, 1992; Acha y col, 1988).

#### **4.3. SINONIMIA**

Melitocococia, fiebre ondulante, fiebre de malta, fiebre del mediterráneo en el hombre, aborto contagioso, aborto infeccioso, aborto epizoótico en animales, enfermedad de Bang, *Bacillus abortus* en bovinos (Bruner y col.,1.70; Acha y col., 1.988).

#### **4.4. ETIOLOGÍA**

En el genero *Brucella* se reconocen actualmente seis especies: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis* y *Brucella canis* (Acha y col., 1.988).

#### 4.4.1. Clasificación Taxonómica

Reino	: Animal
División	: Phylum Thallophyta
Clase	: Schizomicetos
Orden	: Eubacteriales
Familia	: Brucellacea
Genero	: <i>Brucella</i>
Especie	: abortus, melitensis, suis, ovis, canis y neotomae

#### 4.4.2. Características Morfológicas

El genero *Brucella* y las especies que lo componen son cocobacilos, que miden de 0.5 micras a 2.0 micras de longitud.

Son gram negativas e inmóviles, intracelulares facultativos, no forman esporas y se presentan aisladas o en cadenas cortas, carecen de cápsula (Hutyra y col.,1973; Merchant y col., 1980).

#### 4.4.3. Características de Cultivo

Estos microorganismos son aerobios y se desarrollan mejor a 37° C. En medios ajustados de ph 6.6 a 6.8. *B. Abortus* requiere de una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> para el primer aislamiento y para un numero variable de subcultivos. Las colonias son redondas, hemisféricas, lisas y opacas, de color blanquesino o crema mate (Smith y col., 1987).

Las Brucellas se desarrollan bien en presencia de tiamina, ácido nicotínico y biotina (factores de crecimiento), pueden crecer en medios de cultivos adicionales como agar hígado y caldo de hígado, pero el mas adecuado es el agar suero dextrosa, agar solución de patata con suero, agar sangre y agar suero de triptasa; los medios líquidos se componen de los mismos ingredientes excluido el agar (Piatkin, 1989)

#### **4.4.4. Características de Resistencia**

Las Brucellas se caracterizan por su gran resistencia y viabilidad. Sobreviven por largo tiempo a temperaturas bajas. En el suelo, orina, heces de animales, polvo de heno y salvado, las brucellas viven hasta 4 – 5 meses; en el hielo, nieve, mantequilla y requesón hasta 4 meses; en el polvo 30 días y en la carne 20 días.

Las brucellas son sensibles a altas temperaturas y sustancias desinfectantes. Bajo la acción del calor mueren a 60°C durante 30 minutos, 70°C durante 10 minutos, a 80 – 90°C, a los 5 minutos de ebullición. Las brucellas son sumamente susceptibles al fenol, creolina, formalina, cloruro de sodio, cloromicina y otros desinfectantes (Piatkin y col 1989).

#### **4.5. DISTRIBUCIÓN**

La Brucelosis esta ampliamente distribuida y posee enorme importancia económica en casi todo el mundo, sobre todo en el ganado lechero. La incidencia varia considerablemente según los rebaños, regiones o países y por este motivo tiene poco valor los detalles relativos a porcentajes de animales infectados. (Blood y col., 1.992).



Informaciones disponibles indican que es una de las más importantes enfermedades de los bovinos en América del Sur y países en desarrollo de África, Asia y Australia. Algunos países ya la han erradicado, entre ellos están: Escandinavia, Austria, Bélgica, Hungría, Alemania, Japón, Canadá, Gran Bretaña, Francia, Estados Unidos, Chile, Cuba, Austria y Nueva Zelanda (Michael, 1992).

El biotipo 1 es universal y predominante de los ocho que ocurren en el mundo. En América latina se han comprobado los biotipos 1,2,3 y 4. En África oriental se ha comprobado el biotipo 3, que afecta a los búfalos. El biotipo 5 ocurre en Gran Bretaña y Alemania. Los demás biotipos también tienen una distribución geográfica más o menos marcada.(Achá y col., 1.988)

#### **4.6. ESPECIES AFECTADAS**

La Brucelosis como enfermedad infecciosa, cuenta con una gran variedad de especies bacterianas dentro, de lo que son las brucellas; además de estas especies, también cuenta con una gama de biotipos dentro de cada especie de brucella, con sus distintas especies y biotipos, afecta a las siguientes especies: Bovinos, porcinos, caprinos, ovinos, equinos, caninos, gatos, búfalo doméstico, yaks, camellos, dromedarios, camélidos americanos y también afecta al hombre.(Achá, 1.988)

#### **4.7. EPIDEMIOLOGÍA**

La enfermedad se transmite por ingestión, penetración a través de la piel indemne y contaminación de la ubre durante el ordeño. El pastoreo en las áreas infectadas o el consumo de otros materiales alimenticios y agua contaminada, con secreciones y membranas fetales de vacas infectadas, y el contacto con fetos abortados y neonatos infectados se considera las formas más frecuentes de propagación. La propagación dentro de un rebaño ocurre por transmisión, tanto vertical como horizontal. También

existe infección congénita provocada por la infección dentro del útero, pero su importancia no se ha excluido todavía. La transmisión horizontal suele ocurrir por contaminación directa, y aunque las posibilidades de desinfección por moscas, perros, garrapatas, calzado, trajes, y otros objetos inanimados infectados existe, no se considera de mayor importancia en cuanto se considera de mayor importancia en cuanto se refiere a medidas de control. (Blood y col., 1.992).

La cola de las vacas cuando esta muy contaminada con secreciones uterinas infectadas puede diseminar la infección si se pone en contacto con la conjuntiva o piel indemne de otros animales. Los toros no suelen transmitir la infección la tienen aquellos que están infectados y secretan semen que contienen microorganismos, pero la probabilidad de propagación a partir del toro es muy grande si se emplea semen para inseminación artificial. La propagación de la enfermedad de un hato a otro y de una región a otra siempre se debe a los desplazamientos de los animales infectados de un hato en el que hay infección a otro que es susceptible, pero que aun no ha sido infectado (Blood y col., 1.992).

#### **4.8. TRANSMISIÓN**

Es importante el conocer las principales vías de excreción de las brucelas, para así poder entender luego, que nace el peligro en la difusión de la enfermedad en un hato ganadero:

Vía genital.- Después del aborto o del nacimiento de un feto normal o prematuro, en este caso la excreción es máxima pero de corta duración.

Vía mamaria.- En este caso la excreción suele ser menos intensa, salvo en el principio de la lactación. En algunos casos, puede persistir durante toda la lactación.

Vía congénita.- En este caso el feto puede nacer infectado pero viable, pudiendo permanecer con una infección latente (negativo en las pruebas diagnósticas) hasta la edad adulta presentando la enfermedad clínica en su primera gestación.

Esto suele suceder en el 5% de las terneras nacidas de madres infectadas. (Padilla,1996 )

El vehículo infeccioso de mas importancia practica, son las cubiertas fetales, el liquido amniótico y el feto de las hembras infectadas, pues contienen cantidades enormes de brucellas y pueden infectar fuertemente la cama y el suelo de los corrales, pueden contribuir también la leche, pues aproximadamente la mitad de vacas infectadas, después de abortar o parir, eliminan las brucellas con la leche durante semanas, meses y aun años ( Hutyra y col., 1.973).

La ruta común de diseminación es a través del tracto digestivo y el sitio de entrada de este varia con el animal. Sin embargo el microorganismo puede invadir los tejidos en la región de las amígdalas o en la faringe o puede entrar por la pared intestinal, la conjuntiva , piel y el tracto respiratorio. ( Runnells y col., 1.986, Hutyra y col., 1.973)

Está demostrado que las garrapatas, chinches y pulgas pueden estar infectadas por la tres especies de brucella. Solamente las garrapatas pueden infectarse, durante la picadura y transmitir la infección a sus huevos y larvas, por esta razón los animales infectados son el principal peligro de la infección, al igual que los alimentos y bebidas contaminados por los animales enfermos. Los rumiantes salvajes enfermos también se constituyen en una fuente de infección, siendo riesgoso para los animales de la zona. Asimismo los carnívoros, pueden ser portadores del germen, en unos se

reproduce la infección mientras que en otros el germen se deposita en la materia fecal, de allí contaminan a los alimentos (Merchant y col., 1.970).

En los centros de inseminación artificial la contaminación de los toros puede tener lugar por medio de una vaca receladora infectada, pero parece que la contaminación entre los toros es también posible. La infección congénita puede también atacar a los becerros nacidos de hembras enfermas. La infección ocurre en el útero y puede permanecer latente en el ternero durante toda su vida. El animal da pruebas serológicas negativas hasta su primer parto en el cual comienza a eliminar el microorganismo ( Derivaux, 1.976).

#### **4.9. PERÍODO DE INCUBACIÓN**

La brucelosis tiene un periodo de incubación de 33 a 230 días. Los primeros abortos en las vacas se presentan generalmente, durante el quinto o sexto mes de preñez. En general cada aborto subsecuente tiene lugar a una etapa posterior a la preñez. (Runnells, 1973).

Se ha demostrado por experimentación que el periodo de incubación es sumamente variable e inversamente proporcional al desarrollo del feto. Cuanto más adelantada esté la preñez el periodo de incubación será más corto. Si la hembra se infecta por vía oral en la época de servicio, el tiempo de incubación puede prolongarse a unos, 200 días, mientras si se le expone seis meses después de la monta, es de cerca de dos meses (Achá, 1.988).

#### **4.10. PATOGENIA**

Una vez que la brucella penetra al organismo a través de la vía digestiva, las mucosas nasofaríngeas o por otras como la conjuntiva, heridas e incluso la piel intacta y la vía respiratoria, sigue la multiplicación en las células endoteliales de los

ganglios regionales vecinos, de estos por la linfa pasan al torrente circulatorio produciendo en algunas ocasiones y durante algunos días trastornos febriles, en la sangre existen una gran cantidad de gérmenes pero otros llegan a territorios orgánicos, en los que por existir una circulación lenta es elevado el CO<sub>2</sub>, creándose con ello un medio adecuado para las brucellas. Estos órganos son ganglios linfáticos, tejido mamario, testículos, epidídimo, vesículas seminales, próstata, bazo e hígado. En caso de gestación el espacio interplacentario, así como el intestino, estomago y pulmón del feto son lugares de especial predilección por las bacterias (Merck y col., 1.992; Blood y col.,1.986).

En la matriz grávida con presencia de eritritol las brucellas proliferan con gran energía y de preferencia en el epitelio que reviste las vellosidades embrionarias del corium. Esto produce necrosis de las vellosidades y además una capa de exudado fibroso purulento, que poco a poco relaja la unión entre la placenta materna y el feto.

Las brucellas llegadas a las cubiertas fetales pasan por la sangre o deglución del líquido amniótico al cuerpo del feto en el que se multiplican y producen exudados serosos, procesos inflamatorios en el estomago, intestino delgado y en diversos parénquimas. La relación entre la placenta materna y el feto se ve afectado; el trastorno que con ello sufre la nutrición del feto y la enfermedad del mismo, puede acarrear su muerte y expulsión definitiva (Merck y col., 1.992; Blood y col., 1.992)

La muerte intrauterina y expulsión prematura del feto dependen del periodo de la preñez en que se verifica la infección y la velocidad con que se desenvuelven las alteraciones en la placenta y feto. Si la infección se verifica en uno periodo avanzado o algo relativo al proceso morboso, el feto es expulsado en el plazo normal o se reproduce simplemente parto prematuro (Blood y col., 1.992).

#### **4.11. SÍNTOMAS**

Los síntomas dependen del estado de inmunidad del rebaño. Las hembras preñadas no vacunadas, son altamente susceptibles, el signo principal es el aborto pasado el quinto mes de gestación (Blood y col., 1.992, Cotrina y col., 1.991).

La vaca que se dispone a abortar conserva un aspecto normal y presenta los signos precursores del parto; tumefacción de la vulva y el pezón esta abierto y tiene leche calostrual. También se producen nacimientos prematuros o a termino de terneros muertos o débiles. Son secuelas frecuentes del aborto la retención de la placenta y la metritis. Las infecciones mixtas pueden producir metritis que pueden ser agudas, con septicemia y muerte consecutiva ( Blood y col.,1.992).

La existencia de una gran cantidad de portadores en un hato puede causar una reducción de la producción lechera en un 20 a 25 %, esto se debe a la interrupción del periodo de lactancia debido al aborto y a la concepción demorada. En la vaca inseminada con semen infectado, los calores pueden volver repetidas veces.

En el toro las vesículas seminales, ampollas, testículos y epidídimo pueden estar infectados, como resultado, el microorganismo es excretado en el semen. En estos toros pueden demostrarse aglutininas en el plasma seminal y pueden ocurrir abscesos en los testículos. El microorganismos ha sido aislado de articulaciones artríticas ( Merck y col., 1.992; Achá y col., 1.988, Derivaux y col., 1.984, Ensminger, 1.981).

Se observa ocasionalmente orquitis y epididimitis, puede estar afectado uno o ambos sacos escrotales con tumefacción aguda y dolorosa y aumento hasta dos veces su tamaño normal, la tumefacción persiste durante largo tiempo y los testículos experimentan necrosis por licuefacción y quedan finalmente destruidos, los toros enfermos suelen ser estériles (Blood y col., 1.992, Cotrina y col., 1.991)

En casos agudos puede haber impotencia, fiebre moderada e infertilidad temporal o permanente, el dolor disminuye poco a poco, al cabo de tres semanas solo se nota un abultamiento del testículo y del epidídimo. Al poco tiempo estos órganos se encuentran duros a la palpación. La artritis es otro síntoma que se presenta en formas colectiva incluso en reses que abortan. Se manifiesta por hinchazón y dolor de las articulaciones, generalmente de las rodillas pero puede encontrarse en todo el cuerpo (Hutyra y col., 1.973, Achá y col., 1.986, O.P.S./O.M.S., 1.986).

#### **4.12. ALTERACIONES HISTOLOGICAS**

##### **Lesiones en la glándula mamaria**

La reacción producida por la *B. Abortus* en la glándula mamaria del ganado bovino es una mastitis intersticial crónica focal. En los focos el exudado celular consiste de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. Las células gigantes se presentan ocasionalmente. Los macrófagos y los linfocitos son la células principales en la mayoría de los focos. Generalmente mas tarde se presentan abscesos y mas tarde el exudado celular consiste, principalmente, de neutrófilos. Existe hiperplasia del tejido conectivo intersticial, el cual origina necrosis en la ubre. A medida que la enfermedad progresa, existe una disminución en la cantidad de tejido secretorio. Los cambios mamarios dan como resultado una leve disminución en la producción de leche ligeras alteraciones en las características de la misma. Existe una pequeña cantidad de leucocitos y cantidad de cloruros en la secreción mamaria. (Runnells, 1973).

##### **Lesiones en otros Órganos del ganado**

Las lesiones consisten en una inflamación aguda o crónica, la cual es de tipo neutrófilo o macrocítico. Las alteraciones no son especificas y pueden ser

confundidas fácilmente con las de la tuberculosis, la blastomicosis u otras inflamaciones crónicas. La verdadera identificación de la lesión depende del descubrimiento de los microorganismos (Runnells, 1973).

#### **4.13. ALTERACIONES ANATOMICAS**

En algunos puntos o en toda su extensión, las cubiertas fetales ofrecen una infiltración gelatiniforme amarilla con copos dispersos de fibrina y pus, están en ocasiones engrosadas y a veces presentan estrías hemorrágicas. La placenta fetal es amarilla pálida en algunos puntos o en toda la extensión y esta cubierta de fibrina y de pus, gris o amarillo verdoso o de un exudado graso amarillento (Hutyra y col., 1.973)

En el estómago del feto, en el cuajar se hallan masas mucosas coposas, amarillentas o blancas debajo de las serosas, en las mucosas gastroentéricas, en la vejiga urinaria pueden verse puntos o estrías hemorrágicas. En las cavidades serosas cuyas paredes pueden estar tapizadas de coágulos de fibrina, se halla un liquido rojizo, el tejido subcutáneo y el intermuscular, pueden estar infiltrados de serosidad sanguinolenta. Además hay tumefacción mayor o menor de los ganglios linfáticos y del bazo, a veces con foquitos inflamatorios necróticos dispersos en ellos (Hutyra y col., 1.973).

En fetos recién nacidos, se observan neumonias en formas de focos, causados por brucellas. El cordón umbilical esta con frecuencia infiltrado de serosidad y algunos terneros nacen casi cubiertos de un exudado purulento amarillento. (Ensminger y col., 1.981; Hutyra y col., 1.973).

En las vacas preñadas se hallan entre la mucosa uterina y el córion cantidades mas o menos grandes de un exudado untoso, mucoso o espeso, pardo sucio y mezclado con copitos y grumos mayores de pus; además de algunos puntos, los cotiledones



ofrecen alteraciones análogas a la de las cubiertas fetales expulsadas. (Ensminger y col., 1.981; Hutyra y col., 1.973).

En la ubre, en el parénquima, en los intersticios y en los conductos excretores, se observan foquitos inflamatorios, los cuales en casos crónicos están formados por células gigantes ( Ensminger y col., 1.981; Hutyra y col., 1.973).

En los órganos genitales masculinos, pueden haber hemorragias y focos necróticos en las vesículas seminales y en cacos crónicos, aparecen tanto en sus paredes como en las ampollas de los cordones espermáticos mas o menos engrosadas y endurecidas, a causa de la proliferación de tejido conjuntivo, los testículos y epidídimos presentan focos de pus e inflamaciones necróticas hasta del grueso de avellanas, el testículo esta necrosado y transformado en una masa homogénea, amarillo pálido, contenida en una cavidad vaginal llena de exudado seropurulento. En casos crónicos, el testículo, junto con el epidídimo, pueden llegar a tener el tamaño de la cabeza de un niño, a consecuencia de la hiperplasia del tejido conjuntivo (Ensminger y col., 1.981; Hutyra y col., 1.973).

#### **4.14. DIAGNÓSTICO**

Es difícil el diagnostico de la causa del aborto y la orquitis en un animal aislado o un grupo de bovinos debido a la multiplicidad de las causas que pueden intervenir, para el diagnostico seguro, se deberá recurrir al laboratorio y entre las pruebas que podemos realizar tenemos las siguientes: Bacteriológicas, serológicas y alérgicas (Brunner y col., 1.970).

##### **4.14.1. Prueba Bacteriológica**

Consiste en aislar las brucellas de órganos, donde se pueden encontrar en mayor concentración como ser: Órganos del feto (hígado, pulmón y estomago), ganglios, leche, secreciones vaginales, plasma seminal y sangre(Achá, 1991).

#### **4.14.2. Pruebas Serológicas**

Se usan extensamente en la brucelosis humana y animal, existe una gran variedad de pruebas para detectar los anticuerpos específicos antibrucellas en suero, plasma sanguíneo y otros líquidos orgánicos, no existe ninguna prueba serológica que permita descubrir la totalidad de casos de brucelosis, en el diagnostico individual se logran los mejores resultados cuando se aplican varios procedimiento que luego deben ser interpretados en conjunto (Hutyra y col., 1.973; Brunner y col., 1.970).

##### **4.14.2.1. Seroaglutinación Rápida con Antígeno Bufferado**

Esta prueba ofrece la ventaja de ser rápida y sencilla, lo que permite aplicarlo en escala masiva en las campañas de control, erradicaron y en muestreos para establecer la prevalencia de la enfermedad. Sin embargo el método tiene el inconveniente de las aglutininas inespecíficas (Lidivet, 2002).

#### **Desarrollo de la Prueba**

- Lavar, desengrasar con alcohol etílico y secar cuidadosamente la placa de vidrio. En ambientes con temperaturas inferiores a 18 °C o superiores a 26 ° C no debe trabajarse.
- Con una pipeta de Bang en posición de 45 ° y apoyada sobre una placa de vidrio depositar 0.08 ml de suero.

- Mantener el suero en posición perpendicular a la placa y desde una altura de 3 cm colocar una gota (0.03 ml) de antígeno, sin burbujas, sobre el suero.
- Mezclar bien el suero con el antígeno, abarcando una superficie de 3 cm de diámetro.
- Retirar la placa de vidrio e imprimir dos o tres movimientos rotativos para homogenizar las mezclas.
- Colocar la placa sobre el aglutinoscopio. Cubriendo con la tapa para evitar la evaporación, permaneciendo la luz apagada y se comienza a tomar el tiempo.
- Efectuar una nueva rotación a los cuatro minutos.
- A los ocho minutos rotar nuevamente la placa y con la luz encendida proceder a la lectura(Lidivet,2002).

### **Interpretación**

**Reacción positiva:** Cuando se forman grumos.

**Reacción negativa:** Cuando la mezcla del suero y del antígeno es de turbidez homogénea y sin grumos.(Lidivet, 2002)

#### **4.14.2.2. Prueba de aglutinación en tubo**

Esta se puede usar como prueba diagnóstica básica y también como método para corroborar los resultados obtenidos con otras pruebas serológicas por ejemplo la de placa. La prueba está sujeta a menos errores de manipulación y presentan menos reacciones inespecíficas que las de la prueba en placa. Es difícil eliminar la

enfermedad en una región o país aplicando únicamente la seroaglutinación, ya sea en placa o en tubo, pues no detecta todos los animales infectados (Hutyra y col., 1.973; Brunner y col., 1.970).

#### **4.14.2.3. Fijación de complemento**

Es otra prueba sensible y específica para descubrir los anticuerpos de brucellas, se ha demostrado que la correlación entre la infección y la reacción positiva es más estrecha en esta prueba que en la seroaglutinación.

Se considera que la prueba de fijación de complemento es más específica, pero resulta muy laboriosa, complicada e intervienen muchos elementos y variantes que afectan su uniformidad (Angulo, 2001).

#### **4.14.2.4. Prueba de Card Test (Rosa de Bengala)**

La prueba de la tarjeta y del antígeno tamponado es un procedimiento rápido cualitativo de aglutinación macroscópica.

Otros procedimientos como la prueba de anillo en leche se aplican con éxito en la vigilancia epidemiológica de áreas controladas y libres de infección para descubrir hatos presuntamente infectados y también para conocer la tasa de los hatos infectados en una cuenca lechera. La prueba de aglutinación en plasma seminal tiene valor especial en toros ya que un reproductor, puede ser serológicamente negativo, no obstante pueden presentar lesiones activas en los genitales. Algunos países principalmente Europeos, también utilizan una prueba alérgica y últimamente se ha incorporado la prueba de ELISA, que posee gran sensibilidad y es de valor práctico para el rastreo de animales (Merck y col., 1.992; Hutyra y col., 1.973; Brunner y col., 1.970,

#### **4.14.2.5. Prueba de ELISA**

Últimamente se viene empleando la prueba de Elisa, que posee gran sensibilidad y especificidad, para descubrir anticuerpos en la leche y en el suero. La prueba de Elisa se ha utilizado también para descubrir antígenos de Brucellas en la descarga vaginal (Merck, y col., 1992; Nicolet, 1986;).

Desde hace algún tiempo están apareciendo diferentes trabajos y publicaciones sobre la aplicación de los test enzimáticos al diagnóstico serológico de la brucelosis. En casi todos ellos el antígeno ligado a la fase sólida es el lipopolisacárido de la pared bacteriana (*Brucella abortus* 99) más o menos purificado. En ocasiones se ha utilizado el microorganismo entero y en otros proteínas de membrana. Del análisis de la literatura está claro que estos test pueden detectar inmunoglobulinas específicas con sensibilidades que oscilan entre el 93 y 97% con una especificidad del 98%. Esta sensibilidad parece aumentar si el antígeno empleado es de naturaleza proteica. La aplicación experimental de estas pruebas evidenció la posibilidad de diagnosticar infecciones brucelares en estadios muy tempranos en los que la serología convencional aún no era positiva e incluso en algunos casos, confirmados por aislamiento del microorganismo, en los que nunca fue positiva. La valoración de los resultados obtenidos con ELISA debe de ser individualizada esto es, comparando las concentraciones de las diferentes clases de anticuerpos a lo largo de la enfermedad medidas contra un *cut-off* que deberá establecerse (Picazo y Fuertes , 1998).

La principal aportación de ellas es la posibilidad de medir por separado las diferentes clases de inmunoglobulina IgM, IgG, e IgA específica. Los trabajos más interesantes son aquellos que tratan de correlacionar estos niveles con los resultados de las pruebas clásicas y con la situación clínica del animal. En este sentido, se ha obtenido una buena correlación entre los niveles de IgM y los títulos de seroaglutinación así como los de IgG con la prueba Coombs y la Fijación de

Complemento. Esto indica que las concentraciones de IgM están más elevadas en la fase aguda de la enfermedad que en las recaídas y fases crónicas en las que el predominio de anticuerpos se debe a la IgG (Picazo y Fuertes , 1998).

Desde el punto de vista cinético está suficientemente demostrado que durante la fase aguda existe una respuesta de anticuerpos clásica: aumento de IgM e IgG y que a lo largo de la evolución el título de IgM va descendiendo. Aunque algunos autores postulaban lo contrario los anticuerpos de clase IgM no vuelven a elevarse de forma significativa en los casos de una nueva recaída o de reinfección. La IgM puede detectarse con títulos decrecientes durante unos 8-10 meses. En los casos que evolucionan a la curación, la IgG específica puede ser detectada con títulos progresivamente decrecientes aproximadamente unos 30 meses y sólo se mantienen estables y elevados o aumentan en los casos de reinfección o recaída. ELISA IgA alcanza igualmente valores elevados en todas las formas de enfermedad y ocupa una posición intermedia entre ambas con persistencias medias de 18 meses. Al igual que ELISA IgG se eleva en las recaídas y reinfecciones. El problema de la utilización de estas pruebas surge de la poca experiencia clínica que existe para correlacionar los resultados con la evolución clínica. Pocos autores se han planteado la realización de ELISA total (IgG+IgM+IgA) como prueba diagnóstica única de gran sensibilidad para la búsqueda de anticuerpos. En este sentido parece que en el 99% de los animales con aislamiento positivo de brucella tienen esta prueba positiva a pesar de poder ser negativos alguno de los test clásicos (Picazo y Fuertes , 1998).

La medida de la avidéz de los anticuerpos por su antígeno también puede cuantificarse fácilmente con la metodología ELISA. Existen algunos trabajos que demuestran con esta técnica baja avidéz en el 70% de los animales con fase aguda y alta avidéz en el resto de las formas clínicas (Picazo y Fuertes , 1998).

La aplicación de ELISA en la infección del SNC ha abierto los horizontes de su diagnóstico. El 99% de los LCR testados en estos casos son positivos para IgG y aproximadamente un 70-80% lo son también para IgM e IgA. Es una prueba muy específica de tal manera que su negatividad descarta prácticamente la neurobrucelosis. En esta forma clínica sólo la positividad de las pruebas clásicas ( Rosa de bengala, aglutinación y coombs) puede confirmar la afectación del SNC pero existen falsos negativos por falta de sensibilidad (Picazo y Fuertes , 1998).

Las técnicas ELISA pueden ser usadas como pruebas de criba (*screening*) o como pruebas de confirmación. No obstante, la eficacia de ELISA en términos de sensibilidad y especificidad de diagnóstico dependerá de la especificidad a la inmunoglobulina que posea el conjugado, así como del factor de dilución elegido para las muestras problema. El empleo de conjugados de especificidad de amplio espectro, así como el de diluciones bajas, redundará en una prueba de criba de elevada sensibilidad de diagnóstico. Por el contrario, los conjugados de especificidad de espectro reducido (anti-IgG<sub>1</sub>), y las diluciones altas del suero problema, resultarán en una prueba de confirmación de especificidad de diagnóstico elevada.

La prueba se lleva a cabo en miniplacas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. La elección de la miniplaca tendrá un ligero efecto sobre la eficacia de la prueba, en términos de la actividad de fondo a la que dará lugar. Cuando se utiliza el antígeno LPS, las miniplacas de adherencia proteica entre débil y media proporcionan el nivel más bajo de ruido de fondo (OIE, 1999).

### **ELISA indirecta**

Se han descrito numerosas variantes de esta técnica ELISA indirecta. El mercado ofrece la posibilidad de adquirir diversos ensayos comerciales, pero sólo se

recomienda el uso de aquellas pruebas ELISA que utilizan lipopolisacárido (LPS) liso de *B. abortus*. El espectro de isotipos y subclases de inmunoglobulina bovina detectables por ELISA depende de la especificidad del conjugado anti-inmunoglobulina (o anticuerpo secundario) que se emplee en la prueba. Un ELISA indirecto específico para la detección de anticuerpos contra la IgG<sub>1</sub> da resultados que equivalen casi exactamente a los de la prueba de FdC. Esta prueba puede ser utilizada para el estudio de muestras tanto de leche como de suero. La utilización de conjugados específicos tanto para la cadena pesada como para la ligera de la molécula de inmunoglobulina proporciona una sensibilidad de diagnóstico en cierta medida mayor que la prueba de FdC, aunque entraña una cierta pérdida de la especificidad de diagnóstico. Al igual que las demás pruebas convencionales empleadas para el estudio serológico de la brucelosis bovina, el ELISA indirecto no permite distinguir entre anticuerpos resultantes de una infección y anticuerpos inducidos por vacunación con la cepa 19.

El principio general de un ELISA indirecto consiste en tapizar la fase sólida de la placa de microtitulación con el antígeno y añadir después la muestra problema. Tras un lavado para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido, se añade inmunoglobulina antibovina marcada con enzima. Tras un nuevo lavado, se añade la solución substrato / cromógeno. Si hay inmunoglobulina en el pocillo, se produce una reacción de coloración que puede medirse con fotómetro. La intensidad de la coloración es proporcionada a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra problema. Esta prueba sirve para animales no vacunados (OIE, 1999).

### **ELISA competitiva**

El procedimiento es similar al de ELISA indirecta, la diferencia radica en que para esta prueba se utiliza un anticuerpo monoclonal específico, para la cadena lateral O que competirá simultáneamente con los anticuerpos presentes en las muestras de campo.



Los anticuerpos monoclonales, al ser más específicos tendrán la capacidad de reaccionar con los antígenos de los pocillos y no dan oportunidad a que reaccionen los anticuerpos producidos por la vacunación. Al producirse este fenómeno, en la reacción final, a diferencia de la prueba de ELISA indirecta, al adicionar el sustrato los casos positivos no presentan coloración.

Son positivos aquellos que no presenten coloración y negativos los que presenten coloración. Esta prueba sirve para animales vacunados (Lidivet, 2002)

A continuación se describen los pasos para el procedimiento de la prueba de Elisa Competitiva:

- Inmovilización del reactivo a la matriz
- Periodo de incubación
- Etapa de Bloqueo
- Procedimiento de lavado
- Adición de la muestra de prueba (control + Ac. monoclonal)
- Etapa de incubación
- Procedimiento de lavado
- Adición del sistema de detección ( conjugado)
- Periodo de incubación
- Procedimiento de lavado
- Enumeración de los sistemas de detección (sustrato cromogeno)
- Evaluación de los datos (Nielsen y col., 1.996)

### **Desarrollo de la prueba de Elisa competitiva**

Tapizado de la placa : **Utilizar placas Polyshorp**

- El antígeno de tapizado esta 1/1000, en este caso se utiliza 11 ul de antígeno, mas 11 ml de diluyente ( coating buffer pH 9.6 ).

- Luego se coloca 100 ul en cada pocillo.
- Se incuba la placa a 4 C toda la noche/ o 1 hora en la estufa a 37 C.
- Para usar la placa se debe lavar cuatro veces y secar.

### **Adición de sueros controles y muestras**

Se debe hacer en placas de dilución y los controles es mejor diluir en viales. El buffer diluyente contiene: EDTA y EGTA.

- Se adiciona 135 ul de buffer diluido en cada pocillo, luego 15ul de muestra o controles.
- Luego de transferir de la dilución preparada 50ul a cada pocillo donde están las muestras.

CC - 100ul de diluyente

C+, C++, C+++ y C-50ul de dilución preparada anteriormente.

Cam ( anticuerpo monoclonal ) 100 ul diluido 1/1000.

Para una placa se prepara: 6ul de anticuerpo monoclonal con 6ml de diluyente.

- Luego se adiciona a todos los controles y a las muestras 50 ul de anticuerpo monoclonal, quedando con 100 ul todos los pocillos.
- Se incuba durante 30 minutos en estufa a 37 C.
- Se lava cuatro veces y seca.

### **Preparación del conjugado**

- Este conjugado esta en una dilución de 1/7000. Se necesita 2 ul para 14 ml de diluyente buffer ( el mismo de ELISA indirecta pH 7.4 ).
- Se adiciona 100 ul a cada pocillo.
- Se incuba durante 30 minutos en estufa a 37 C.
- Lavar cuatro veces y secar.

### **Adición del sustrato cromógeno**

Preparar 5 minutos antes de terminar la anterior fase.

- Buffer phosphato citrato pH 5 ( ABTS es una tableta para 5 ml de diluyente y por placa necesitamos 3 tabletas para preparar 15 ml por placa, al mismo tiempo se adiciona 75 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .
- Se adiciona 100 ul a cada pocillo, del cromógeno preparado anteriormente.
- Se deja 15 minutos en la estufa.
- Se coloca el frenado (SDS).
- Se lee la placa con filtro 405/en el programa PROCOOM.

### **4.15. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL**

#### **4.15.1. Enfermedades bacterianas**

La **leptospirosis**, causada por la *Leptospira icterohaemorrhagiae*, que produce el aborto en los últimos meses de gestación con cotiledones de color amarillento mientras que en la brucelosis puede desprenderse fácilmente el pelo e incluso puede faltar al llevar varios días de muerto y solo puede diferenciarse de esta por examen de laboratorio (Blood y col, 1992).

La **campilobacteriosis**, causada por *Campylobacter fetus* sub spp, *veneralis*, baja la fertilidad en un 15% produciendo abortos hasta los cuatro a seis meses por regla general y la placenta se suele encontrar edematosa, hiperémica y a veces apergaminada. El feto suele presentar exudado sanguinolento en sus cavidades corporales y contenido turbio y floculento en el abomaso, en la brucelosis suele ser rojo grisáceo. Haciendo frótis del contenido del abomaso y utilizando tinción de gram o simplemente por azul de metileno se podrán observar los microorganismos (Blood y col., 1.992).

**Listeriosis**, causada por *Listeria monocytogenes*, produce abortos esporádicos en el último tercio de la gestación acompañadas de graves metritis que evoluciona septicémicamente, hay necrosis y exudación purulenta en las vellosidades. (Blood y col., 1.992, Nicolet, 1.986)

#### **4.15.2. Enfermedades víricas**

La **Rinotraqueitis infecciosa**, produce aborto en el último trimestre de la gestación o partos prematuros con terneros débiles o crías inviables, con retención de secundinas, la cual se representa edematosa, el feto presenta edema subcutáneo, hígado hipertrófico decolorado y petequias subepicardicas (Blood y col., 1.992)

#### **4.15.3. Enfermedades por protozoos**

La **trichomoniasis** producida por *Trichomonas foetus*, transmitida por el acoplamiento sexual de toros infectados. El aborto se produce antes del cuarto mes de gestación en maceración purulenta, acompañada de exudado floculoso blanco amarillento, se puede apreciar el germen en gota pendiente a partir del contenido uterino expulsado, por sus movimientos flagelados. (Blood y col., 1.992).

La **Toxoplasmosis**, producida por el *Toxoplasma gondii*, provoca abortos que mas bien pueden clasificarse en partos prematuros, donde las crías pueden nacer vivas o morir a las pocas horas de nacer. La placenta presenta cotiledones negruzcos con nódulos blanquecinos de pequeño tamaño caseosos o calcificados (Blood y col., 1.992).

#### **4.15.4. Enfermedades producidas por hongos**

También pueden producir abortos micóticos al final de la gestación y con lesiones que pueden confundirse con los de la brucelosis, pero los fetos suelen ser normales o con dermatitis en los ojos, dorso y generalmente en las regiones prominentes. Su evolución es de carácter crónico acompañados a veces de celos irregulares y si hubiera habido metritis crónica, la esterilidad es total (Blood y col., 1.992).

#### **4.16. INMUNOLOGÍA**

La infección con brucella por lo general induce respuestas inmunológica humorales y mediadas por células. En magnitud y duración de estas respuestas pueden influir muchos factores, como la virulencia de la cepa infectante, la cantidad de inóculo, la edad, sexo, gestación, especie y estado inmunológico del huésped. Tanto las

respuestas de anticuerpos como las mediadas por células son útiles para el diagnóstico, pero las primeras han resultado más fáciles de medir cuantitativamente. El patrón exacto mostrado en la serie de pruebas serológicas disponibles para detectar anticuerpos contra brucella depende de la especie de huéspedes estudiados y de la distribución de la actividad de los anticuerpos entre los diversos isotipos inmunoglobulínicos (FAO, 1986).

La respuesta inmunitaria en el curso de la infección brucelar es conocida principalmente en la Brucelosis bovina. Los conocimientos inmunológicos tienen mucha importancia para interpretar el diagnóstico serológico. La respuesta humoral depende de la producción de inmunoglobulinas de varias clases. Poco después de la infección aparece la IgM, la cual puede detectarse por aglutinación y en parte por la fijación de complemento y de la prueba del anillo en la leche. Después son demostrables la IgM<sub>1</sub>, con la reacción de la fijación de complemento (eventualmente con la prueba del anillo) y la IgG<sub>2</sub> por aglutinación. Sigue más tarde la producción de IgA (comprobable con la aglutinación y la prueba de anillo). El nivel de IgM baja paulatinamente en tanto que la IgG y la IgA persisten en concentraciones altas (Nicolet, 1.986).

La IgG<sub>2</sub>, actúa específicamente contra *B. abortus*. Las concentraciones totales de IgG<sub>2</sub> difieren mucho en las reses; son afectadas por factores genéticos y aumentan con la edad y, probablemente, con el grado de exposición antigénica total. La proporción de anticuerpos IgG<sub>2</sub> en relación con los IgG<sub>1</sub> se eleva en el momento de la parición, cuando se transfiere selectivamente IgG<sub>1</sub> al calostro. La proporción de anticuerpos IgG<sub>2</sub> específicos parece aumentar con las exposiciones múltiples al antígeno de Brucella (FAO, 1986).

Está muy generalizada la opinión que la producción sostenida de anticuerpos IgG<sub>1</sub> es característica en la infección crónica, pero que los anticuerpos IgM persisten en las

reses inmunizadas con la cepa 19. La prueba de fijación de complemento es más eficaz que la de aglutinación en tubo para detectar la función crónica, mientras que con esta última prueba se obtiene más reacciones persistentes después de la inmunización con la cepa 19. Se piensa que esto obedece a que la prueba de aglutinación en tubo es más sensible a la IgM que los otros isotipos de anticuerpos, en tanto que la prueba de fijación del complemento es particularmente sensible a la IgG<sub>1</sub>. (FAO, 1986).

#### **4.17. TRATAMIENTO**

En términos generales no se hace ningún tipo de tratamiento. Han fracasado en el intento de eliminar la infección, se han realizado ensayos con plasma ovino, sulfadiacina, estreptomina y clortetraciclina, administrada por vía parenteral y las dos últimas como infusiones en la ubre. Para eliminar a los bovinos portadores de los hatos infectados, en algunos informes se ha recomendado un tratamiento único con oxitetraciclina (10g), pero esos informes no han sido confirmados. Los caballos que presentan fístulas en la cruz y pruebas positivas de aglutinación de suero, comúnmente son tratados con vacunación contra *Brucella abortus*, cepa 19. Se administra tres inyecciones de vacuna con diez días de intervalo entre cada inyección. Según informes un tratamiento que ha dado éxito en caballos infectados es la administración de cloranfenicol (1g/100 kg de p.v./día), durante 12 a 20 días (Blood y col., 1.992).

#### **4.18. PREVENCIÓN Y CONTROL**

Como medida preventiva la higiene juega un papel muy importante que incluye el aislamiento o eliminación de las fuentes de infección, incineración de placentas y fetos abortados, la desinfección de regiones infectadas. Tienen importancia particular que las vacas infectadas sean aisladas durante el parto y todos los bovinos,

ovinos, caprinos, y porcinos nuevos al ingresar a la granja deben ser sometidos a la pruebas correspondientes. Entre otras medidas aconsejables figura la educación sanitaria tratando de llevar al conocimiento publico. Principalmente en el medio rural la vía mas frecuente de contagio. (Hutyra y col., 1.973).

Actualmente se han vacunado más de 6 millones de terneras por vía subcutánea con la dosis recomendada de  $1 - 3.4 \times 10^{10}$  microorganismos, sin efectos deletéreos. El bovino gestante se puede vacunar con seguridad por vía subcutánea con  $10^9$  microorganismos de RB51, sin que se produzca aborto o placentitis. La inoculación intravenosa de bovino gestante con  $10^{10}$  microorganismos provocó infección placentaria y fetal pero no aborto, lo que sugiere que la vacunación del bovino adulto no gestante con una dosis completa, debería ser segura.

Sin embargo, informes no publicados de la Colorado Serum Company, que fabrica la vacuna en U.S.A. indican que la vacunación de bovinos gestantes con una dosis reducida de ( $1 \times 10^9$ ) de la cepa RB 51 puede dar abortos en un 0.5% de los vacunados y, por lo tanto, la vacunación de hembras gestantes debe ser evitada o empleada solo en áreas de alta incidencia al comienzo del programa de erradicación.

Desde 1996, la cepa RB 51 de *B. abortus* es la vacuna oficial en USA para la profilaxis de la brucelosis en el ganado bovino y el empleo de la cepa 19 ha sido prohibido. Otros países donde la vacuna ha recibido aprobación oficial y se emplea actualmente son: Argentina, Chile, Colombia, Costa Rica, México, Paraguay y Venezuela. Cada país usa métodos ligeramente diferentes para administrar la vacuna. En USA se vacunan las terneras por vía subcutánea entre 4 y 12 meses de edad por vía subcutánea con una dosis de  $1-3.4 \times 10^{10}$  microorganismos viables de la cepa RB51. La vacunación de los mayores de 12 meses se lleva a cabo sólo bajo autorización del Estado o de los funcionarios federales de Sanidad Animal y la dosis recomendada es de  $1 \times 10^9$  En otros países se recomienda vacunar las terneras de 4-



12 meses de edad con una dosis de  $1-3.4 \times 10^{10}$  y revacunación a partir de los 12 meses con una dosis similar para evitar interferencias con la posible inmunidad maternal y como refuerzo. La experiencia de campo indica que la vacunación de hembras gestantes puede inducir un pequeño porcentaje de abortos, en particular si los animales no se han vacunado como terneras (<http://www.vettek.com>).

#### **4.18.1 Eliminación mediante exámenes y sacrificios**

**1.-** Todas las reses, hembras de un año o mas y los toros, se identificaran correctamente y de forma permanente.

**2.-** Se toman de muestras de todas las reses y se realizan pruebas serológicas; se aparta a los animales positivos y 30 a 60 días después se realizan otras pruebas, si no encuentran positivos a los seis meses se harán otras pruebas. Si no se encuentran positivos se considerara al rebaño exento de Brucelosis.

**3.-** Se recomienda la prueba de bufferada como prueba de preselección, pero las positivas deberán examinarse nuevamente, con las pruebas de Elisa indirecta o competitiva.

**4.-** Los animales positivos deberán apartarse del rebaño lo mas pronto posible y sacrificarse.

**5.-** Se debe prohibir la venta de vacas de mas de un año provenientes de rebaños infectados, a menos que se vayan a mandar directo al matadero. Las exhibiciones de los mismos, también quedan prohibidas.

**6.-** Es preciso establecer disposiciones para prevenir la introducción de la infección en instalaciones exentas de la enfermedad.

**7.-** Cuando la erradicación esta progresando en una región, es necesario interrumpir la inmunización ya que las ocasionales reacciones persistentes de origen animal causan problemas; se recomienda hacerlo cuando la prevalencia alcanza el 0.2%.

**8.-** Cuando las reses están en contacto con ovejas o cabras infectadas por *B. melitensis*, será necesario eliminar también estos animales, ya que la bacteria se transmite fácilmente a las reses.

**9.-** De vez en cuando se encontraran rebaños problemáticos; es decir aquellos que continúan teniendo animales positivos después de varias pruebas. Es preciso localizarlos rápidamente y dedicarles especial atención.

**10.-** Deben tomarse medidas para vigilar el estado de los rebaños exentos de Brucelosis. En ganado lechero se puede lograr esto realizando la prueba de anillo en leche. En ganado de carne algunas veces puede dar resultados el revisar la sangre de los animales sacrificados en los mataderos (FAO, 1986).

En las zonas de pastoreo extensas y cuando los rebaños son grandes, tal vez sea imposible aplicar el régimen de exámenes y sacrificios antes descritos. Las condiciones del terreno y el clima, pueden impedir reunir el ganado con intervalos regulares para efectuar las pruebas.

Para superar esos problemas, quizás se pueda aplicar en algunas partes del mundo, en el método de segregación de terneros ideado en Australia. Con este método se someten a las pruebas a los terneros en el momento del destete y se sacrifican aquellos que presenten reacciones positivas. Los terneros con resultados negativos se vacunan con vacuna 45/20.

Todo nuevo animal con una reacción positiva es sacrificado y los que pasan la prueba se crían apartados a las reses no sometidas a prueba (Comité Mixto FAO/OMS, 1.986)

#### **4.18.2 Inmunización**

En la actualidad la única forma de reducir la tasa de infección brucelosa en las zonas de prevalencia elevada es la inmunización en masa. Se deben usar vacunas atenuadas siempre que se pueda asegurar mediante una cadena frigorífica que conservaran toda su potencia. Las vacunas inactivadas son más estables pero, en general su potencia es menor y se requieren inoculaciones más frecuentes.

Cuando se aplica sistemáticamente la inmunización de terneros en una región y se logra una cobertura del 80% o más, se puede esperar que la incidencia se reducirá gradualmente a un índice bajo. Comúnmente se restringe la inmunización a las terneras de tres a seis meses de edad. En ciertos casos, se ha ampliado hasta ocho meses. Esta restricción en cuanto a la edad causa una respuesta mínima de anticuerpos, que tiene tiempo antes de desaparecer antes de que el animal alcance la edad en que son necesarias las pruebas. No obstante siempre se encuentra una pequeña proporción de animales con reacciones persistentes (Blood y col, 1992, FAO, 1986).

En EEUU se recomienda vacunar todas las terneras con la dosis completa (10-34 miles de millones de bacterias vivas en 2 ml) entre 4 -12 meses de edad vía subcutánea. Los adultos se pueden revacunar con una dosis reducida (mil millones de bacterias vivas). Sin embargo, estas recomendaciones son para las condiciones imperantes en un país en que prácticamente se alcanzó la erradicación y la incidencia de la enfermedad es baja. En países con incidencia más alta las recomendaciones pueden ser distintas. En general recomendaríamos: Vacunar todas las terneras a la edad de 4 - 10 meses de edad con dosis completa subcutáneamente.

La edad óptima sería entre 5 -8 meses. Los machos no se vacunan debido a que la inmunización en la mayoría de los casos provoca los síntomas característicos de la brucelosis. Revacunar a los 12-16 meses de edad o antes del encaste (unas 2-3 semanas antes de poner con el toro o inseminación). Esto aumenta la inmunidad en los animales.

Mientras más severo es el problema de la brucelosis más recomendable es la revacunación. Animales sobre 12 meses de edad se pueden revacunar con la dosis completa o reducida. Dependiendo de la severidad de la situación, los animales revacunados pueden revacunarse nuevamente; esperar por lo menos 6 meses desde la última revacunación.

Es mejor evitar la vacunación de animales hembras preñadas ya que existe un pequeño riesgo de aborto. El riesgo de aborto puede ser más alto con la dosis completa.

Se pueden revacunar con cepa RB51 animales que fueron vacunados previamente con cepa 19. Si la vacunación con cepa 19 indujo seropositividad, la vacunación con RB51 no eliminará esta reacción.

Qué hacer con un predio con alta incidencia de Brucelosis con abortos. En este caso, se recomendaría vacunar todas las hembras del predio (incluso las hembras preñadas) y luego seguir con el programa recomendado anteriormente. La incidencia de abortos debido a la infección bajará después de la vacunación. (<http://www.vettek.com>).

## 4.19. VACUNAS

Se dispone de vacunas de escasa virulencia preparadas con microorganismos vivos, como la cepa 19 de *B abortus*, vacunas inactivadas con coadyuvante oleoso, como la 45/20 y atenuadas como la RB51. Cada una de ellas presenta sus ventajas e inconvenientes. (FAO/).

### 4.19.1 Brucella abortus cepa 19

La inoculación del ganado con cepa 19 induce una protección significativa contra abortos o infecciones causadas por cepas virulentas de *B. abortus* y da inmunidad casi de por vida contra la brucelosis. Aunque la cepa 19 es efectiva en entregar protección duradera contra la brucelosis, tiene varias propiedades desventajosas. Una desventaja importante radica en que la vacunación del ganado con cepa 19 induce respuestas serológicas que no pueden diferenciarse fácilmente de las respuestas inducidas por las cepas de campo. Una segunda desventaja son las observaciones que indican que la cepa 19, aunque menos virulenta que las cepas de campo, puede inducir la artritis en las vacunaciones de terneras. La exposición accidental de personas a la cepa 19 puede inducir síntomas clínicos de brucelosis.

Para el control de la brucelosis bovina en áreas enzóticas con alta prevalencia se recomienda la vacunación. La vacuna de elección es la cepa 19, consagrada por su uso universal, la protección que confiere durante toda la vida útil del animal y su bajo costo. Para evitar su interferencia con el diagnóstico se recomienda limitar la vacunación a animales de poca edad (terneras de cuatro a ocho meses) que pierden rápidamente los anticuerpos originados por la vacuna. El objetivo principal de un programa de vacunación sistemática y obligatoria de terneras en una zona o país, es reducir la tasa de infección y obtener rebaños resistentes a la brucelosis para luego emprender la erradicación. En zonas o países de baja prevalencia se puede proceder

a un programa de erradicación que consiste en aplicar principalmente al rebaño repetidas pruebas serológicas de diagnóstico, eliminando los animales reactores positivos hasta la eliminación completa de los focos de infección (Hutyra y col., 1.973).

Se ha estimado que la vacunación con cepa 19 no brinda una protección absoluta, solo el 65 – 70% de los animales vacunados están completamente protegidos. La dosis sugerida es de 3.000 a 10.000 millones de microorganismos vivos por dosis (2ml), aplicados por vía subcutánea a terneras de 3 a 8 meses de edad (OPS/OMS, 1999)

No se recomienda la vacunación de los machos, ya que en ellos las aglutininas persisten por periodos mas prolongados, además la *Brucella* se localiza en el tracto genital (Cotrina et., 1.991).

#### **4.19.2. *Brucella abortus* 45/20**

La vacunación con cepa 45/20 generalmente se asocia con títulos transitorios de baja magnitud en pruebas de diagnóstico de brucelosis, aunque la vacunación con cepa 45/20 ha demostrado ser eficaz en el ganado, la mayoría de los estudios que comparan la eficacia de las cepas 19 y 45/20 en el ganado han concluido que la cepa 19 es superior en cuanto a la protección contra la infección o aborto causado por cepas virulentas de *B abortus*.

No obstante, las vacunas 45/20 pueden usarse en animales de cualquier edad y también en las hembras preñadas.

Comúnmente se consideran necesarias dos dosis de vacunas 45/20 con un intervalo de 6 a 12 semanas para inducir una inmunidad adecuada; se recomienda además administrar una dosis de refuerzo al año (FAO/OMS, 1986).

#### **4.19.3. Brucella abortus RB 51**

La cepa RB51 es una variante rugosa de la *Brucella abortus* de los bovinos. Ya que RB 51 no expresa nada, o cantidades mínimas de la cadena lateral O del lipopolisacarido, el ganado vacunado con esta cepa permanece seronegativo ante las pruebas de diagnóstico convencionales de brucelosis.

La administración de la cepa RB 51 al ganado adulto que recibió la vacuna de cepa 19 en el periodo de terneras, no produjo respuestas posibles de detectarse en pruebas serológicas antibrucélicas. Al contrario de la vacunación con cepa 19, los animales infectados con cepas de campo pueden ser detectadas serologicamente en todo momento después de la vacunación con RB 51.

La cepa RB 51 es eliminada de los tejidos linfáticos con mayor rapidez que la cepa 19. Actualmente, la cepa RB 51 esta siendo usada, o considerada para usarse, en numerosos países (OPS/OMS, 1999).

Hasta hace unos pocos años, las vacunas disponibles contra la brucelosis inducían anticuerpos en los animales vacunados, que podían interferir mas tarde con el diagnóstico de la enfermedad, según la forma en que se hubiera practicado la vacunación. La aparición de una nueva vacuna denominada RB 51, obtenida a partir de una cepa rugosa de *B. Abortus*, logra una protección efectiva sin inducir a la formación de anticuerpos que afecten posteriormente al diagnóstico. (<http://www.vettek.com>).



La vacuna RB 51 fue seleccionada a partir del crecimiento de la cepa de *B. abortus* 2308 en presencia de rifampicina. Se empleó para denominarla la "R" por ser una cepa rugosa, la "B" por *Brucella* y "51" no indica el número de pases necesarios para obtenerla sino que corresponde a una nomenclatura interna del laboratorio que la desarrolló. La cepa RB 51 está desprovista de la cadena O, es rugosa y muy estable, tras numerosos pases in vitro e in vivo a través de varias especies animales.

Dado que carece de cadena O, no induce anticuerpos anti-O de forma detectable por los métodos serológicos convencionales o de ELISA, independientemente de la edad, dosis o frecuencia de las inoculaciones. La cepa RB51 es una cepa atenuada, como lo indican los ensayos efectuados en ratón, cobayo, caprino y vacuno, de los cuales se elimina en un espacio de tiempo relativamente corto con capacidad abortiva pequeña o nula. Cuando se emplea en protocolos de vacunación de una sola dosis, su capacidad protectora en el vacuno es similar a la de la cepa 19.

Recientes experimentos de campo, llevados a cabo en áreas de alta y baja prevalencia de brucelosis, indican que la inmunidad inducida por la RB 51 en el bovino (al menos un año tras la vacunación) es semejante o mejor que la inducida por la cepa 19. El ensayo en ratón indica que la respuesta protectora inducida por la RB 51 está mediada únicamente por las células T, puesto que la transferencia a otro animal de anticuerpos inducidos por la RB 51 no protege, mientras que la de células T sí lo hace. Un trabajo reciente, que se presentó en la quincuagésima conferencia sobre investigación de brucelosis, en Chicago, en noviembre de 1997, sugiere que la vacunación con RB 51 induce la formación de células T citotóxicas específicas, capaces de destruir los macrófagos infectados con *Brucella*. Puede distinguirse de la *B. abortus* aislada en el campo por métodos moleculares. Los estudios en el ratón indican que la cepa RB 51 puede proteger contra las infecciones por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis*. Tras la vacunación con RB 51, todas las especies

chequeadas permanecieron serológicamente, negativas en todas las pruebas serológicas convencionales de brucelosis.

Sin embargo, parece que la RB51 tiene menor potencial abortivo que la cepa 19. La vacuna se puede aplicar varias veces si se quiere, sin inducir anticuerpos reactivos en tests serológicos, tanto si se emplean células completas como el antígeno liso LPS. La administración oral de la RB51 a ratones y bovinos ha inducido también inmunidad protectora, abriendo así un campo de estudio para la inmunización de la fauna salvaje. (<http://www.vettek.com>)

## **V. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1. Localización del área de trabajo**

San Miguel es la segunda sección municipal de la provincia Velasco. Forma parte de la gran Chiquitania ubicada en el sector este del departamento de Santa Cruz. Limita al norte con el municipio de San Ignacio, al sur con la provincia Chiquitos, al este con el cantón Santa Ana y el municipio San Rafael y al oeste con la Provincia Ñuflo de Chávez. La topografía del municipio se caracteriza por presentar estrechos valles con terrazas aluviales, colinas y serranías. El clima es cálido tropical con una temperatura promedio anual de 24° C. Sus suelos son de origen precámbrico, ligeramente ácidos (INE, 1992).

### **5.2. MATERIALES**

- Solución bufferada
- Micropipetas
- Puntillas
- Placas para lectura de prueba bufferada
- Agitadores para mezclar sueros y solución bufferada
- Papel
- Detergente
- Alcohol
- Centrífuga
- Tubos de ensayo
- Jeringas
- Kit de ELISA competitiva para brucelosis bovina
- Estufa
- Soluciones diluyentes

## **5.3. MÉTODOS**

### **5.3.1. Método de muestreo**

El método que se utilizó fue al azar. Para la toma de muestras se tomó en cuenta la distribución de las estancias en el municipio de San Miguel, tomando muestras representativas de las instalaciones pecuarias.

### **5.3.2. Método de campo**

Se tomaron las muestras de sangre total de 5 – 8 ml, de la cual se obtuvo suero sanguíneo (material de estudio). Dichas muestras fueron tomadas de distintos establecimientos ganaderos, en el municipio de San Miguel. Las muestras fueron correctamente identificadas y llevadas a una ficha como información, para poder al final cumplir con los objetivos trazados.(ANEXO 2)

Al mismo tiempo se tomaron datos de los animales como ser: edad, raza, sexo y comunidad.

### **5.3.3. Método de laboratorio**

Las muestras fueron procesadas y remitidas en, el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIVET). Mediante la prueba de seroaglutinación rápida en placa con antígeno bufferado y posterior verificado de los positivos con la prueba de ELISA competitiva.

### **5.3.4. Método estadístico**

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba del Chi cuadrado.

## **V. RESULTADOS**

El presente trabajo de investigación nos llevó a conocer la prevalencia de la Brucelosis bovina en el municipio de San Miguel provincia Velasco del departamento de Santa Cruz.

Para realizar el trabajo se tomaron las muestras de sueros sanguíneos de la población ganadera del municipio de San Miguel. El tamaño de la muestra de 406 animales se distribuyó proporcionalmente.

### **PREVALENCIA**

De las muestras de suero serológicamente procesadas en el laboratorio de Investigación y Diagnostico Veterinario (LIDIVET). Resultaron 6 positivas (1.5%), 400 negativas (98.5%). (Cuadro No 1)

### **EDAD**

De acuerdo a la edad de los animales se clasificaron en tres grupos: 1 a 3 años, 4 a 6 años y 7 años adelante; resultaron positivos, en el primer grupo 0 (0.00%) animales, en el segundo grupo resultaron 5 (1.23%) animales positivos, y en el tercer grupo 1 (0.25); no hay diferencia estadística significativa. (Cuadro No 2)

### **RAZA**

Por raza de 406 muestras, en la raza Holando ningún animal positivo (0.00%), Mestizo 1 (0.25%) animales positivo, Nelore 5 (1.23%) animales positivos, Pardo ningún (0.00%) animal positivo. No existiendo diferencia significativa. (Cuadro No 3)

## **SEXO**

Con respecto a la variable sexo se obtuvo muestras positivas: 6 (1.5%) para el sexo hembra, y 0 (0.00%) muestras de sexo macho, no se encontró diferencia significativa. (Cuadro No 4)

## **COMUNIDAD**

En el cuadro de las doce comunidades. Se encontraron casos positivos, solo en San Miguel 6 (1.5%). Evidenciándose que no una existe diferencia significativa. (Cuadro No 5)

**CUADRO No 1 PREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco)**

<b>N<sup>a</sup> Total de Muestras</b>	<b>Resultado de Laboratorio</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
406	Positivo	6	1.50%
	Negativo	400	98.50%
	<b>Total</b>	<b>406</b>	<b>100 %</b>

**(P>0.05 )**

**(I.C. 0.54 – 3.19) 95%**



**CUADRO No 2 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN  
EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco) POR EDAD**

<b>Edad</b>	<b>Positivo</b>	<b>%</b>	<b>Negativo</b>	<b>%</b>
1 - 3 años	0	0	106	26.11
4 - 6 años	5	1.23	241	59.36
> a 7 años	1	0.25	53	13.05
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>1.48</b>	<b>406</b>	<b>98.52</b>

**(P>0.05)**

**CUADRO No 3 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN  
EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco)POR RAZA**

<b>Raza</b>	<b>Positivo</b>	<b>%</b>	<b>Negativo</b>	<b>%</b>	<b>Total</b>
Holando	0	0	19	4.68	16
Mestizo	1	0.25	303	74.63	304
Nelore	5	1.23	50	12.32	55
Pardo	0	0	28	6.89	28
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>1.48</b>	<b>400</b>	<b>98.52</b>	<b>406</b>

(p > 0.05 )

**CUADRO No 4 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN  
EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco) POR SEXO**

<b>Sexo</b>	<b>Positivo</b>	<b>%</b>	<b>Negativo</b>	<b>%</b>	<b>Total</b>
Hembras	6	1.5	379	98.5	385
Macho		0.0	21	1.5	21
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>1.5</b>	<b>400</b>	<b>100</b>	<b>406</b>

( $p > 0.05$ )

**CUADRO No 5 DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN  
EL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL (Prov. Velasco) POR  
COMUNIDAD**

<b>Comunidad</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
Alta Mira	0	1	1
Campo	0	1	1
Monte Cristo	0	1	1
S. Antonio Tacoo	0	1	1
S. Juan de Lomerio	0	1	1
S. Lucito de Lima	0	1	1
S. Miguel	1	22	23
S. Pedrito	0	1	1
S. Antonio Tajibo	0	1	1
S. Rosita	0	1	1
Sapocó	0	1	1
Villa Cruz	0	1	1
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>34</b>	<b>35</b>

( P > 0.05 )

## VI. DISCUSIÓN

**De un total de 406 muestras sanguíneas analizadas, en el municipio de San Miguel provincia Velasco departamento de Santa Cruz se detectó la presencia de anticuerpos Brucélicos en 6 muestras positivas obteniéndose así un 1.5% de prevalencia, con un intervalo de confianza de confianza de 0.54 – 3.19 (95%).**

(Cuadro N° 1)

Comparando nuestros resultados obtenidos en el presente estudio, y relacionándolo con otros trabajos de investigación sobre el tema, realizadas en distintos lugares del departamento y del país podemos decir que:

Parra, (1965) 14.3%; en Puerto Suárez, Machado (1975) 1.78%; en el área lechera de Santa Cruz, Angulo (1978) 1.79%; en la Prov. Andrés Ibáñez, Cruz, (1977) 2.77%; en la Prov. Vallegrande, García, (1978) 7.73%; en el Dpto. de La Paz, Prov. Ingavi, Abel, (1979) 7.57%; en el Beni, Prov. Santa Ana, Salas, (1979) 0.44%; en Dpto. de la Paz, Prov. Ingavi, Mansilla (1983) 2.03%; en el Dpto. de Tarija, valle central, Alvarez, (1987) 0%; Prov. Vallegrande, Hosokawa (1987) 2.27%; en el Dpto. de Santa Cruz, Viruez, (1987) 0%; en Santa Cruz, Prov. Caballero, Eulert, (1988) 1.9% en La Paz Prov. Larecaja, Jaramillo, (1988) 0.56%; en Tarija, Prov. M. Municipal, Molina, (1988) 0.36%; en Chuquisaca, Sánchez, (1988) 3.33%; en Santa Cruz, Prov. Andrés Ibáñez, Calderón, (1989) 6.61% en Santa Cruz, Prov. O. Santisteban, Gonzáles, (1989) 3.58% en Oruro, Prov. M. Municipal, Gutiérrez, (1989) 0%; en Potosí Prov. M. Municipal, Armella, (1991) 1.6%; en Tarija, Prov. Gran Chaco, LIDIVET, (1984-1992) 4.15%, en Santa Cruz, Cuenca Lechera, PMGB, (1989-1992) 1.3%; en Santa Cruz, Prov. Andrés Ibáñez, Romero, (1992) 0%; en Santa Cruz, Prov. Florida, Salas, (1992) 0.75%; en Santa Cruz, Prov. Vallegrande, Silva, (1992) 0.19% en Santa Cruz, Prov. Florida, Varón, (1992) 1.6%; en Chuquisaca, Prov. Luis Calvo, Ibáñez (1993) 2% en Chuquisaca, Prov. Oropeza, ADEPLE, (1984-1994) 4.60%; Santa Cruz, Cuenca Lechera, Verduguez, (1995)

2.75% en Santa Cruz, Prov. San Javier, Castro, (1995) 0.95%; en Santa Cruz, Prov. Ichilo, Rueda, (1995) 0%; en Tarija, Prov. Méndez, Paz, (1995) 0.70%; en Santa Cruz, Prov. Cordillera, Montesinos, (1997) 1.10%; en Santa Cruz, Prov. Velasco, Guzmán, (1997) 0.25% en Cbba. Prov. Punata, Marca, (1998) 0.46%; en Cbba. Prov. Carrasco, Hurtado, (1997) 0.7%; en Santa Cruz Prov. Sara, Urquiza, (1999) 0%; en Santa Cruz, Prov. Sara, Nogales (1999) 0.50%; en Santa Cruz, Prov. San Matías, Andía (1999) 0% en Tarija.

Como se puede apreciar existen prevalencias superiores otras guardan una estrecha relación con el estudio realizado, observándose también algunas zonas libres de brucelosis dentro del departamento y del país.

## **EDAD**

**Por edad se observó el 1.23% de positividad en animales entre 3 – 7 años y 0.25% de positividad en animales mayores a 7 años, no encontrándose ningún caso positivo entre los 1 – 2 años, evidenciándose que no existe diferencia significativa.**

**( CuadroN °2 )**

Respecto a esta variable, Sálles (1979); en Santa Cruz Prov. Vallegrande, Abel (1979); en el Beni Prov. Santa Ana, encontraron diferencias estadísticas significativas, mientras que García (1978); en La Paz Prov. Ingavi, Salaz (1979); en La Paz Prov. Ingavi, Mansilla (1983); en Tarija Prov. Valle Central, Alvarez (1987); en Santa Cruz Prov. Vallegrande, Viruez (1987); en Santa Cruz Prov. Caballero, Gutierrez (1989); en Potosí Prov. M. Municipal, Armella (1991); en Tarija Prov. Gran Chaco, Romero (1987); en Santa Cruz, Prov. Florida, Silva (1987); en Santa Cruz Prov. Florida, Varón (1992); en Chuquisaca Prov. Luis Calvo, Ibáñez (1993); en Chuquisaca Prov. Oropeza, Verduguez (1995); en Santa Cruz Prov. San Javier,

Castro (1995); en Santa Cruz Prov. Ichilo, Hurtado (1997); en Santa Cruz Prov. Sara, Marca (1988); en Cbba. Prov. Carrasco, no encontraron diferencias significativas, por otro lado Machado (1975); en Santa Cruz Prov. Andrés Ibáñez, Eulert (1988); en La Paz Prov. Larecaja, Jaramillo (1988); en Tarija Prov. M. Municipal, Molina (1988); en Chuquisaca, Calderón (1989); en Santa Cruz Prov. O. Santisteban, Gonzáles (1989); en Oruro Prov. M. Municipal, no tomaron en cuenta esta variable.

## **RAZA**

**Por raza se observó el 1.23% de positividad en animales de raza Nelore, y en los Mestizos se observó un 0.25% de positividad. Mientras que en las otras raza no se observaron casos positivos. Evidenciándose que no existe diferencia significativa. (Cuadro N° 3)**

Con respecto a esta variable, Machado (1975); en Santa Cruz Prov. Andrés Ibáñez, García (1978); en La Paz, Prov. Ingavi, Abel (1979); en el Beni Prov. Santa Ana, Sálas (1979); en La Paz Prov. Ingavi, Mansilla (1983); en Tarija Prov. Valle Central, Viruez (1987); en Santa Cruz Prov. Caballero, Gutierrez (1989); en Potosí Prov. M. Municipal, Romero (1992); en Santa Cruz Prov. Florida, Silva (1992); en Santa Cruz Prov. Florida; Verduguez (1995); en Santa Cruz Prov. San Javier, Castro (1995); en Santa Cruz Prov. Ichilo; Hurtado (1997); en Santa Cruz Prov. Ichilo, Marca (1998); en Cbba. Prov. Carrasco, Urquiza (1999); en Santa Cruz Prov. Sara, Nogales (1999); en Santa Cruz Prov. Velasco, Andia (1999); en Tarija, no encontraron diferencia estadística significativa. Mientras que Sálas (1992); en La Paz Prov. Ingavi, encontró diferencia estadística significativa, Alvarez (1987); en Santa Cruz Prov. Vallegrande, Eulert (1988); en La Paz, Prov. Larecaja, Jaramillo (1988); en Tarija Prov. M. Municipal, Molina (1988); en Chuquisaca, Sánchez (1988); en Santa Cruz Prov. Andrés Ibáñez, Calderón (1989); en Santa Cruz Prov.

O. Santisteban, Armella (1991); en Tarija Prov. Gran Chaco, Varón (1992); en Chuquisaca Prov. Luis Calvo, Ibáñez (1993); en Chuquisaca Prov. Oropeza, no tomaron en cuenta esta variable.

## **SEXO**

Por sexo se observó el 1.48% de positividad en animales hembras, mayores de 3 años, mientras que en los machos no hubo ningún caso positivo. Evidenciándose que no existe diferencia significativa. (Cuadro N° 4)

De igual forma Romero (1992); en Santa Cruz Prov. Florida, 0%, Silva en Santa Cruz Prov. Florida 0.19% de casos sospechosos en hembras y en machos no hubo ningún resultado adverso. Evidenciándose que no existe diferencia estadística significativa.

Una gran mayoría de los trabajos realizados sobre brucelosis bovina, no tomaron en cuenta la variable sexo.

## **COMUNIDAD**

Se distribuyó el lugar de estudio dentro del municipio de San Miguel de la provincia Velasco, donde podemos ver que comparado con las distintas comunidades, el área central del municipio de San Miguel, es la zona más afectada; encontrándose un 1.48% de positividad, observándose que no existe diferencia significativa. (Cuadro N° 5)

Gonzales, (1989) en Oruro Prov. M. Municipal, Armella (1991) en Tarija Prov. Gran Chaco, Sálas (1992), en Santa Cruz Prov. Vallegrande, encontraron diferencias estadísticas significativas. García, (1998); en La Paz Prov. Ingavi, Abel, (1979); en



el Beni Prov. Santa Ana, Sálas, (1979); en La Paz Prov. Ingavi, Eulert (1988); en La Paz Prov. Larecaja, Varón (1992); en Chuquisaca Prov. Luis Calvo, Silva, (1992) en Santa Cruz Prov. Florida, Romero (1992); en Santa Cruz Prov. Florida, Ibáñez, (1993); en Chuquisaca Prov. Oropeza, Verduguez, (1995); en Santa Cruz Prov. San Javier, Rueda, (1995); en Tarija Prov. Méndez, Guzmán, (1997); en Cbba Prov. Punata, Marca (1998); en Cbba. Prov. Carrasco, Nogales, (1999); en Santa Cruz, Prov. Velasco, no encontraron diferencias significativas, sin embargo: Machado, (1975); en Santa Cruz Prov. Andrés Ibáñez, Alvarez, (1997); en Santa Cruz Prov. Vallegrande, Castro, (1995); en Santa Cruz Prov. Ichilo, Paz (1995); en Santa Cruz Prov. Cordillera, Montesinos, (1997); en Santa Cruz, Prov. Velasco, no tomaron en cuenta esta variable.

## VII. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados del presente trabajo de investigación podemos concluir que:

- Se detectó anticuerpos específicos contra Brucella en bovino, en el municipio de San Miguel provincia Velasco del departamento de Santa Cruz, con una prevalencia de 1.5%.
- Podemos decir que la presencia de esta enfermedad zoonótica en el municipio de San Miguel provincia Velasco del departamento de Santa Cruz con una prevalencia baja.
- Otros trabajos realizados en el país, demuestran prevalencias similares a la encontrada por nosotros.
- En lo que respecta a las variables de edad, raza, sexo, y comunidad no influye significativamente en el trabajo.

La enfermedad se encuentra poco difundida, por lo que las autoridades zoosanitarias nacionales y locales deben tomar medidas para prevenirla.

Esperamos que estos resultados sean de utilidad para poder completar los ya existentes y realizar un mapa epidemiológico actualizado para establecer una estrategia de control y erradicación.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Se debe realizar la vacunación de las terneras entre 3 y 8 meses de edad, y sacrificio inmediato de los reactores positivos.
- Todo animales que ingrese debe ser sometido a exámenes serológicos para confirmar que se encuentran libres de la enfermedad.
- Se debe exigir certificados de vacunación en los puestos de control de ingreso o salida de animales.
- Se deben realizar pruebas cada seis meses en leche.
- Realizar cuidadosos exámenes de laboratorio a todos los fetos abortados, necesario como prueba de rutina; posteriormente realizar la eliminación de residuos fetales y desinfección del área donde estuvo el feto.
- Aislado de vacas durante el parto y realizar exámenes serológicos, catorce días después, puesto que antes de este tiempo los falsos positivos son frecuentes.
- Vacas recién introducidas y que se encuentren en gestación avanzada, deberán mantenerse aisladas hasta el parto.

- Los veterinarios y personas, que atienden a los animales y que tienen contacto con materiales y residuos fetales infectados. Deben utilizar desinfectantes con gluconato de clorhexidina que es un antiséptico eficaz contra la ***Brucella abortus***.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

**ACHA, P.N.** 1.988. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. 2 ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington,D.C. pp. 646-656.

**BLOOD,D.C.,RADOSTITS,O.M.** 1992. Medicina Veterinaria. Traducida de la 7 ed. Interamericana, S.A. México, D.F. pp.259-278.

**BURROW,S.W.** 1974. Tratado de Microbiología.10 ed. Interamericana. México,. D.F. pp.729-742

**BRUNER,D.W.** 1970. Enfermedades Infecciosas de los animales Domésticos. Traducido de la 5 ed. en Ingles por Santibáñez, M.J. México,D.F. pp. 259 – 278.

**BRUNES, D.W., GUILLESPIE, J.H.** 1970. Enfermedades Infecciosas de Animales Domésticos. Traducción de la 5 ed. en Ingles por Dr. Santibáñez, M.J. 3 ed. Fournier S.A. Mexico, D.F. pp. 921 – 925.

**CARTER, G.R.** 1989. Fundamento de Bacteriología y Micología Veterinaria.  
Acribia. Zaragoza, España. pp. 213 – 218.

**COTRINA, P.N. y FERNANDEZ, L.A.** 1997. Brucelosis Problema Sanitario y  
económico. 1 ed. Científico –Técnico. La Habana, Cuba. Pp. 12- 131.

**ENSMINGER, M.E.** 1981. Producción Bovina para Carne. 2 ed. El Ateneo.  
Buenos Aires, Argentina. pp. 379 – 385.

**FAO/OMS.** 1986. Comité Mixto FAO/OMS. De expertos en Brucelosis. Traducido  
por la OPS. Serie de Informes # 740. Gráficos Reunidas Ginebra.  
pp. 123 – 124.

**GRAS, J.** 1972. Mecanismos Inmunológicos. Primera edición. Jims.  
Barcelona, España. pp. 52 – 56.

**GUZMAN, G.** 2000. Prevalencia de Brucelosis Bovina en la Provincia Punata del  
Departamento de Cochabamba. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. pp 1- 46.

**HUTYRA y MAREK, M.M.** 1973. Patología y Terapéutica de los Animales

Domésticos. Tomo I. 3 ed. Labor S.A. Barcelona, España.  
pp. 813 – 835.

**INE.** 1992. Atlas Estadístico de Municipios de Bolivia. pp. 133,137,410.

**LLORENS, F., SILVEIRA, E.A.** 1992. Revista Cubana de Ciencias Veterinarias.  
Volumen 24. Números 2 y 3. Comportamiento de la Brucelosis Bovina en  
Dos Unidades Estatales Afectadas y Vacunadas. La Habana, Cuba.  
pp. 117 – 122.

**LLORENS, F., SILVEIRA, E.A.** 1992. Revista Cubana de Ciencias Veterinarias.  
Volumen 24. Números 2 y 3. Comportamiento de la Evolución de la  
Brucelosis en Cooperativas de diferentes tamaños Vacunados y sin.  
Vacunar. La Habana, Cuba. pp 123 - 130.

**MERCK, C.** 1998. El Manual Merck de Veterinaria. 3 ed. Traducido por  
Translation Co. Of. America Centrum. Barcelona, España. pp.739 – 742.

**MERCHANT, I.A., PARKER, R.A.** 1978. Bacteriología y Virología Veterinaria. 3  
ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 377 – 390.

**MICHAEL, B.S., REICHMAN, L., OLIVEIRA, L.** Curso de capacitación básica  
En salud Animal. Capitulo V4. Historia Natural de la Brucelosis. pp.1-22.

**MICHAEL, B.S., CASTRO, J. DELPIETRO, H., TADEU, P.S., HAMILTON, L. SILVA, B.R.** Curso de Capacitación Básica en Salud Animal. Modulo VI. Prevención y Control de la Brucelosis y Tuberculosis. Capitulo VI.3.1. pp 1 – 26.

**NICOLET, J.** 1986. Compendio de Bacteriología Medica Veterinaria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 82 – 89.

**PICAZO, J.J., FUERTES, O.A.** 1999. Protocolos de Diagnostico de Clínico. <http://www.inmunogenetics.com>.

**RAMOS, S.R.** 1999. Primer Simposio de Productividad Lechera. Enfermedades Reproductivas de Origen Infeccioso. IBR y Brucelosis. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. pp. 14 – 17

**REVOLLO, J.** 2000. Prevalencia de Brucelosis Bovina. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. pp 1 – 51.

**RUNNELLS, A.R.** 1973. Principios de Patología Veterinaria Anatomía Patológica. 1 ed. en Español. Continental S.A. México, D.F. pp. 645 – 646.



**SANDOVAL,J.** 2001. Prevalencia de Brucelosis Bovina en la Provincia Guarayos del departamento de Santa Cruz. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.pp.1- 66.

**SORIA,S.** 2001. Brucelosis Bovina en Ganado lechero. Santa cruz de la Sierra, Bolivia.pp 1- 47.

**TIZARD,I.** 1989. Inmunológica Veterinaria, Traducido por Casacuberta, Z.C.G. De la 3 ed. en Ingles al Español.Interamericana. México, D.F. pp. 227 – 279.

**THRUSFIELD M. 1.990.** Epidemiología Veterinaria. Acribia S.A. Zaragoza, España pp. 229 – 279.

**VETTEK,** 1997. Veterinary Technology Corporation. <http://www.vettek.com>.

## **VII. ANEXO**

## ANEXO 1

### ESTUDIOS REALIZADOS EN BOLIVIA

#### CUADRO COMPARATIVO

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Dpto.</b>	<b>Provincia</b>	<b>No de cabezas</b>	<b>Positivos %</b>
Parra L.A.	1.965	Santa Cruz	Puerto Suarez	500	14.2
Machado L.	1.975	Santa Cruz	A. Ibañez	616	1.78
Angulo y Machado	1.975	Santa Cruz	A. Ibañez	616	1.78
Cruz J.	1.977	Santa Cruz	Vallegrande	900	2.76
Ciat y M. Britanica	1.978	Santa Cruz	Ñ. de Chavez	400	1.75
Garcia C. J.	1.978	La Paz	Ingavi	608	7.73
Vargas B. A.	1.978	Santa Cruz	Sra Ichilo	400	3.77
Vargas B. A.	1.978	Cbba	Area Lechera	8159	7.47
Salas T. Ovidio	1.979	La Paz	Ingavi	900	0.44
Abel B. H.	1.979	Beni	Santa Ana	1.526	7.47
Salas R.P.	1.983	Tarija	Valle central	444	2.3
Alvarez G.R.	1.987	Santa Cruz	Vallegrande		
			Postrer valle	300	0.0
Hosokawa K. M.			Cordillera	106	0.9
			Florida	82	0.0
			San Javier	172	3.2
			A. Ibañez	215	9.2
			San I. Velasco	110	0.9
			Chiquitos	132	0.0
			Ñ. De Chavez	143	1.4
Virhuez C.O.	1.987	Santa Cruz	Caballero	615	0.0
Molina S.	1.988	Sucre	Chuquisaca	600	0.6
Sanchez H. W.	1.988	Santa Cruz	A. Ibañez	300	3.33
Castro C.R.	1.988	Cbba.	Cbba.	1.500	10.93
Sanchez A.W.	1.988	Santa Cruz	A. Ibañez	3.000	3.33
Eulert M.J.E	1.988	La Paz	La Paz	1.000	1.9
Jaramillo R.	1.988	Tarija	Tarija	1.242	0.76
Calderon D.	1.989	Santa Cruz	O. Santiesteban	650	6.61
Gonsales M.	1.989	Oruro	Oruro	615	3.58
Gutierrez O.J.	1.989	Potosi	Potosi	600	0.0
Vargas E.J.A	1.990	Tarija	Tarija	380	1.84
Armella A.M.	1.991	Tarija	Gran Chaco	1.000	1.6
LIDIVET	84-92	Santa Cruz	Cuenca		
			Lechera	18.370	4.15
Romero J.S.	1.992	Santa Cruz	Florida	516	0.0
Salas R. P.	1.992	Santa Cruz	Vallegrande		
			Postrervalle	400	0.75

Silvia T.R.	1.992	Santa Cruz	Florida	516	0.19
Varon P.CH.	1.992	Chuquisa	Luis Calvo	435	1.60
Ibañez C.	1.993	Chuquisa	Oropeza	250	2.0
Ramos S.R.	1.993	Santa Cruz	Cuenca		
			Lechera	3.438	6.96
ADEPLE	84-94	Santa Cruz	Cuenca		
			Lechera	2.810	4.6
PMGB	1.994	Santa Cruz	A. Ibanez		0-3
Castro c.l.	1.995	Santa Cruz	Ichilo	420	0.95
Paz v.m.	1.995	Santa Cruz	Cordillera	430	0.70
Rueda E.M.J.	1.995	Tarija	Mendez	400	0.0
Verduguez E.W.	1.995	Santa Cruz	C.L. San Javier	400	2.75
Montesino P.B.	1.997	Cbba.	Punata	400	0.0
Guzman A.P.	1.997	Santa Cruz	Velasco	541	1.10
Marca CH. J.	1.998	Cbba.	Carrasco	434	0.46
Hurtado S.M.	1.998	Santa Cruz	Sarah	400	0.25
Nogales M.R.	1.999	Santa Cruz	San Matias	401	0.50
Urquiza S.J.	1.999	Santa Cruz	2ª Seccion		
			Sarah	420	0.0
Andia S.R.	1.999	Tarija	Tarija	1.125	0.0
Salguero J.	2.000	Cbba.	Campero	270	0.0
Osinaga S.J.O.	2.000	Santa Cruz	Florida	400	0.50
Casana Y.D.A.	2.000	Santa Cruz	Guarayo	400	4.75
Becerra S.A.	2.000	Santa Cruz	Sarah	400	1.5
Vargas V.F.A.	2.000	Santa Cruz	Charagua	377	0.0
Sandoval Q.S.J.	2.001	Santa Cruz	Ichilo	1.182	1.69
Revollo	2.001	Cbba	Quillacollo		11.72
Larico	2.001	La Paz	Omasuyos		
Alderete	2.001	Santa Cruz	Warnes	2.142	1.4
Choque	2.001	Chuquisac	Azurduy	400	0.0
Navarro	2.001	Santa Cruz	Warnes	2.495	3.69
Aguirre	2.001	Santa Cruz	San Javier		1.10
Soria S.C.S.	2.001	Santa Cruz	Guarayos	400	8.75
Choque .C.M.	2.001	Chuquisa	Azurduy	400	0.0
Veisaga M.R.	2.001	Santa Cruz	Postrervalle	230	0.43