

ESTUDIO BACTERIOLÓGICO Y SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS EN VACAS REVACUNADAS CON DOSIS REDUCIDA DE CEPA 19 DE *Brucella abortus*^a

Jorge Bustamante Sánchez^b
Fernando Israel Salazar Hernández^b
Efrén Díaz Aparicio^c
Carlos Manzano Cañas^b
Rafael Pérez González^b
Laura Hernández Andrade^c

RESUMEN

Bustamante SJ, Salazar HFI, Díaz AE, Manzano CC, Pérez GR, Hernández AL. *Téc Pecu Méx.* 2000; 38(1)35-42. El objetivo fue determinar mediante pruebas diagnósticas, si los anticuerpos que se presentan en bovinos revacunados con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus* son debidos a infección o a vacunación, e intentar el aislamiento para determinar su especie y biotipo. El muestreo se realizó en 25 establos de Tizayuca, Hidalgo. Se utilizaron 100 vacas Holstein positivas a la prueba de tarjeta (PT), que habían sido vacunadas de tres a seis meses de edad con cepa 19 de *B. abortus* a dosis clásica (1 x 10¹⁰ unidades formadoras de colonias (ufc) por ml) y revacunadas de adultas con dosis reducida (3 x 10⁸ ufc/ml). Se obtuvieron 100 muestras de suero y exudado vaginal y sólo de 90 vacas se obtuvo leche. Se realizaron las pruebas de fijación del complemento (FC), rivanol e inmunodifusión radial (IDR) con hapteno nativo. A las colonias sospechosas se les realizaron pruebas de oxidasa, ureasa, producción de H₂S, citrato y triple azúcar hierro, entre otras. Fueron seropositivos para FC 52%, rivanol 87% e IDR 74%. Se aisló *B. abortus* biotipo 1 a partir de diez muestras de leche. Debido a su elevada especificidad para los vacunados, se tomó como prueba de oro la IDR, el 74% de vacas rectoras a esta prueba, fueron consideradas como positivas a pesar de estar revacunadas, el 26% de vacas positivas a la PT y negativas a IDR se consideran como rectoras posrevacunación. Las pruebas oficiales no son adecuadas para diferenciar sueros de vacas revacunadas con cepa 19, por lo que la IDR es una buena alternativa para realizar este diagnóstico.

PALABRAS CLAVE: Inmunodifusión radial, Brucelosis, Bovinos lecheros, Revacunación.

INTRODUCCIÓN

La vacuna de *Brucella abortus* cepa 19 en su presentación de dosis clásica se ha elaborado en México desde 1951; los

programas de la Campaña Nacional vigente señalan como obligatorio vacunar con ella a todas las becerras de tres a seis meses de edad. El uso de la dosis clásica en animales adultos no es recomendado debido a que estos permanecen positivos a las pruebas serológicas; este inconveniente puede ser minimizado utilizando la dosis reducida y empleando pruebas más específicas, o bien realizando el diagnóstico después de los diez meses de haber vacunado⁽¹⁾.

a Recibido el 21 de mayo de 1999 y aceptado para su publicación el 31 de julio de 2000.

b Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México.

c CENID Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGAR. Apartado postal 41-682, 11001 México, DF. efren@micro.inifap.conacyt.mx Tel (5) 570-38-86. Correspondencia y solicitud de separatas.

En México, desde 1997 se ha empleado la vacunación de bovinos con RB51; su uso ha sido autorizado en la campaña nacional, desplazando poco a poco a la cepa 19. La vacuna RB51 por ser una cepa rugosa no induce anticuerpos que se detecten mediante las pruebas diagnósticas convencionales⁽²⁾.

En los países en desarrollo, donde existe imposibilidad de pagar indemnizaciones por la eliminación de bovinos reactivos a brucelosis, se presentan con frecuencia hatos lecheros que muestran tasas de prevalencia superiores al 20%. Estos valores aparecen aún cuando se cumplan estrictamente las normas de vacunación tradicional⁽³⁾. Lo anterior obliga a buscar métodos alternos para la protección del ganado contra una posible infección, siendo la revacunación una alternativa.

La revacunación es aceptada por la Norma Oficial Mexicana para la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal (NOM-041-200-1995), la cual especifica que se podrá realizar solamente una vez, en animales adultos previamente vacunados con dosis clásica de hatos donde se presenten brotes de la enfermedad⁽²⁾. Sin embargo, la revacunación presenta ciertas dificultades de carácter diagnóstico, ya que una segunda vacunación implica también un aumento en los títulos de anticuerpos, lo que provoca una baja en la especificidad de las pruebas serológicas rutinarias, al ser incapaces de distinguir animales vacunados de infectados y por tanto, se presenta un aumento en el periodo de restricción para realizar el diagnóstico⁽⁴⁾.

Las brucelas tienen una estructura antigénica compleja; entre los antígenos

más importantes están el lipopolisacárido (LPS), el hapteno nativo (HN), proteínas citoplasmáticas y de membrana externa. Por su localización en la superficie de la célula y su inmunogenicidad, el LPS es el primer antígeno frente al que aparecen anticuerpos, tanto en la infección como en la vacunación. El análisis electroforético del LPS, permite la identificación de un segundo componente de naturaleza exclusivamente polisacáridica, este componente fue originalmente llamado segundo polisacárido o poly-B, pero por representar con toda certeza el equivalente en el género *Brucella* de los haptenos nativos de otras bacterias Gram negativas, actualmente se le denomina como HN⁽⁵⁾.

El HN se comporta de manera diferente que el LPS, pues al menos en animales de experimentación, la aparición de anticuerpos precipitantes depende de la intensidad de su estímulo antigénico; la vacunación con la cepa 19 en terneras menores de seis meses rara vez induce anticuerpos frente al HN, o al menos estos desaparecen antes de la edad adulta. Por el contrario, la infección natural sí lo hace, posiblemente por la multiplicación activa de la cepa virulenta que causa un estímulo antigénico más intenso y prolongado, proporcionando así el método más específico para diferenciar animales infectados de vacunados con la cepa 19^(6,7).

Aunque actualmente el uso de la vacunación con la cepa 19 es mínimo en México, existe todavía una gran cantidad de vacas revacunadas con este biológico. El objetivo de este trabajo fue determinar mediante diversas pruebas diagnósticas, tanto oficiales como no oficiales, si los

anticuerpos que se presentan son debidos a infección, o a la vacunación en bovinos revacunados con dosis reducida de la cepa 19 de *B. abortus*, y realizar la confirmación mediante el estudio bacteriológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 100 vacas lecheras de la raza Holstein, teniendo como criterio de inclusión que fueran positivas a la prueba de tarjeta (PT); las vacas habían sido vacunadas cuando tenían entre tres a seis meses de edad con la cepa 19 de *B. abortus* (Productora Nacional de Biológicos) a dosis clásica (1×10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) por ml) y revacunadas de adultas con dosis reducida (3×10^8 ufc/ml). Los animales tenían entre un mes y siete años 6 meses de haber sido revacunados; 90 de las vacas se encontraban en lactación y 10 estaban en periodo seco.

El ganado pertenecía a 25 diferentes establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), que se encuentra localizado al sur del estado de Hidalgo. En 1997, el CAIT tenía un total de 126 establos, de los cuales 118 se encontraban en operación, 21 se utilizaban para cría y para vacas secas y 97 para la producción de leche. Existía una población estimada de 24,985 vacas, con una producción en línea promedio de 21 litros y una producción diaria de aproximadamente 400,000 litros⁽⁸⁾.

Se obtuvieron muestras de suero, guardándolas en viales a -20°C ; los muestreos se realizaron en diferentes fechas conforme se encontraron a los animales positivos a la PT. Se recolectaron

muestras de exudado vaginal mediante un hisopo, colocando la muestra en medio de transporte de Stuart y en las vacas en lactación se obtuvo leche de los cuatro cuartos, previa asepsia del meato del pezón utilizando alcohol al 70 %, colectándose la muestra en tubos estériles de 20 ml. La leche fue centrifugada durante 15 min, obteniéndose el sobrenadante y el sedimento⁽⁹⁾.

La PT se realizó con antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración celular del 8% y con un pH de 3.5 siguiendo la técnica descrita en la literatura⁽⁹⁾. Para la prueba de rivanol se utilizó un antígeno de *B. abortus* 1119-3, con una concentración celular del 4% y se llevó a cabo siguiendo las indicaciones referidas en la literatura⁽⁹⁾; se dieron como positivos aquellos sueros que resultaron positivos a la dilución 1:50 o mayor⁽³⁾. La fijación del complemento (FC) se realizó con la técnica en caliente⁽⁹⁾, dando como positivos los sueros que dieron títulos iguales o mayores de 1:8⁽³⁾. La prueba de inmunodifusión radial (IDR) se realizó con hapteno nativo obtenido a partir de la cepa de *B. melitensis* 16 M; el antígeno se utilizó a una concentración de 20 mg en un gel de agarosa preparado en una solución amortiguadora de glicina^(7,10).

Las muestras de leche y exudado vaginal se inocularon por duplicado en placas de medio selectivo Farrell y se incubaron con 5-10% de CO_2 , a 37°C durante por lo menos ocho días. De las colonias sospechosas se realizaron frotis para la tinción de Gram, y se sembraron en medio de agar brucela, para la identificación de la morfología colonial.

Para determinar su especie y biotipo, se realizaron pruebas de citrato, oxidasa, urea, triple azúcar hierro y producción de H₂S; la dependencia a colorantes, tionina y fucsina, reacción a los antiseros mono-específicos A y M, la fagotipificación y la susceptibilidad a los antibióticos⁽⁹⁾.

Tomando en cuenta que los resultados fueron variables discretas, como método estadístico se eligió el análisis de Kappa, para comparar proporciones entre pruebas, con el fin de establecer la concordancia entre éstas⁽¹¹⁾.

RESULTADOS

En las pruebas serológicas se obtuvieron los siguientes resultados positivos: La PT presentó 100% de reactores, FC 52%, rivanol 87% e IDR un 74%.

Del 74% de las vacas positivas a IDR se logró el aislamiento de *B. abortus*, en 10 animales: del 26% de las vacas negativas a IDR se obtuvieron resultados positivos

a las pruebas de PT, FC y rivanol a distintos meses posrevacunación (Cuadro 1), pero no se obtuvo ningún aislamiento de la bacteria.

Los resultados de las pruebas bioquímicas muestran que las cepas aisladas de las muestras de leche fueron *B. abortus* biotipo 1, ya que resultaron negativas a las pruebas de TSI y citrato; positivas a las pruebas de oxidasa, producción de H₂S y ureasa; hubo crecimiento en presencia de los colorantes fucsina y safranina en todas sus concentraciones, además de reaccionar con el antisuero inmuno específico A y presentar lisis en presencia de los fagos Iz, Wb y Tb; los diez aislamientos resultaron ser cepas de campo. De las muestras de exudado vaginal, no se pudo obtener el aislamiento de brucelas.

El análisis estadístico de Kappa no muestra diferencias significativas entre las pruebas serológicas utilizadas, por lo que no existió concordancia.

Cuadro 1. Reactores positivos (%) a diversas pruebas serológicas de vacas revacunadas con cepa 19 de *Brucella abortus*, negativas a la prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo

Animales No.	Rangos de meses postrevacunación	Pruebas serológicas		
		Tarjeta	Fijación del complemento	Rivanol
10	1-10	100.0	20.0	50.0
8	11-20	100.0	25.0	75.0
7	21-32	100.0	28.5	71.4
1	33-90	100.0	100.0	100.0

DISCUSIÓN

En México, la revacunación contra brucelosis en vacas es un procedimiento muy recurrido por los ganaderos, llegando a usar revacunaciones anuales, esto a pesar que la NOM de la Campaña contra la brucelosis, sólo permite una revacunación en zonas con alta presencia de la enfermedad⁽²⁾.

Aunque la revacunación constituye una herramienta muy usada, ha sido poco estudiada; existe un antecedente en la cuenca lechera de Tizayuca, donde durante el año de 1983, la incidencia de la brucelosis se incrementó, por lo que se tomó la decisión de revacunar con dosis reducida a las vacas antes de su primer servicio posparto. En ese año se sacrificaron sólo 67 animales positivos, lo que representó 0.36% de la población; para 1987 solamente se presentaron cinco casos de vacas rectoras⁽¹²⁾, pero actualmente no se tiene una evaluación del impacto de esta práctica⁽⁸⁾.

Las pruebas serológicas recomendadas en la NOM para el diagnóstico de brucelosis bovina, presentan dificultades para discernir de forma temprana entre anticuerpos debidos a la vacunación, con los ocasionados por la infección, por lo que se tiene la recomendación de no realizar el diagnóstico en bovinos vacunados con la dosis normal o reducida de la cepa 19, hasta pasados diez meses de la vacunación⁽²⁾.

En un trabajo realizado con becerras vacunadas con dosis clásica de *B. abortus* cepa 19, se encontró que las pruebas oficiales PT, rivanol y FC, muestran una especificidad del 95% al día 270

posvacunación, lo que da sostén a la recomendación de la NOM y que contrasta con la prueba de IDR que desde el día 60 posvacunación da el 100% de especificidad⁽⁴⁾.

En el presente trabajo, con la diferencia de que se utilizaron sueros de vacas revacunadas, se encontraron títulos positivos a las pruebas oficiales, PT, FC y rivanol, a más de 32 meses posrevacunación, lo que se atribuye a que en la revacunación la respuesta inmune se incrementa, habiendo una producción de IgG en grandes cantidades, mientras que la presencia de IgM es menor⁽¹³⁾.

Existen dos estudios realizados en vacas revacunadas con la cepa 19; en uno de ellos realizado en vacas revacunadas una sola vez con dosis reducida, las pruebas de tarjeta, rivanol, ELISA-I y FC presentaron una mayor cantidad de reactores positivos entre los 30 a los 270 días. En contraste, las pruebas de ELISA-C e IDR dieron un bajo número de sueros positivos y estos correspondían a las vacas con resultado positivo a la bacteriología. En los resultados de especificidad se pudo apreciar que ELISA-C e IDR presentaron un valor del 100% durante todo el experimento, a los 270 días las pruebas de tarjeta, rivanol, FC y ELISA-I dieron 53%, 74%, 59% y 76% respectivamente⁽⁴⁾. El otro trabajo, realizado recientemente en México sobre la revacunación de bovinos, tiene la particularidad de que se efectuó en un establo donde las vacas tenían de dos a seis revacunaciones con dosis reducida, y la PT dió un 98% de reactores, el rivanol 76% y la IDR sólo 21% de positivos, de

los cuales se obtuvo el aislamiento de *B. abortus*⁽¹⁴⁾.

La PT en el caso de la revacunación es usada de rutina para el diagnóstico, sin embargo, los resultados que se obtienen no son confiables por el alto número de falsos positivos⁽¹³⁾. Esto se observó en este trabajo, ya que a pesar de que todas las vacas eran positivas a la PT, al realizar las diferentes pruebas serológicas oficiales y la prueba de IDR existieron resultados negativos, indicando que la PT no es suficiente para establecer un diagnóstico confiable.

La prueba de rivanol presentó en bovinos vacunados con dosis clásica de cepa 19 una especificidad del 95% a los 270 días posvacunación⁽¹⁵⁾, mientras que en otro trabajo se encontró que en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19, el rivanol fue poco efectivo al diferenciar animales vacunados de infectados, ya que a los 270 días posrevacunación presentó una especificidad del 85%⁽⁴⁾. En el presente trabajo, el rivanol detecta anticuerpos durante 20 meses posrevacunación, por lo que no se considera a esta prueba efectiva para diferenciar animales revacunados de infectados.

La prueba de IDR, al compararla con otras pruebas diagnósticas, demostró ser más sensible y más específica que FC en bovinos vacunados en edad adulta con cepa 19 de *B. abortus*^(6,7). En el presente estudio se encontraron resultados positivos a FC, en siete sueros de vacas con más de 21 meses posrevacunación, siendo un 28.5% del total de vacas negativas a IDR. La comparación es debido a que la IDR

tiene la capacidad de detectar a los individuos que no presentan la enfermedad. En una exposición prolongada de la bacteria al sistema inmune como es el caso de una infección por cepa de campo, se producen anticuerpos contra el HN y no cuando se trata de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de una vacunación con la cepa 19 de *B. abortus*, lo cual la hace una prueba de gran importancia para diferenciar animales infectados de vacunados, y básica en la toma de decisiones para que un animal sea eliminado⁽⁶⁾. El uso de la revacunación hace que el estímulo antigénico sea más fuerte, sin embargo, la IDR es capaz de seguir diferenciando vacas revacunadas de infectadas, como se demuestra en éste y otros trabajos^(4,14).

En estudios realizados en dos establos del estado de México, se logró el aislamiento a partir de leche de *B. abortus* biotipo 1; cabe hacer notar que en uno de los establos las vacas procedían del CAIT^(4,14). En el presente trabajo, también se consiguió el aislamiento a partir de muestras de leche de *B. abortus* biotipo 1; los resultados de estos trabajos realzan la predominancia del biotipo 1 en esta zona y es importante establecer que no se lograron aislamientos de cepa 19, lo que podría suponerse por la arraigada práctica de la revacunación.

El hecho de realizar aislamientos de *B. abortus* en diez vacas, a partir de las 90 muestras de leche, nos indica que existían bastantes vacas infectadas, a pesar de estar revacunadas. El estudio bacteriológico es poco sensible, es decir, existen animales que resultan negativos, pero que están infectados, ya que se necesita una gran

cantidad de bacterias para lograr el aislamiento, o que la muestra sea tomada cuando se estén excretando las brucelas⁽¹⁶⁾. Por lo que, el que se obtuviesen un 11% de aislamientos, nos indica una alta prevalencia de brucelosis en las vacas revacunadas, hecho que se comprueba con el 74% de reactivos a la IDR, que es una prueba que tiene un 100 % de especificidad^(10,15) por lo que no presenta resultados falsos positivos. Aunque la NOM contempla una revacunación única con dosis reducida de cepa 19, no menciona nada sobre las pruebas diagnósticas, ni el tiempo en que deben utilizarse.

De acuerdo a este estudio, después de los 10 meses posrevacunación, con las pruebas oficiales todavía se presentaban muchos animales falsos positivos, por lo que el diagnóstico de estos animales sería poco confiable. Con respecto a la prueba de rivanol, que es la oficial para diferenciar entre animales vacunados e infectados, la técnica presenta baja especificidad por su gran cantidad de falsos positivos.

Aunque la vacunación con RB51 ha desplazado la utilización de la cepa 19, existe una gran cantidad de bovinos vacunados y revacunados repetidamente con la cepa 19, para los cuales la prueba de IDR es la única opción viable para un diagnóstico diferencial.

La prueba de IDR, se tomó como prueba de oro, debido a su elevada especificidad y a su característica de diferenciar entre vacas infectadas de las vacunadas con cepa 19^(4,7,10), por ello el 74% de las vacas reactivas a la IDR, fueron consideradas como positivas a pesar de estar revacunadas, el 26% de las vacas positivas a la PT y negativas a IDR, se consideran como reactivas posrevacunación. Las pruebas oficiales no son eficientes para

diferenciar vacas revacunadas con cepa 19, por lo que la IDR es una buena alternativa para el diagnóstico.

BACTERIOLOGICAL AND SEROLOGICAL STUDY OF BRUCELOSIS IN COWS REVACCINATED WITH REDUCED DOSES OF *Brucella abortus* STRAIN 19

ABSTRACT

Bustamante SJ, Salazar HFI, Díaz AE, Manzano CC, Pérez GR, Hernández AL. *Téc Pecu Méx.* 2000;38(1)35-42. The goals were to determine by different diagnostic tests, whether the antibodies in cows are due to infection or revaccination with strain 19 *Brucella abortus* reduced dose; and also to know the biotypes and strains isolated. One hundred Holstein cows from 25 herds in the state of Hidalgo were vaccinated when three to six months old with strain 19 classic dose (1×10^{10} cfu/ml) and revaccinated when they were adult. One hundred samples of serum and vaginal exudate and 90 milk samples were taken. The complement fixation, rivanol and radial immunodiffusion (RID) with native haptene tests were made. The isolation of *Brucella* was done according to techniques previously reported. After typing, ten isolated strains were identified as *B. abortus* biotype 1; 52% of the cows were positive to complement fixation test, 87% to rivanol and 74% for RID. Only RID positive animals were considered true positives; 26% of animals positive to card test and negative to RID were considered false positive due to revaccination antibodies. The official tests were not good enough to differentiate animals revaccinated with strain 19. From infected animals, RID was the best test for diagnostic purposes.

KEY WORDS: Brucellosis, Dairy cows, Radial immunodiffusion, Revaccination.

LITERATURA CITADA

1. Nicoletti P. A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dairy herds in Florida. "80^a Annual

- meeting. United States Animal Health Association, USDA. 1976: 86-93.
2. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. Diario Oficial. México, D.F. 20 de agosto de 1996: 43-66.
3. Díaz GR, Blasco JM. Diagnóstico inmunológico. En: Luzán S. editor Brucelosis bovina. Madrid España. 1994: 92-100.
4. Aparicio BA. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis revacunado con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus* [tesis licenciatura]. Cuautitlán, Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
5. Moriyón UI. *Brucella* cell structure. In: Memory to 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago ILL, USA November 8-9 1997: 3-18.
6. Baerman DT, Jones LM. Radial immunodiffusion, a confirmatory test for bovine brucellosis". In: 83^a Anual Meeting United States Animal Health Association. Department of Veterinary Science. University of Wisconsin. Madison 1979.
7. Díaz-Aparicio E, Marín C, Alonso-Urmeneta B, Aragón V, Pérez-Ortiz S, *et al.* Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. J Clin Microbiol 1994; (32):1159-1165.
8. Guerrero LM. Evaluación económica de un programa de control de brucelosis bovina en un hato lechero del C.A.I.T. durante 1993 [tesis licenciatura]. Cuautitlán, Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1993.
9. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris. INRA editor. 1988.
10. Díaz R, Toyos MD, Salvo D, Pardo M. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. Ann Rech Vet 1981;(12):35-39.
11. Thompson DW, Walter DS. A reappraisal of the Kappa coefficient. J Clin Epidemiol 1988;41(10): 949-958.
12. Flores CR. Uso de la vacuna elaborada con cepa 19 en dosis reducidas para el control de la brucelosis en la República Mexicana. En: Memorias del simposium internacional de medicina preventiva. Monterrey NL. Universidad Autónoma de Nuevo León, 1992: 23-28
13. Suárez GF. Inmunología en brucelosis. En: Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México, DF. 1994: 18.
14. González ME. Empleo de la prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para el diagnóstico de brucelosis en bovinos revacunados en un establo ubicado en Cuautitlán, México [tesis licenciatura]. Cuautitlán, Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1998.
15. Reyes PR. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina [tesis licenciatura]. Cuautitlán, Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1996.
16. Villegas AH. Estudio bacteriológico y fagotipificación de brucelas aisladas de caprinos y bovinos [tesis licenciatura]. México, DF. Universidad Nacional Autónoma de México. 1997.