

149  
2a



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**"RESPUESTA SEROLOGICA EN OVEJAS  
ADULTAS, VACUNADAS CON DOS DIFERENTES  
DOSIS REDUCIDAS DE REV. 1 Br. melitensis,  
BAJO CONDICIONES DE CAMPO"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

**MARIA DE LOURDES MOLINA NAVA**

**ASESORES: FRANCISCO SUAREZ GUEMES  
EFREN DIAZ APARICIO**

**MEXICO, D. F.**

**1988**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O

	PAG.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
MATERIAL Y METODOS.....	16
RESULTADOS.....	18
CUADROS.....	23
GRAFICAS.....	25
DISCUSION.....	27
CONCLUSIONES.....	29
LITERATURA CITADA.....	30

MOLINA NAVA MA. DE LOURDES. Respuesta serológica en ovejas - - adultas, vacunadas con dos diferentes dosis reducidas de Rev. 1 Br. melitensis, bajo condiciones de campo (bajo la dirección - de: FRANCISCO SUAREZ GUEMES y EFREN DIAS APARICIO).

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso - - crónico, que afecta a los animales domésticos y que puede - - transmitirse con facilidad al hombre, por lo que es una de las enfermedades zoonóticas más importantes en México y representa un verdadero riesgo ocupacional para veterinarios, matanceros\_ y granjeros.

Los ovinos son afectados por tres especies de brucella: Bruce-lla ovis, que causa problemas de epididimitis en el carnero, - Br. melitensis y Br. abortus, las cuales se caracterizan por - afectar los órganos genitales, causando aborto, retención pla-centaria, orquitis, epididimitis y una considerable reducción\_ de la eficiencia reproductiva.

La brucelosis en caprinos y ovinos puede prevenirse mediante - la aplicación de la vacuna de Brucella melitensis cepa Rev. 1, la cual es capaz de producir una inmunidad confiable; debe - - aplicarse en hembras jóvenes de 3 a 6 meses de edad, por vía - subcutánea. Sin embargo, algunos investigadores han estudiado\_ la posibilidad de emplear dosis reducidas de Rev. 1 para vacu-nar animales adultos e incluso gestantes.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la persistencia y el nivel de anticuerpos producidos por la vacuna Rev. 1 Br. melitensis a dosis reducidas en borregas adultas, comparando dos diferentes dosis:  $5 \times 10^3$  UFC y  $1 \times 10^5$  UFC.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 60 borregas, las cuales se dividieron en tres grupos de 20 ovinos cada uno: El grupo A fue vacunado con una dosis de  $5 \times 10^3$  UFC; el grupo B se inmunizó usando la dosis  $1 \times 10^5$  UFC y el grupo C que no recibió tratamiento.

Los muestreos serológicos se tomaron el día de la vacunación y después de ésta, los días 15, 30, 60, 90 y 120; a estos sueros se les aplicaron las pruebas diagnósticas de aglutinación lenta en tubo, tarjeta y Coombs.

De acuerdo a los resultados obtenidos se demostró que usando la prueba de tarjeta, las ovejas vacunadas con una dosis de  $5 \times 10^3$  UFC de Rev. 1 B. melitensis, dejan de presentar títulos vacuantes a los 60 días, y vacunando con la dosis  $1 \times 10^5$ , desaparecen los títulos hasta los 90 días. En cambio, en las muestras sometidas a la prueba de aglutinación lenta en tubo, la persistencia de los anticuerpos es igual en ambas dosis hasta los 120 días, no así en los niveles alcanzados, ya que con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC se llegó a obtener hasta el 100% de positividad en el día 15 y con la dosis de  $5 \times 10^3$  UFC sólo se alcanzó el 70% de positivos a los 15 días. En ambas dosis usando la prueba de Coombs aún se presenta reacción a los 120 días, -

pero en títulos bajos; con la dosis  $5 \times 10^3$  UFC un 5% y con la <sup>3</sup>  
dosis  $1 \times 10^3$  UFC un 10%.

## INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico, los ovinos son afectados por tres especies de brucela: B. ovis que tiene más importancia en machos produciéndoles epididimitis, baja de fertilidad y esterilidad, B. ovis afecta en menor grado a las hembras (22), en tanto que B. melitensis y B. abortus se caracterizan por afectar los órganos genitales, causando aborto, retención placentaria y una considerable reducción de la eficiencia reproductiva y en machos pueden producir baja de fertilidad (2, 7, 8, 13 y 14).

Además de los estragos que produce la brucelosis en los animales domésticos, pueden transmitirse con facilidad al hombre, por lo que es una de las enfermedades zoonóticas más importantes en México y que representa un verdadero riesgo ocupacional para los médico-veterinarios, matanceros y granjeros (8,10).

Al parecer las principales fuentes de infección humana se deben a la ingestión de leche cruda de animales infectados y, de quesos preparados con esta leche. También se puede contraer por contacto directo con las excreciones y secreciones de los animales infectados (8,14).

La brucelosis en el hombre se presenta con un estado febril que dura de una a dos semanas alternando con períodos apiréticos de dos o más días, en fases intermitentes y ondulantes, acompañada de estreñimientos, anemia progresiva y debilidad, -

Son frecuentes la aparición de neuralgias, artritis, tumefac--  
ción intestinal, a veces, no siempre se producen abortos, las\_  
mujeres infectadas eliminan brucelas por la leche. (8, 10, 26).

## A N T E C E D E N T E S

A lo largo del mediterráneo se conocía desde los tiempos de -- Hipócrates la existencia de una fiebre, caracterizada por la - intermitencia, fue hasta el año de 1887, cuando Bruce aisla -- por primera vez las brucelas a partir de los bazos de solda-- dos británicos muertos en la Isla de Malta de una enfermedad - febril denominada Fiebre de Malta. La fuente del organismo - agresor, al que denominó Micrococcus, no fue descubierta hasta 1904 cuando miembros de la British Mediterranean Fever Commi-- sion lo cultivaron a partir de la leche y de orina de cabras\_ aparentemente sanas, cuyo suero poseía aglutininas para la bru\_ cela (13).

Brucella melitensis afecta a cabras y en menor grado a ovejas; se ha informado de su presencia en ovinos en el sur de Europa, en México, y en algunas zonas de la parte sudoccidental de los E.U.A., en el oeste de Argentina y en Siria (8, 23, 25). En Mé\_ xico, se demostró la presencia de anticuerpos contra B. Meli-- tensis en ovinos desde 1974 (21).

Comprendiendo la urgente necesidad de encontrar un método efec\_ tivo para la inmunización de los animales domésticos contra la infección causada por B. melitensis, Herber y Elberg aislaron\_ una cepa de una colonia de B. militensis, la que llamaron Rev. 1, la cual es una mutante reversa de una cepa dependiente de - estreptomycin, de baja virulencia, altamente inmunogénica, es\_ table y no revierte a virulenta en pasajes continuos (3, 29).

Con el fin de comprobar la estabilidad de la cepa Rev. 1 en --  
ovinos, Neeman y Ulasevich realizaron trabajos en borregos y -  
cuyes, donde demostraron que no existían cambios en las propie-  
dades morfológicas, tintoriales, bioquímicas, aglutinantes y -  
antigénicas, ni de virulencia (3).

Por otra parte, Renoux y Neeman realizaron experimentos en bo-  
rregas, a fin de evaluar vacunas, utilizando diferentes cepas\_  
entre ellas la Rev. 1 con la cual se produjo buena protección\_  
a estos animales (3). Otros experimentos realizados por Van --  
Heerden y Van Resburg, así como los trabajos de Gradwell y co-  
laboradores permitieron comprobar la efectividad de la cepa --  
Rev. 1 como agente inmunizante en carneros para protegerlos --  
contra la infección de B. ovis (3, 16).

Con relación a la eliminación de la cepa vacunal Rev. 1, Nee--  
man, al igual que Jones y Marly, realizaron experimentos donde  
intentaron el aislamiento de Rev.1 a partir de la leche, des-  
pués de la vacunación, sin ser esto posible (12, 19). Paltri--  
niere y col. utilizaron la vacuna de Rev. 1 a una dosis de  $1.5 \times 10^9$   
en ovejas de cuatro a seis meses de edad y, once meses -  
después de la vacunación fueron desafiadas con la cepa 53H38 -  
B. melitensis, por vía conjuntival y ninguna de estas borregas  
abortó (29). Asimismo, Unel y Col. realizaron otro experimento  
donde vacunaron a un grupo de borregas de cuatro a seis meses\_  
de edad con Rev. 1 B. melitensis, y que posteriormente, fueron  
desafiadas en su primera gestación con las capas H 38 biotipo\_  
1, cepa Turkish biotipo 2, y la cepa Cifteler a diferentes do-

sis y se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la inmunidad conferida por Rev. 1 (32).

Por las características de la cepa Rev. 1 B. melitensis, se recomienda la vacunación por vía subcutánea, en hembras de tres a seis meses de edad, tanto en ovinos como en caprinos. No debe aplicarse en adultos gestantes, pues llega a causar aborto y la bacteria puede persistir en los ganglios linfáticos y en la glándula mamaria, por lo que se podría confundir el diagnóstico (3,15). Sin embargo, algunos investigadores han estudiado la posibilidad de emplear dosis reducidas de Rev. 1 para vacunar animales adultos e incluso gestantes y al parecer este procedimiento elimina las desventajas antes mencionadas sin reducir los niveles de protección conferidos (5, 11). La dosis reducida ha sido utilizada en animales adultos en Israel (1973) con una dosis de  $5 \times 10^4$  de Rev. 1 para minimizar la excreción de la cepa vacunal por la leche (30).

## DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

ETIOLOGIA. La Brucella melitensis es un cocobacilo pequeño (0.5 0.7) sin movimiento, Gram negativo, no esporulado, crece bien en aerobiosis a 37°C y en un pH de 6.8 a 7.0, forma colonias típicas pequeñas, redondas, convexas y traslúcidas (3, 8, 14). La prueba de catalasa y oxidasa resultan positivas; produce hidrólisis de urea y reducción de nitratos (6, 14). Los medios recomendables para integrar el aislamiento son a base de triptosa y tripticasa (31). La B. melitensis tiene forma coccidea a diferencia de B. abortus que toma la forma de bacilos largos; B. abortus y B. suis producen SH<sub>2</sub>, mientras que B. melitensis también lo produce pero en pequeñas cantidades (20, 26).

La cabra es el huésped habitual de la Brucella melitensis y se propaga con facilidad al hombre y a otras especies (8, 22). Es insensible al calor y a los desinfectantes habituales; se destruye con el calentamiento y medios acuosos en diez minutos a 60°C y a 0°C vive durante un mes; en el polvo durante seis semanas; en el agua y en el suelo, diez semanas; en el exudado uterino infectado o en congelación, durante siete meses; no resiste a la acidificación de la leche, muriendo en dos días; en las mantequillas, quesos blancos y requesón resisten hasta 30 días y a veces más; si el estiércol estuviera amontonado, mueren pronto, como consecuencia de la fermentación (26).

PATOGENIA.- La brucelosis ovina, producida por Brucella meli-

tensis se transmite por contacto entre animales infectados y susceptibles o en lugares contaminados, siendo la principal vía de acceso la oral, aunque también puede penetrar por vía conjuntival y nasal, mediante aerosoles y excepcionalmente, por soluciones de continuidad (grietas, heridas, escoriaciones en la piel ocasionadas por el ordeño) (13, 15, 26).

Al entrar al organismo las brucelas son ingeridas por los fagocitos, que pretenden eliminar la infección. Debido a la capacidad de estas bacterias de multiplicarse en el interior de los fagocitos, causan la destrucción de los mismos y logran llegar a los ganglios linfáticos, pasando posteriormente a la sangre, donde se produce una bacteremia por 30 o 50 días. La bacteremia propicia la localización posterior de la bacteria en sitios de predilección como son: el bazo, la médula osea, los ganglios linfáticos, la glándula mamaria y especialmente en el útero y los tejidos fetales.

Con la ingestión de líquido amniótico se infecta el feto por la vía digestiva produciendo gastritis, enteritis, afectando órganos parenquimatosos; el feto muere y es expulsado generalmente en el último tercio de la gestación. Las hembras suelen tener retención placentaria, seguida de metritis e incluso infección generalizada, acompañada de esterilidad. Si se produce la expulsión de las placentas, la matriz queda libre de brucelas a las tres semanas de producirse el parto o el aborto, ya que la mucosa no gravida resulta inadecuada para la multiplicación.

ción de la brucela. En los machos las bacterias tienen afinidad por los tejidos de los órganos genitales. En algunas ocasiones hay recuperación espontánea aproximadamente a los 90 días (5, 15, 18, 26).

**SIGNOS CLINICOS.-** El aborto es la principal manifestación de esta infección en los ovinos y caprinos, ocasionando ésto, una contaminación masiva del medio ambiente por el gran número de microorganismos que se encuentran en el feto, la placenta y los líquidos de los animales infectados; la eliminación vaginal de la Brucella persiste normalmente durante tres meses después del aborto. Una eliminación en menor escala se produce por la leche, la orina y las heces (8,15,18).

**DIAGNOSTICO.-** Las pruebas diagnósticas convencionales que existen no tienen un margen amplio de seguridad por lo que para el diagnóstico definitivo de los animales portadores de Brucella sólo el aislamiento del germen nos dá la certeza de una infección. Esto puede lograrse a partir de exudado vaginal y/o leche de las hembras que han abortado. Se recomienda también, el cultivo a partir de placentas y tejidos fetales especialmente del contenido estomacal (1,4,9,15).

Las pruebas serodiagnósticas más utilizadas son:

- Prueba de aglutinación rápida en placa,
- Prueba de aglutinación en tubo,
- Prueba de fijación de complemento,
- Prueba de aglutinación de 2-mercaptoetanol,

Prueba de tarjeta

Prueba de Coombs.

PREVENCION:

Características biológicas de la cepa Rev. 1: Según la primera descripción de Elberg y Meyer (1958), cuando la cepa Rev. 1 -- crece en condiciones óptimas, produce colonias como punto de -- alfiler después de 72 horas de crecimiento en medio sólido; -- después de 96 horas, las colonias son como de 1 mm de diámetro máximo de 1 a 2 mm, dependiendo de las condiciones, pero siempre serán más pequeñas que las colonias producidas por otras -- cepas de B. melitensis bajo las mismas condiciones (3). El cre -- cimiento en el medio líquido es estimulado por el eritritol -- (3,12). La producción de H<sub>2</sub>S por la cepa Rev. 1 es mínima, como sucede con otras cepas de Brucella melitensis. La prueba de ureasa es negativa.

Las características de crecimiento en presencia de los antibióticos penicilina y estreptomycin, proporcionan un método muy -- valioso para diferenciar la cepa Rev. 1 de otras cepas de B. militensis. Las cepas típicas de campo crecen libremente en -- medio conteniendo 2.5 a 5 unidades de penicilina por ml, mientras que la cepa Rev. 1 es completamente inhibida por estas -- concentraciones.

Por otra parte, la cepa Rev. 1 muestra un crecimiento aceptable en medios adecuados, conteniendo de dos a cinco microgramos de estreptomycin por ml, concentración que resulta sufi--

ciente para inhibir completamente la mayor parte de las cepas virulentas de B. melitensis que persisten en los tejidos por 6 a 12 meses (3).

De acuerdo a las características antes mencionadas y a pruebas controladas de laboratorio se ha demostrado que la vacuna de B. melitensis cepa Rev. 1, es capaz de producir inmunidad confiable en ovinos y caprinos. Una dosis de  $1 \times 10^9$  de la vacuna de Rev. 1 aplicada a hembras jóvenes de 3 a 6 meses de edad garantiza una inmunidad satisfactoria (3, 13, 15).

Posteriormente se procedió a vacunar a los 2 grupos destinados para las diferentes dosis. Se obtuvieron muestras serológicas de la totalidad de los animales el día de la vacunación y después de ésta, los días 15, 30, 60, 90 y 120. Las muestras sanguíneas fueron tomadas asépticamente, se dejaron cuatro horas a temperatura ambiente para la formación de coágulo y la obtención del suero; posteriormente el suero obtenido se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante, se colocó en frascos viales estériles y se mantuvo a una temperatura de menos de 20°C hasta su utilización.

A estos sueros se les aplicaron las pruebas de aglutinación en tubo, tarjeta y Coombs, siguiendo las técnicas descritas por Alton (4).

**PRUEBA DE TARJETA.**- Se conoce también con el nombre de antígeno acidificado tamponado. Es una prueba rápida, sensible y específica. Es de tipo cualitativo de aglutinación macroscópica y que se efectúa en una sola dilución y que detecta principalmente los anticuerpos o inmunoglobulinas G, esto se debe a que la acidez del antígeno inactiva a las inmunoglobulinas M (IgM) (4,9).

**PRUEBA DE AGLUTINACION LENTA EN TUBO.**- Es una prueba de seroaglutinación que permite identificar las inmunoglobulinas IgM e IgG, la cual puede ser útil como prueba diagnóstica básica y para corroborar los resultados de otras pruebas serológicas. Es una prueba de carácter semi-cuantitativo y surge el proble-

ma de que algunos sueros caen en el nivel de sospechosos. Presenta limitantes tales como: no poder diferenciar anticuerpos vacunales de aquellos producidos por infección natural; tampoco permite detectar anticuerpos de infecciones recientes o de estados de cronicidad y además tiene la desventaja de que algunas veces existe reacción cruzada con anticuerpos dirigidos -- contra otros microorganismos (4, 9, 14).

PRUEBA DE COOMBS.- En algunos casos los sueros de los ovinos infectados, sobre todo en los casos de infecciones crónicas no reaccionan a las pruebas de aglutinación simples, por lo que se requiere de pruebas específicas para detectar los anticuerpos (14).

La prueba de Coombs es considerada como la más sensible para el diagnóstico de *B. melitensis* (1, 4, 9). En esta prueba, los anticuerpos unidos a las células se comportan como un antígeno en la reacción con la antigamaglobulina ovina, dando una reacción observable. El suero que no reacciona en esta fase se considera libre de anticuerpos (7). La antigamaglobulina fue elaborada y proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (S.A.R.H.).

#### ANALISIS ESTADISTICO.

La comparación de los tres grupos en cuanto a los títulos serológicos obtenidos por la prueba de aglutinación lenta en tubo y Coombs se hizo mediante análisis de varianza y la prueba de Tukey y para los resultados de la prueba de Tarjeta se utilizó ji cuadrada ( $X^2$ ). (27,33).

## MATERIAL Y METODOS

La investigación se realizó en el laboratorio del proyecto de Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (SARH), en Palo Alto, D.F., y en una explotación ovina la cual se encuentra localizada en Zumpango, en el Estado de México.

Se utilizaron 60 ovinos hembras, encastadas con Rambouillet, de más de dos años de edad y sin antecedentes de vacunación con Rev. 1. Se dividieron en tres grupos en forma aleatoria, de los cuales uno se tomó como testigo y los otros dos grupos fueron vacunados por vía subcutánea con dos diferentes dosis reducidas de Rev. 1 B. Melitensis de la siguiente manera:

GRUPO A: 20 borregas vacunadas con dosis  $5 \times 10^3$  UFC

GRUPO B: 20 borregas vacunadas con dosis  $1 \times 10^5$  UFC

GRUPO C: 20 borregas controles.

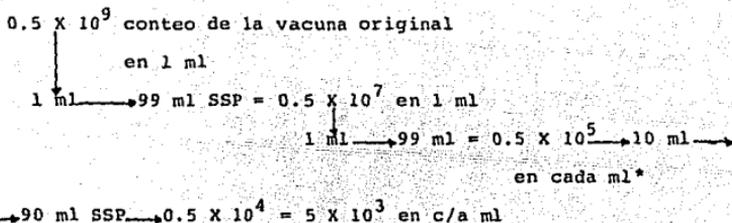
Se utilizó la vacuna Rev. 1 B. melitensis de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, a este biológico se le hizo un conteo de microorganismos viables usando la técnica descrita por Miles y Misra\* (4), la cual consiste en:

Se prepararon diluciones decuples de la vacuna mezclándose 0.1 ml con 0.9 ml de diluyente (solución salina Peptonada), cam-

\* Miles, A.A. y Misra, S.A. J. Hya (Lond) 38:732 (1938). Cita-do en Alton, G.G., Jones L.M. and Pietz, D.E. (4).

biando de pipeta para cada dilución. Las placas de agar utilizadas fueron previamente divididas en seis partes y secadas. Se prepararon de 6 a 8 diluciones de vacuna y simultáneamente en secciones numeradas, se depositó una gota de cada una de las diluciones en cada una de las divisiones de las placas; -- una vez secas las gotas, las placas se incubaron durante 24 a 48 horas. En las superficies de las gotas procedentes de las concentraciones más altas de la vacuna se formaron manchas circulares de proliferación confluyente. Los recuentos se hicieron en las zonas que contenían mayor número de colonias sin signos de confluencia ni gran disminución del tamaño de la colonia por proliferación excesiva. El número de colonias se calculó a partir del promedio de colonias por gota dio el número de gérmenes viables por mililitro contenidos en la suspensión que examina. Una vez conocido el título de la vacuna  $0.5 \times 10^9$  UFC, se llevaron a cabo las diluciones para obtener las dosis reducidas a utilizar.

Diluciones para obtener las dosis reducidas:



\*en 2 ml de la dilución  $0.5 \times 10^5$  hay  $1 \times 10^5$  UFC

Las diluciones se realizaron el mismo día de vacunación, bajo condiciones de esterilidad y manteniendo las vacunas en refrigeración.

## R E S U L T A D O S

En los cuadros Nos. 1 y 2 se observan los resultados de las tres pruebas serológicas utilizadas en este trabajo, de los días 0, 15, 30, 60, 90 y 120, para la detección de anticuerpos contra B. melitensis, inducidos por las dosis  $5 \times 10^3$  y  $1 \times 10^5$  UFC de la vacuna Rev. 1. en ovejas adultas.

Con la dosis  $5 \times 10^3$  UFC, los resultados que se obtienen por la prueba de tarjeta, demuestran que a los 15 días posvacunación, el 40% de los animales fueron reactores positivos, disminuyendo a los 30 días hasta obtener un 25% de positividad del total de los sueros, y finalmente, dando un 100% de negatividad a los 60 días.

En la prueba de aglutinación lenta en tubo se detectó positividad a los 15 días, con el 70% de los sueros reactores positivos, observándose gran cantidad de sueros con títulos 1:25 y 1:50; a los 60 días se disminuyó este porcentaje hasta obtener un 15% de positividad a la dilución 1:25; finalmente, a los 90 días se observa un 5% de sueros positivos a la dilución 1:25 desapareciendo por completo los anticuerpos hasta los 120 días.

Utilizando la prueba de Coombs se observa a los 15 días un 85% de positividad, a los 30 días aumentó el porcentaje hasta alcanzar un 90% de sueros reactores positivos; posteriormente, a los 60 días disminuye el porcentaje de sueros positivos obteniéndose un 30%; a los 90 días se encontró un 15% de positiv-

dad y finalmente a los 120 días, aún se presentó reacción en un 5% de los sueros.

Con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC, los resultados obtenidos en el día 15 por la prueba de tarjeta son de un 95% de sueros reactivos positivos, siendo la totalidad de sueros negativos el día 90 posvacunación. En la prueba de aglutinación lenta en tubo se obtiene mayor porcentaje de animales reactivos positivos que con la dosis anterior, llegando hasta el 100% a los 15 días, observándose gran cantidad de títulos 1:50 y 1:100, no encontrándose reacción de aglutinación a la dilución 1:400, también se observa que a los 90 días el 10% de sueros dan reacción positiva, desapareciendo por completo los títulos a los 120 días.

De acuerdo a la prueba de Coombs, se obtiene un 100% de reacción positiva a los 15 días, manteniéndose estos títulos hasta el día 30, disminuyendo paulatinamente hasta llegar al día 120 con un 10% de sueros positivos con títulos de 1:25 (cuadro 2).

Las muestras serológicas del grupo control sometidas a la prueba de tarjeta lenta en tubo y Coombs, de los días 0, 15, 30, 60, 90 y 120 dieron resultados negativos.

En la gráfica 1 se puede observar que los niveles de anticuerpos obtenidos después de la aplicación de la dosis  $5 \times 10^3$  UFC de Rev. 1 B. melitensis y detectados por la prueba de tarjeta demuestran que a los 15 días posvacunación se obtienen niveles de un 40%, disminuyendo paulatinamente, hasta desaparecer por

completo hasta los 60 días.

Mediante la prueba de aglutinación lenta en tubo, se observa un 70% de positividad a los 15 días; a los 105 días, aún se nota un nivel de anticuerpos bajo, desapareciendo totalmente a los 120 días.

Finalmente los sueros sometidos a la prueba de Coombs, muestran niveles más altos que la prueba anterior y de mayor persistencia, ya que a los 120 días aún se conservan niveles de anticuerpos hasta un 5%. Por otro lado los resultados observados en la gráfica 2, hacen notar que los niveles obtenidos con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC son mayores que los obtenidos con la dosis anterior.

La prueba de tarjeta detecta niveles de anticuerpos hasta de un 95% a los 15 días, desapareciendo los niveles hasta los 90 días.

Por medio de la prueba de tubo se notó un 5% más de los niveles a los 15 días, que con la prueba anterior y a los 105 días los niveles se conservan bajos. Sin embargo, los niveles desaparecen a los 120 días, igual que con la dosis anterior.

Con la prueba de Coombs se muestra que los niveles alcanzados a los 15 días es de un 100% y se conservan los niveles a los 120 días en un 10%. Comparando las gráficas 1 y 2 se observa que los niveles de anticuerpos inducidos por la dosis  $5 \times 10^3$

UFC tienden a desaparecer más rápido que con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC.

El análisis estadístico, aplicado a los resultados de la prueba en tubo y Coombs nos indicó que existe una diferencia significativa (  $p < 0.05$  ) entre la respuesta serológica que presentan los animales vacunados con las diferentes dosis (  $5 \times 10^3$  UFC y  $1 \times 10^5$  UFC ) y de éstos con el grupo control, en todos los casos la diferencia se dió hasta los 60 días posvacunación. -- Con relación a la prueba de tarjeta, las diferencias entre los grupos A y B fueron estadísticamente significativas hasta el día 60, también hubo diferencia significativa entre el grupo vacunado con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC y el grupo control a los 60 días, no así entre el grupo inmunizado con la dosis  $5 \times 10^3$  y el grupo control ya que sólo hubo diferencia hasta el día 30.

En este trabajo, la prueba de Coombs permitió detectar a los sueros que anteriormente habían sido negativos o sospechosos a la prueba hecha en tubo. Machaya y col. investigaron la prevalencia de la brucelosis de Orissa; para la cual utilizaron las pruebas serológicas de aglutinación en placa y tubo, como también la prueba de Coombs, con la cual se detectaron mayor número de animales reactivos positivos (1). Esto demostró la sensibilidad y especificidad de la prueba de Coombs.

Es importante hacer notar que los niveles y persistencia de los anticuerpos obtenidos por las diferentes dosis reducidas no demuestran el grado de inmunidad protectora en los animales vacunados, ya que para demostrar los niveles de protección con feridos habría que desafiar a las borregas. No obstante algunos investigadores han desafiado a borregas vacunadas con dosis reducidas y han obtenido buenos resultados. (5, 30).

RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE TRES PRUEBAS SEROLOGICAS EN 20 BORREGAS ADULTAS PARA DETECTAR LOS TITULOS DE ANTICUERPOS INDUCIDOS POR LA VACUNA REV. 1 Br. melitensis A UNA DOSIS DE  $5 \times 10^3$ .

DIAS DESPUES DE LA VACUNACION

TECNICA SEROLOGICA		15	30	60	90	120
TARJETA	+	40	25	--	--	--
	-	60	75	100	100	--
T U B O	1:25	45	45	15	5	--
	1:50	15	5	--	--	--
	1:100	10	--	--	--	--
	1:200	--	--	--	--	--
	1:400	--	--	--	--	--
	NEG.	30	50	85	95	--
C O M B O	1:25	30	65	20	10	5
	1:50	45	25	10	5	--
	1:100	10	--	--	--	--
	1:200	--	--	--	--	--
	1:400	--	--	--	--	--
	NEG.	15	10	70	85	95

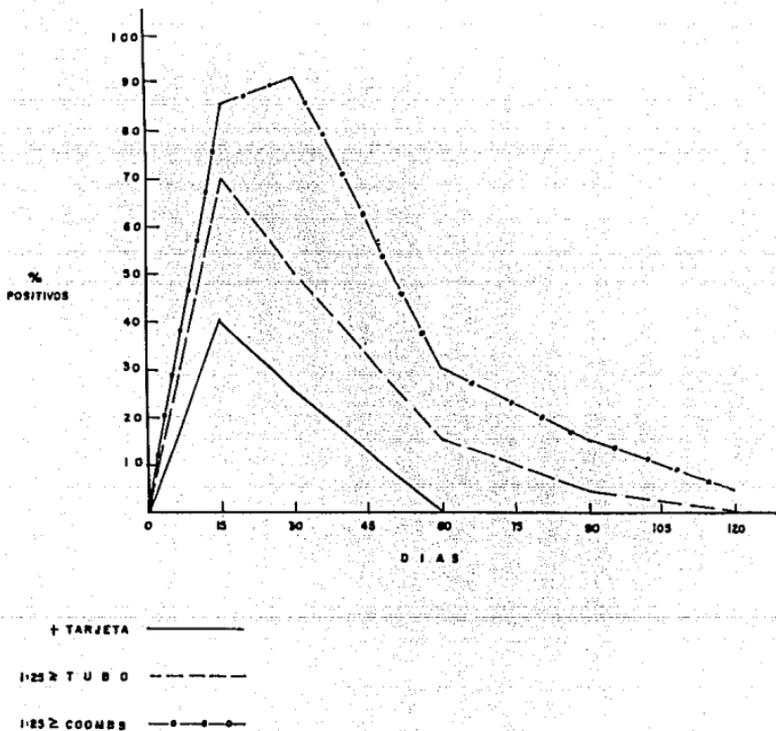
RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE TRES PRUEBAS SEROLOGICAS EN 20 BORREGAS ADULTAS PARA DETECTAR LOS TITULOS DE ANTICUERPOS INDUCIDOS POR LA VACUNA REV. 1 Br. mellitensis A UNA DOSIS DE  $1 \times 10^5$ .

## DIAS DESPUES DE LA VACUNACION

TECNICA SEROLOGICA		15	30	60	90	120
TARJETA	+	95	75	40	--	--
	-	5	25	60	100	100
TUBO	1:25	25	50	55	10	--
	1:50	35	35	10	--	--
	1:100	35	5	--	--	--
	1:200	5	--	--		-
	1:400	--	--	--	--	--
	NEG.	--	10	35	90	100
CODO	1:25	--	25	45	15	10
	1:50	50	45	25	--	--
	1:100	25	30	--	--	--
	1:200	25	--	--	--	--
	1:400	--	--	--	--	--
	NEG.	--	--	30	85	90

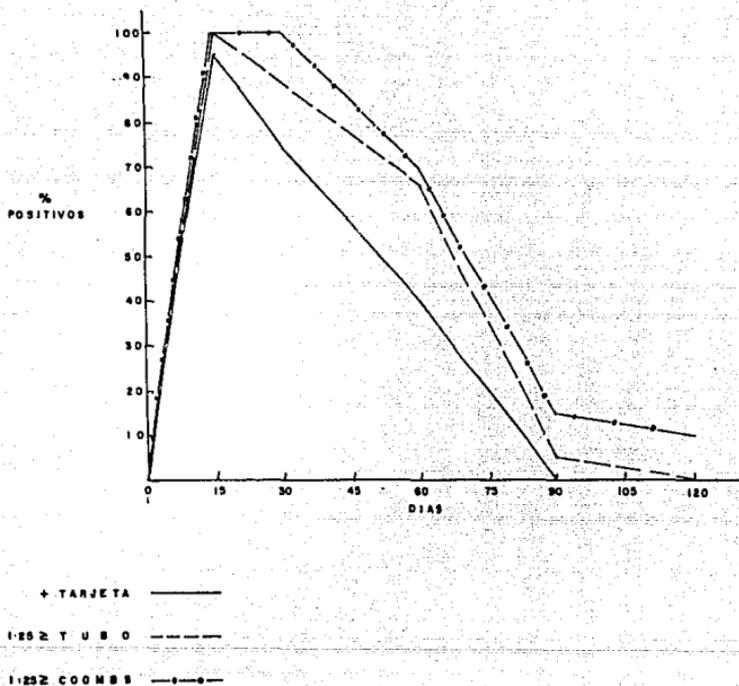
## GRAFICA 1

RESULTADO DE LOS ESTUDIOS SEROLOGICOS DE 20 OVEJAS ADULTAS  
 VACUNADAS CON LA DOSIS  $5 \times 10^3$  UFC DE  
 REV. 1 Br. melitensis



## GRAFICA 2

RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS SEROLOGICOS DE 20 OVEJAS ADULTAS  
 VACUNADAS CON LA DOSIS  $1 \times 10^5$  UFC DE  
 REV. 1 Br. mellitensis



## D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos en este experimento por la prueba de tarjeta, demuestran que a los 15 días posvacunación con la dosis  $5 \times 10^3$  UFC de Rev. 1 B. melitensis, el 40% de los animales fueron retores positivos, desapareciendo por completo los niveles de anticuerpos hasta los 60 días. En cambio, en los ovinos vacunados con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC, se presentó positividad en un 95% en el día 15 y dejan de presentar títulos vacunales a los 90 días (cuadro 1, 2); sin embargo, Blasco y col. vacunaron a borregas gestantes con una dosis reducida de  $5 \times 10^8$  UFC Rev. 1 y por medio de la prueba de tarjeta detectaron en la primera semana el 100% de animales positivos y a las 22 semanas sólo se detectó el 15% (5).

Posiblemente esto se deba a que la dosis empleada por Blasco es mayor que las utilizadas en este experimento; por otra parte, se ha comprobado que en muchas ocasiones, la prueba de tarjeta es negativa en ovinos infectados (4,9), debido a que los niveles bajos de aglutinación se inhiben por el incremento en la acidez del antígeno, resultando esta prueba como la de más baja sensibilidad para detectar animales serológicamente positivos.

En las dosis vacunadas con la dosis  $5 \times 10^3$  UFC, la positividad a la prueba de aglutinación lenta en tubo se detectó a los 15 días, con el 70% de sueros reactores positivos (gráfica 1), observándose gran cantidad de títulos 1:25; 1:50, incapaces de

aglutinar a la dilución 1:200, finalmente, a los 90 días se observa un 5% de sueros positivos, detectados a la dilución 1:25 por lo que se decidió hacer otro muestreo a los 120 días, pero no se encontraron sueros reactores positivos (cuadro 1). Sin embargo, las borregas inmunizadas con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC se presentó positividad en un 100% a los 15 días y un 10% al día 90, desapareciendo por completo los títulos de anticuerpos a los 120 días (cuadro 1,2).

Los resultados de la aplicación de las dos diferentes dosis reducidas en este trabajo son similares a los obtenidos por Crowther y col. cuando vacunaron dos grupos de borregas adultas -- con dos diferentes dosis de Rev. 1 B. melitensis ( $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  UFC), utilizando las pruebas de aglutinación de rutina y fijación de complemento, logran observar que los niveles de anticuerpos obtenidos con la dosis  $1 \times 10^5$  UFC eran altos en comparación con los obtenidos con la dosis  $1 \times 10^4$  UFC, no obstante, la persistencia de los anticuerpos, en ambos casos, fue hasta las 13 semanas posinoculación, lo que coincide con lo encontrado en esta investigación.

Por otra parte, el empleo de pruebas complementarias como es la de Coombs permite detectar la presencia de anticuerpos en sueros que anteriormente habían salido negativos, además de -- eliminar las reacciones heteroespecíficas debidas a agentes como Pasteurella ssp, Francisella spp y Salmonella spp (13,26).

## CONCLUSIONES

Se concluye que bajo las condiciones en las cuales se desarrolló esta investigación, usando la prueba de tarjeta y tubo, -- las ovejas vacunadas con la dosis  $5 \times 10^3$  UFC de Rev. 1 Br. -- melitensis dejan de presentar títulos vacunales entre los 60 y 120 días posinoculación (gráfica 1), permitiendo un 5% de positividad a Coombs hasta los 120 días, y si se vacuna con la dosis  $1 \times 10^5$  a los 90 días desaparecen los títulos en la prueba de tarjeta, mientras que la prueba de tubo a los mismos -- días aún se presentan reactores positivos, pero en títulos bajos y en la prueba de Coombs se presenta un 10% de positivos -- a los 120 días.

La baja respuesta serológica presentada por los ovinos vacunados con la dosis  $5 \times 10^3$  UFC se debe a que ésta no es lo suficientemente inmunogénica.

LITERATURA CITADA

1. Acharya, B.N. and Panda, S.A.: Role of blocking antibody and Coombs antiglobulin test in the detection of - - Brucellosis in Sheep. Indian J. anim. Hith. 123-126 - - (1985).
2. Allsup, T.N., B.V.M.S., M.R.C.V.S. and D.V.S.M.: - - - Abortion in Sheep associated with Brucella abortus infection. Vet. Rec. 84: 104-108 (1969).
3. Alton, G.G. and Elberg, S.S.: Rev. 1 Brucella meliten-  
sis, vaccine, a review of ten years of study. Vet. Bull.  
37:
4. Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietza, D.E.: Laboratory -  
Techniques in Brucellosis, 2nd. ed. WHO, Geneva 1975
5. Blasco, J.M., Estrada, A. and Mercadal, M.: A note on --  
adult sheep vaccination with reduced dose of Br. meli-  
tensis Rev. 1. ann Rech. Vet. 15: 553-556 (1984).
6. Brinley Morgan, W.J. and Mc Cullough, N.B.: The genus - -  
Brucella, in: Bergys Manual of Determinative Bacteriolo  
gy. 8 th ed. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. eds., - -  
Williams and Wilkins, Baltimor 1974.
7. Brinley Morgan, W.J.: Reviews of the progress of Dairy\_

Science. J. Dairy. Res. 37 : 320 (1970)

8. Bruner, G.H.: Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos, 3a. ed., La Prensa Médica, México, D.F. - - 1970.
9. Casas, O.R.: Diagnóstico serológico de la brucelosis. - Centro Panorámico de Zoonosis. 18: 107-134. B.A., Argentina 1976.
10. Cárdenas, J.: Vigilancia epidemiológica de la zoonosis, Salud Pública en México II: 235 (1969).
11. Crouch, D. and Sanford S.E.: Response of the vaccine -- strain of Brucella melitensis Rev. 1 to Erythritol. J. - of Bacteriol. 94: 1973-1974 (1967).
12. Crowther, R.W., Orphanides, A. and Polydorou, K.: Vaccination of adult sheep with reduced doses of Br. melitensis strain Rev. 1. Trop. Anim. Hith. 9 : 85-91 (1977).
13. Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. y Wood, W.B.: Tratado de Microbiología. 1a. ed. Salvat, España, 1975.
14. FAO/OMS; Comité Mixto de Expertos en Brucelosis, Quinto informe, Serie de informes técnicos 464: 1971.

15. Flores, C.R., and Baer, W.M.: Brucellosis (Br. melitensis). Zoonotic Implications in: CRC - Handboock series in zoonoses, 1st. ed., Steele, H., ed., CRC Press, - - Florida, 195, 1979.
16. Cradwell, D.V. and Vanzyl, F.E.: Effectivity of Rev. 1 vaccine in Rams against Brucella ovis infection. J.S. Afr. Vet. Ass. 46: 349 - 351 (1975).
17. J.A. Erasmus and E.C. Bergh.: Ovine Brucellosis. Repeated vaccination with Rev. 1 vaccine and the prevalence of the disease in the winburg distict. J.S. Afr. Vet. Ass.: 56 205-208 (1985).
18. Jensen, R., D.V.M., Ph. D., D.V. Sc.: diseases of sheep fort collins ed. Lea and Febiger, Philadelphia 1974
19. Jones, L.M. and Marly, J.: Serological and bacteriological studes of wews vaccinated with Brucella melitensis strain Rev. 1 durin Lactation. Annl. Rech. Vet. 6: - - 67-71 (1975).
20. Martínez Conde J.M.: Guía del Inspector Veterinario Titular 2- Epizootiología y Zoonosis la. ed. Aedos, Barcelona (España), 1975.
21. Martínez P.V.E.: Presencia de anticuerpos contra Brucella ovis y Brucella melitensis en sueros de borregos Ta

- basco y Peligüey, tesis de licenciatura. Fac. de Med. -- Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, - México, D.F. 1974.
22. Merck, Sharp.: El Manual de Merck de Veterinaria. 5a. - ed. Editorial Merck and Co. Inc. U.S.A. 1979
23. Mustafa, A.A., Roberts, R.M. and Corbel, M.J.: Isolation of Brucella Melitensis from sheep in Syria. Vet. - Rec. 117: 277 (1985).
24. O'Reilly, D.J., Cunningham, B. An Assessment of the brucellosis card test. Vet. Rec. 88: 590 594 (1971).
25. Ossola, L.A., Szyfres y Blood, D.B.: Infección Natural de ovinos por Brucella melitensis en la República de Argentina. Boletín de la oficina Sanitaria Panamericana - LV: 97-99 (1963).
26. Pérez, N.M.E.: Estudio comparativo de la brucelosis caprina y la brucelosis humana en su frecuencia y distribución en la República Mexicana. Fac. de Med. Vet.y - Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, - D.F. 1983.
27. Reyes, C.P.: Diseño de experimentos estadísticos aplicados, 2a. ed., Editorial Trillas, México, D.F., 1984.

28. Ruiz, C.M.: Brucelosis. La Prensa Médica. México, 1954
29. Sanford, S.: Inmunización de los caprinos contra la brucelosis, Animales de la Facultad de Medicina Tomo XLII No. 1, Lima, Perú. 711-724 (1959).
30. Sanford, S. Elberg.: Rev. 1 Brucella melitensis vaccine part II, 1968-1980. The Vet. Bull. 51: 67-69 (1981).
31. Spink, W.W.: The nature of Brucellosis, 1st. ed. University of Minnesota Press, Mimeoapolis, 1956.
32. Unel, S., Erdem, R., Williams, C.F. and Stableforth, -- A.W.: Brucella melitensis Rev. 1 vaccine. Experiments - on the duration of immunity. First pregnancy challenge. Rec. Vet. Sci. 10: 254-259 (1969)
33. Wayne, W.D.: Bioestadística: Base para el análisis de - las ciencias de la Salud, 2a. ed., Editorial Limusa, México, D.F. 1980.