

tentes que culminan en abortos en vacas, ovejas y cabras, además de infectar los órganos reproductivos del macho causando lesiones de consideración [Castaneda, 1947]. Se ha determinado que el porcentaje de abortos en animales es muy alto, llegando a ser del 65% de las vacas [Russel *et al.*, 1978] y en cabras [Kolar, 1987]. El aborto es acompañado por enormes descargas de bacterias al ambiente, que sin duda alguna representan peligrosos focos de infección.

A pesar de que las pérdidas económicas causadas por abortos y otros factores asociados a la brucelosis del ganado son muy altas, el daño a la salud humana es realmente preocupante [Beal, 1984]. Debido a que infecciones persistentes afectan las glándulas mamarias y nódulos linfáticos supramamarios del 80% de los bovinos infectados [Corner *et al.*, 1987], la mayoría de estos animales excretan *B. abortus* en la leche [Morgan y McDiarmid, 1960; Nicoletti, 1980]. La enfermedad es adquirida directamente de los animales o de sus derivados, como leche, queso, etc. ya que el ganado es el principal reservorio de la enfermedad y de donde puede ser transmitido a humanos por contacto directo o indirecto.

En humanos, el período de incubación puede ser de 1 a 3 semanas y es una enfermedad debilitadora caracterizada por fiebre, escalofríos, cefalea, dolor muscular o de articulaciones. En promedio, la recuperación ocurre en 1 o 3 meses aunque la laxitud permanece por un tiempo más prolongado. En cursos crónicos, la fiebre puede mostrar un patrón ondulante y de ahí el sinónimo de "fiebre ondulante". Cuando la enfermedad es aguda la toxemia extrema, la trombopenia y endocarditis puede culminar con la muerte del individuo [Escarzaga, 1975].

El control de la enfermedad en animales tiene un impacto dramático en la reducción de la incidencia en humanos; por ejemplo, se sabe que en los Estados Unidos, la brucelosis se redujo de 6000 casos por año en 1947 a menos de 300 en 1983 [Callis *et al.*, 1989]. Para lograr un control efectivo de la enfermedad es necesario que se tomen adecuadamente medidas importantes que son necesarias en la detección, erradicación y/o vacunación.

Existen vacunas para lograr la protección de los animales contra la enfermedad, una de ellas que es la más utilizada es conocida como cepa 19 (S19) y cuya efectividad se considera de un 80% [Klesius *et al.*, 1978; Davies *et al.*, 1980]. Esta cepa no es infecciosa en animales e induce buenos niveles de producción de anticuerpos que generalmente persisten por el resto de la vida del animal [Davies *et al.*, 1980; Breitmeyer *et al.*, 1992]. Sin embargo, la vacuna S19 no protege al 100% del ganado y se ha determinado que hasta el 30% de los bovinos vacunados no son protegidos [Davies *et al.*, 1980].

El diagnóstico más confiable de la brucelosis requiere normalmente del aislamiento e identificación del microorganismo. Debido a que el examen bacteriológico no siempre es practicable, el diagnóstico se realiza generalmente por métodos serológicos que son rápidos y relativamente fáciles de realizar [Byrd *et al.*, 1979; Ariza *et al.*, 1992; Breitmeyer *et al.*, 1992; Krambovitis *et al.*, 1992]. La prueba más utilizada en nuestro país consiste en la reacción de aglutinación observada al conjugar la bacteria

con el suero del animal sospechoso [Huddleson y Abell, 1928].

Las enormes desventajas de los métodos serológicos son la insuficiente sensibilidad y especificidad ya que es muy difícil detectar infecciones tempranas o latentes con el patógeno además de que es prácticamente imposible diferenciar entre los anticuerpos de un animal enfermo naturalmente con los de un animal vacunado [Goudswaard *et al.*, 1976; Milner *et al.*, 1990; Perry y Bundle, 1990]. Más aún, ha sido demostrado en múltiples ocasiones que este tipo de pruebas serológicas reditúa reacciones cruzadas con antígenos extraños y no relacionados con la presencia de *B. abortus* [Hess y Roepke, 1951; Perry y Bundle, 1990]. Estas observaciones indudablemente restan valor al diagnóstico de la enfermedad basado en métodos serológicos solamente.

Generalmente el animal encontrado positivo para la prueba, es sacrificado, más sin embargo para lograr un buen control es necesario detectar y eliminar los animales enfermos tan pronto como sea posible y en etapas tempranas de la infección. Desafortunadamente, el diagnóstico por aislamiento de la bacteria puede durar hasta meses y ninguna de las pruebas serológicas es suficientemente específicas o sensible, como para actuar rápida y confiablemente. Por tal motivo es ya una prioridad, en el mundo entero, el advenimiento de alguna técnica que ayudara a detectar específicamente al patógeno en un período muy breve de tiempo.

Recientemente se ha diseñado y perfeccionado una metodología, la **Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)**, que permite la detección de un gen de secuencia conocida presente en el genoma o en mezclas de genomas aun cuando la secuencia que es buscada se encuentre en muy bajas cantidades [Saiki *et al.*, 1988]. Esta técnica es sumamente específica en la detección, relativamente rápida y permite prescindir del uso de radioisótopos.

La técnica puede resumirse en tres importantes pasos: desnaturalización del ADN, anillamiento y extensión. La **desnaturalización** consiste en la separación de las cadenas del ADN, para formar cadenas sencillas, por medio de altas temperaturas. El **anillamiento** es la restauración de la condición doble cadena por reducción de temperatura, en presencia de un par de oligonucleótidos sintéticos que tienen afinidad específica por la región del ADN en cuestión, siendo uno de ellos complementario al extremo 5' del gen o fragmento del ADN que se desea amplificar y el otro se aparea con el extremo 3' del mismo, pero en la cadena opuesta. La **extensión** es lograda por la polimerización del ADN llevada a cabo por una enzima termoes estable a partir de los oligonucleótidos apareados en el paso anterior. Este ciclo se repite de 30 a 50 veces, lográndose multiplicar la secuencia original en una progresión geométrica, de tal forma que al final del proceso, la cantidad del ADN amplificado es de 10^6 al 10^7 veces la cantidad original.

OBJETIVO

Dada la situación del diagnóstico serológico actual y la importancia indudable de la enfermedad, en este trabajo se planteó como objetivo principal el establecimien-