



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**"EVALUACION SEROLOGICA DE LA VACUNA DE  
*Brucella abortus* CEPA RUGOSA MUTANTE POR  
TRANSPOSICION, EN UN HATO DE BOVINOS  
CON BRUCELOSIS".**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
JUAN LUIS PEREZ PEREZ**

**ASESORES: DR. EFREN DIAZ APARICIO  
M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ  
DR. FRANCISCO SUAREZ GUEMES**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.



AGENCIA NACIONAL  
 AGENCIA DE  
 MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, CUAUTITLAN, M.  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD DE ESTUDIOS  
 PROFESIONALES  
 CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E .

DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación serológica de la vacuna de Brucella abortus cepa rugosa mutante por transposición en un hato de bovinos con brucelosis".

que presenta el pasante: Juan Luis Pérez Pérez  
 con número de cuenta: 8805814-2 para obtener el TITULO de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 14 de MAYO de 1997

<b>PRESIDENTE</b>	<u>MVZ. Sergio Cortés y Huerta</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>MVZ. Javier Hernández Baldaras</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Efrén Díaz Aparicio</u>	
<b>PRIMER SUPLENTE</b>	<u>MVZ. José A. Licca Vega</u>	
<b>SEGUNDO SUPLENTE</b>	<u>MVZ. Raúl Radillo Rodríguez</u>	

## DEDICATORIAS.

*A mis padres: Por su apoyo, cariño y comprensión,  
les ofrezco esta tesis como un pequeño  
tributo a todo lo que les debo.*

*A mis hermanos: Les ofrezco el resultado del  
ejemplo que son para mí.*

*A la memoria de mis abuelitos: José Trinidad  
Pérez Mercado y Felipe Pérez Rojas,  
por la energía y fortaleza que los  
caracterizaba en cualquier  
momento.*

*A mis abuelitas: María de Jesús Mendoza  
y María Eugenia Pamatz López,  
por el gran amor que siempre  
me han dado en todo  
momento.*

## AGRADECIMIENTOS:

### A mis padres:

Gracias . . . lo único que acerto a decir es gracias, por todo el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida, por toda la ayuda recibida, ya que han hecho más ligero mi camino; por las palabras de aliento escuchadas en los momentos más difíciles, por todas las cosas . . . por la vida misma y ahora que hago realidad uno de mis más grandes anhelos quiero agradecer todo el amor, paciencia y comprensión para conmigo, por todo y por mucho más . . .

GRACIAS.

### A mis hermanos:

Porque gracias a su apoyo y consejo, por el ejemplo que representan para mí, he llegado a cumplir este objetivo. Con admiración y respeto.

GRACIAS.

### A Dios:

Por haberme dado la familia a la que pertenezco, por permitir-me conseguir esta meta, y por haberme dado la vida.

GRACIAS.

*A mis asesores:*

*Dr. Círen Díaz Aparicio, M.U.Z. Rafael Pérez González,  
Dr. Francisco Suárez Gómez, por su apoyo, amistad, coo-  
peración y por todo lo aprendido de ellos, lo cual me ayudó  
a realizar este trabajo.*

*A mis amigos:*

*Por todos los momentos vividos en la Facultad, que forman  
parte de mi formación académica y personal, además los mo-  
tivo a cumplir sus propias metas.*

*En forma especial, a todos los integrantes del Departamento de Bacteriología,  
por su apoyo y colaboración de manera incondicional.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la o-  
portunidad de formarme como profesionista.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por permitirme formar par-  
te activa de esta generación, logrando terminar mi carrera gracias a su apoyo  
académico. Así como a cada uno de los profesores que de alguna manera par-  
ticiparon para lograr esta meta.*

*Al CENOD-Microbiología, por su apoyo en la realización de este trabajo.*

## ÍNDICE.

	PÁGINA.
RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCIÓN. . . . .	2
OBJETIVO GENERAL. . . . .	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS . . . . .	36
MATERIAL Y MÉTODOS. . . . .	37
RESULTADOS. . . . .	49
DISCUSIÓN . . . . .	59
CONCLUSIONES. . . . .	68
ANEXO . . . . .	69
BIBLIOGRAFÍA. . . . .	70

## RESUMEN.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta al ganado bovino, ovino y caprino y otras especies de animales domésticos y de vida silvestre, además del hombre, debido a esta última característica se la clasifica dentro del grupo de las zoonosis. Por otro lado, esta enfermedad representa una barrera no arancelaria de tipo sanitario que influye de manera negativa en el comercio de animales y sus productos con otros países. Aunque se cuentan con una variedad de pruebas diagnósticas, estas presentan inconvenientes, ya que los anticuerpos inducidos por la vacuna cepa 19 en dosis clásica ó en dosis reducida son difíciles de diferenciar de aquellos inducidos por una infección natural a través de las pruebas serológicas rutinarias debido a que ambos tipos de inmunoglobulinas están dirigidos principalmente contra la cadena O lipopolisacárida presente en el género *Brucella* spp. Desde hace varios años, se comenzó la evaluación de varias vacunas mutantes de *B. abortus*, los cuales tenían las características de carecer de la cadena-O, por lo tanto es una cepa rugosa y puede sobrevivir pocas semanas post-inoculación. Al ser una cepa rugosa se evitaba la seroconversión además de inducir una respuesta inmune adecuada. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta serológica producida por la vacuna de *Brucella abortus* cepa rugosa mutante por transposición, en un hato bovino con brucelosis enzootica. La vacuna mutante por transposición se inóculo a 16 becerras Holstein, vía subcutánea, a la dosis de  $1 \times 10^8$  UFC/ml con una edad de 4-6 meses, asegurándose previamente que no tuvieron anticuerpos contra la brucelosis. Se realizaron muestreos sanguíneos periódicamente para realizar las pruebas serológicas rutinarias, paralelo a esto se empleó la prueba de ELISA indirecto y la prueba de aglutinación lenta en tubo con un antígeno rugoso experimental preparado a partir de la cepa vacunal a una concentración celular del 4%, con las pruebas mencionadas se cuantificó la respuesta inmune. Al cabo de 12 meses post-vacunación se realizó la prueba de intradermoreacción con el brucelergeno OCB (Extracto proteico de *Brucella*, Batch No. 26151). En las pruebas serodiagnósticas se observó que el mayor título de anticuerpos se presentó a los 30 días manteniéndose hasta 90 días post-vacunación, decreciendo paulatinamente hasta casi ser imperceptibles cerca de los 10 meses post-vacunación. El total de animales del grupo vacunado dio reacción positiva al Brucebergeno, en contraste, no hubo reacción alguna en un grupo control negativo utilizado. Conforme a los resultados, se concluye que la cepa mutante indujo una respuesta protectora, ya que el grupo de animales vacunado se mantuvo negativo al diagnóstico serológico ante un desafío natural que se dio al permanecer los animales en un hato enzootico a brucelosis, además de que no seroconvirtieron, evitando así que se dieran resultados falsos positivos post-vacunales en las pruebas oficiales.

## INTRODUCCIÓN.

La brucelosis es una enfermedad que continúa siendo un problema para la ganadería nacional, por ser una enfermedad infectocontagiosa que afecta a casi todos los mamíferos domésticos y de vida silvestre, generando grandes pérdidas a la ganadería nacional. Es un problema importante de Salud Pública, pues es la zoonosis más importante, numéricamente hablando, del país.

En México durante 1992, la producción nacional de leche fresca fue de 7 mil millones de litros aproximadamente, de los cuales solo el 20% fue pasteurizada, el resto de la producción se destinó a la industria de derivados (40%) y consumo de leche bronca (40%). Por otro lado, existe un déficit de alrededor de 12 millones de litros de leche diarios, por lo que grandes volúmenes de leche en polvo tiene que ser importado para cubrir esta necesidad básica, ocasionando erogaciones millonarias anualmente, (11).

Por otro lado, esta enfermedad representa una barrera no arancelaria de tipo sanitario que influye de manera negativa en el comercio de animales y sus productos con otros países.

En México, según la Secretaría de Salud, se registran anualmente un promedio de 6,500 casos de Brucelosis humana. Esta cifra representa sólo los casos registrados de pacientes que demandan atención médica, por lo que se considera que sólo representa al 30% de la población afectada, (11).

## HISTORIA.

A la brucelosis se le ha llamado Aborto Contagioso, Aborto Infeccioso, Fiebre de Malta, Fiebre Ondulante (ambos nombres usados en Medicina humana), Enfermedad de Bang, Enfermedad de Bruce y Fiebre Ondulante del Mediterráneo (cuando el agente causal es *B. melitensis*). En 1886, Bruce aisló por primera vez al microorganismo causal y lo nombró *Micrococcus melitensis*. Bang en 1897, describe el agente que produce el aborto en el ganado de Dinamarca. Evans en 1918 demostró la similitud entre la bacteria de Bang y *M. melitensis*. El tercer agente de brucelosis fue aislado por Traum en 1914; Huddleson en 1929 llamó al organismo *Brucella suis*. Buddle en 1956 reportó *Brucella ovis* y en 1957 Lackman aisló *Brucella neotomae* de una rata del desierto; Carmichael y Bruner en 1968, fueron los primeros en reconocer infecciones en perros causadas por *Brucella canis*. (6, 30).

La brucelosis se conoce en México desde 1905, cuando el Dr. Valenzuela sospechaba que sus enfermos de fiebre remitente prolongada pudieran padecer fiebre de Malta. En años siguientes, las sospechas fueron tomando cuerpo en 1912, cuando el Dr. Reséndiz, de Querétaro relacionó la aparición de una enfermedad extraña, caracterizada por fiebre prolongada interrumpida por períodos apiréticos, sudores profusos, etc., con la importación de cabras murcianas en 1910. En 1912, Placeres demostró mediante estudios bacteriológicos y serológicos la presencia de la enfermedad en México, (7).

Se tienen antecedentes de que el primer diagnóstico de brucelosis humana fue en 1905. En 1923 se aisló la primera cepa de *Brucella melitensis*. Para 1945 se tenía un registro de 1432

casos de brucelosis humana en 21 de las 32 entidades federativas que informaron, (6).

La primera encuesta serológica de trascendencia que se llevó a cabo para determinar la prevalencia de la brucelosis bovina en México, fue en 1952. En 1970 se implementó un programa permanente que en 1981 se oficializó, estableciéndose la Campaña Nacional contra la Brucelosis (24).

En México en 1993, la población de bovinos era de 3,443,641 cabezas de ganado lechero y 29,288,283 bovinos productores de carne. La prevalencia de brucelosis estimada por la entonces SARH era de 8.41% para bovinos de leche y 4.27% para bovinos de carne, (14).

#### ETIOLOGÍA.

Morfológicamente los organismos del género *Brucella spp.* son cocobacilos, con 0.5 a 0.7  $\mu$ m de longitud. Por lo general aparecen aislados ó en pares, pero a veces se ven cadenas cortas ó grupos, son Gram (-) sin coloración bipolar, no tienen cápsula verdadera, no producen esporas, ni flagelos, (26).

El género *Brucella spp.* no se desarrolla en medios de cultivo que contengan solamente peptonas; se requiere triptosa ó tripteína y algunas veces suplementos tales como infusión de hígado, suero de bovino ó hidrolizado de levadura. De *B. abortus* se conocen 8 biotipos (del 1 al 9; no hay No. 8), de *B. melitensis* 3, de *B. suis* 4 y de las tres restantes sólo uno de cada una, (26).

Algunas brucelas crecen en agar sangre cuando se incuban aeróbicamente pero no son hemolíticas. El crecimiento de las brucelas se estimula con suero, requiriendo algunas brucelas de

un 5 a 10% de CO<sub>2</sub> para su crecimiento. En su aislamiento primario, muchas cepas de *Brucella* son de crecimiento lento, siendo las colonias de un diámetro de 0.5 a 1.0 mm, elevadas, convexas, con el borde entero; las colonias pueden ser lisas, mucoides ó rugosas, (42).

Los sueros monoespecíficos de *B. abortus* (A) y *B. melitensis* (M) se utilizan para distinguir las biovariantes de las cepas lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). El suero antirrugoso (R) aglutina a las dos especies rugosas (*B. canis* y *B. ovis*), las colonias de las especies lisas no presentan reacciones cruzadas con las colonias de las especies rugosas, (42).

Las especies de *Brucella* son oxidasa-positivas excepto *B. ovis* que es oxidasa-negativa. La glucosa es oxidada por todas las especies de *Brucella* excepto *B. ovis*, (42).

Tres especies lisas del género *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* son patógenas para una amplia gama de mamíferos, aunque cada una de ellas tiene un huésped de elección, (39).

La virulencia de este género está dado por el metabolismo de la bacteria dentro de la célula fagocítica y por su extraordinaria infectividad, (39).

Asimismo se sabe que los lipopolisacáridos de la membrana externa y las proteínas juegan un papel importante como determinantes antígenicos induciendo tanto inmunidad celular como humoral; cuando por diversos factores la brucela permanece en una fase crónica en el huésped, se induce un estado de hipersensibilidad, además, se han mencionado al polisacárido "B" (poli B), a las proteínas de membrana externa (porinas, proteínas del grupo 3 y una lipoproteína ligada al peptidoglicano como determinantes

antigenicos, (39).

La enfermedad se hace más evidente en hembras que en machos, y afecta más a gestantes que a novillonas, se cree que es debido a la presencia del eritritol, que es un polisacárido, por el cual la brucela tiene un marcado tropismo, si la infección se da a edades tempranas, los signos clínicos se manifiestan hasta que la vaca está gestante, (39).

Las brucelas son medianamente resistentes a los factores del medio, su resistencia disminuye cuando aumentan la temperatura y la humedad; son muy sensibles a la luz solar, a temperaturas superiores a 55°C, no resiste la pasteurización; las radiaciones ionizantes, los desinfectantes comunes y la sequedad extrema inhiben su reproducción; resisten la congelación, el ahumado así como a una amplia gama de antibióticos, (25).

#### PATOGENÍA.

##### *Puerta de entrada del agente.*

La vaca es infectada a través de las siguientes vías de entrada: Conjuntival, gastrointestinal y en soluciones de continuidad en la piel, además las vacas tienen el hábito de lamer membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos, así como lamer los genitales de otras hembras cuando están en fase de estro, (40).

Las vías de eliminación más importantes del germen son: Las cubiertas fetales, líquido amniótico y feto; los excrementos de animales recién nacidos; las secreciones vaginales que fluyen tras el aborto, permanecen infectantes durante 1 ó 2 semanas; la leche en la cual se elimina prácticamente todo el tiempo que dura la infección; la eliminación a través del esperma solo ocurre en

casos de sementales fuertemente contaminados con orquitis y epididimitis, (40).

**Fase Subclínica.**

*Implantación.*

Después de la infección inicial, se produce localización en los nódulos linfáticos regionales, luego hay propagación a otros tejidos: Bazo y nódulos mamarios e ilíacos, donde persiste por largos períodos y constituye una fuente de reinfección. *B. abortus* tiene predilección por útero grávido, ubre, testículos y glándulas sexuales masculinas accesorias, nódulos linfáticos, cápsulas articulares y bolsas, en la ubre se desarrollan abundantemente las brucelas y se eliminan con la leche durante el período de lactancia, siendo en este tejido donde se mantienen activas en los intervalos de las gestaciones, (39).

*Reacción tisular.* Aunque la brucela es fagocitada, puede crecer y multiplicarse dentro de los lisosomas de los fagocitos.

En el caso de animales gestantes, a nivel de útero las lesiones se originan en la pared del órgano provocando una endometritis ulcerosa en los espacios intercotiledóneos, con el subsecuente invalidamiento de las vellosidades. En el caso de machos, se produce una reacción inflamatoria local en testículos, epididimo, escroto y túnica vaginal, (39).

*Período de incubación.* Por experimentación se ha demostrado que el período de incubación es variable e inversamente proporcional al desarrollo del feto; en el caso de machos también es variable y es inversamente proporcional al desarrollo de los testículos, sin embargo, es definitivo que la duración del mismo varía en relación a la ruta y dosis de infección, así como la

virulencia de la cepa infectante y la resistencia natural del huésped, en general, se considera que los signos clínicos suelen producirse después de los 30 días, (39).

#### **Fase Clínica.**

##### *Signos específicos.*

El aborto en el último tercio de la gestación es el signo predominante; en machos es la orquitis y la epididimitis. Puede observarse nacimiento de terneros muertos ó débiles, retención placentaria. Anorexia, decaimiento. En hembras, disminución hasta en un 25% en la producción láctea, infertilidad; en machos renuencia a la monta por la orquitis que es dolorosa, (39).

*Lesiones.* Los fetos abortados entre el 50. mes de gestación ó al término de la misma están con frecuencia edematosos y con excesivo líquido subcutáneo, pero con pocas lesiones distintivas, las lesiones de la placenta radican en una necrosis de los cotiledones y recubiertos por un exudado oscuro. La apariencia macroscópica del útero gestante y del útero postparto es normal, después del aborto se presenta una endometritis con recuperación variable, (42).

*Secuelas.* Tanto en el macho por la epididimitis, como en la hembra por el aborto y la retención placentaria, se puede originar infertilidad ó esterilidad. Asimismo, la bacteria puede eliminarse por leche durante largos períodos, siendo una fuente de infección para becerros y otros animales incluyendo al hombre, (39).

*Pronóstico.* Dada la persistencia del germen en el organismo infectado y la resistencia de éste a los tratamientos, se recomienda el sacrificio de los animales infectados, pues no se

garantiza el éxito del tratamiento primario, además de que resulta costoso y poco práctico. Las medidas de prevención sin especificarlas en los diferentes niveles de atención, incluyen saneamiento básico, vacunación, cuarentena, segregación, aislamiento y desinfección. (39).

#### IMPORTANCIA ECONÓMICA.

Algunos investigadores han clasificado las pérdidas que causa la brucelosis de la siguiente manera:

##### -PERDIDAS DIRECTAS APARENTES:

Pérdida del becerro ocasionada por el aborto (15%), problemas reproductivos (retención placentaria, esterilidad temporal ó permanente), disminución de la producción láctea en un 20% causada por el aborto ó efecto indirecto de la infertilidad, incremento de las crías muertas de los animales de reemplazo en los hatos infectados. (35).

Se considera arbitrariamente, de acuerdo a trabajos realizados en México, que el 15% de los animales reactivos positivos abortan y en nuestro país de acuerdo a la prevalencia estimada se ha calculado que las pérdidas ascienden en ganado de carne a US\$ 788,142.70 y en ganado de leche a US\$ 999,011.20. En brucelosis caprina, el porcentaje de aborto es del 13.1% ocasionando pérdidas de hasta US\$ 795,646.80 en un año. (11).

Los datos estadísticos considerados referentes a la eficiencia reproductiva son del 65% para ganado de carne y para ganado de leche son del 70%. En este contexto, las pérdidas se han estimado en US\$ 2,167,391.06 para ganado de carne y para ganado de leche en US\$ 2,997,033.60 considerando que el hato de carne se constituye de 95% de hembras y en ganado de leche del

98%, (11).

El valor de la reposición en nuestro país es en ganado de carne US\$ 194,133,333.33 y en ganado de leche US\$ 64,800,000, dando un total de US\$ 258,933,333.33. El valor de reposición en ganado caprino es de US\$ 42,324,633.33. (11).

Se ha demostrado que vacas con brucelosis disminuyen su producción láctea en un 20% estimándose que los litros perdidos promedio por vaca son aproximadamente 217 litros por año. (11).

Los gastos de asistencias del medico veterinario no se ha cuantificado, pero se considera como una erogación importante, aunque la brucelosis no es necesariamente mortal en bovinos, se sabe que los cuadros de bacteremia, así como las múltiples complicaciones pueden desencadenar la muerte de algunos animales enfermos crónicos. Se calcula que el 1% de las vacas que abortan mueren. (11).

**-PERDIDAS DIRECTAS NO APARENTES:**

La evaluación de estas pérdidas resulta aún más difícil que las aparentes, en virtud de que están sujetas a la inspección clínica constante, y a un conocimiento profundo de las condiciones epizootiológicas que condicionan la enfermedad; entre las variables identificadas están: Reducción del valor comercial del ganado infectado, retardo en el crecimiento, decremento en el peso, rompimiento ó pérdida de las líneas genéticas en los hatos infectados, (35).

**-PERDIDAS INDIRECTAS CONSECUTIVAS:**

Se considera dentro de esta rubro aquellas que repercuten sobre la salud pública. Esta enfermedad, aunque puede tener un comienzo súbito en la persona que la padece, tiende a ser de

curso crónico y causar incapacidad temporal ó permanente y, en el caso de población económicamente activa, ausentismo, disminución en la productividad del individuo, gastos médicos; en el caso de escolares, disminución en el rendimiento escolar y en ocasiones causar la muerte, (35).

Según cifras estimadas por la Secretaría de Salud, las pérdidas económicas por el tratamiento diagnóstico e incapacidad son de US\$ 123,704.27 al año; sólo de los casos que se notifican y que demandan atención médica institucional que, como se anotó antes, constituye sólo un porcentaje del total de la población potencialmente afectada; asimismo esta estimación es sin considerar la disminución en la productividad laboral del individuo enfermo ó los años de vida productiva perdidos, (11).

Por otro lado no se cuantifican económicamente los costos derivados de las defunciones de los individuos con enfermedad crónica; de acuerdo a datos del Sector Salud, anualmente se registran, en promedio, 30 defunciones que tienen como causa primaria de muerte la brucelosis; la cuantificación de esta mortalidad, en términos económicos, se ha desarrollado en términos de años de vida perdidos; aunque por definición una vida humana es invaluable, (11).

#### IMPORTANCIA DE LA VACUNACIÓN.

El control de las enfermedades en los animales debe realizarse con dos objetivos fundamentales: Obtener mayor eficiencia en la producción de alimentos de origen animal y prevenir las enfermedades transmisibles al hombre. Los métodos de control se basan por lo general en la aplicación de uno ó más puntos que se mencionan a continuación: Vacunación, eliminación

de los animales enfermos y la aplicación de prácticas de manejo orientadas a reducir los riesgos de infección (32).

Para que la vacunación produzca el efecto deseado, es decir, la protección casi total de los animales, y para la interrupción de la propagación de la enfermedad, es necesario que: La vacuna sea de buena calidad, bien fabricada, controlada, conservada y correctamente aplicada. La vacuna sea administrada a todos ó casi todos los animales susceptibles de la zona. Por esta razón en zonas de alta prevalencia (más del 10% de los hatos infectados), es más efectivo vacunar simultáneamente todos los animales jóvenes y adultos para construir progresivamente una población resistente, (37). En la actualidad, el método de inmunización recomendado es la vacuna Cepa 19 de *B. abortus*, (32).

La vacunación con la dosis clásica de cepa 19 en animales mayores de 6 meses de edad, suele ocasionar abortos en hembras gestantes. Además de que para obtener una inmunidad de hato se requieren varios años, hasta que los becerros vacunados lleguen a reemplazar al ganado adulto susceptible. Por lo tanto se buscó un método que permitiese alcanzar la inmunidad de hato a corto plazo, reduciendo el riesgo que implica para el ganado la presencia de un foco de infección. En 1976, Nicoletti, (31), reportó sus experiencias con la dosis reducida encontrando que la vacunación induce una protección efectiva al ganado, no ocasiona abortos en más del 1% de los animales vacunados, (22).

Bajo condiciones experimentales, la inmunización del ganado vacuno con cepa 19 protege aproximadamente al 70% de los animales vacunados contra un desafío con una dosis de cepas virulentas de *B. abortus*, (33). Bajo condiciones de campo, la cepa 19 produce

una protección ocasionalmente superior al 70%, (31). La vacunación del ganado con *B. melitensis* cepa Rev 1 parece inducir una mejor protección que la vacunación con la cepa 19, (23); de cualquier modo, esta estrategia de vacunación no ha sido usada en el campo. La vacunación de ovejas ó cabras con cepa 19 para prevenir la infección con *B. melitensis* es menos exitosa que la vacunación con *B. melitensis* cepa Rev 1. (25, 36).

La Campaña Nacional contra la brucelosis dispone para la vacunación en bovinos 2 tipos de vacuna cepa 19: una considerada como vacuna en dosis clásica para vacunar becerras de 3 a 6 meses de edad que debe contener por lo menos  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Brucella* por mililitro de vacuna reconstituida y se aplicarán subcutáneamente una dosis de 5 ml de vacuna cepa 19 ( $5 \times 10^{10}$  UFC), no debe utilizarse en hembras mayores de 6 meses ni menores de 3 meses, ni animales gestantes o machos, y otra para hembras mayores de 6 meses, incluso gestantes, denominada vacuna de dosis reducida, esta vacuna puede aplicarse a partir de los 18 meses, en el caso de que hayan sido vacunadas con la dosis clásica a la edad de 3 a 6 meses, ó bien puede aplicarse a hembras mayores de 6 meses que no recibieron la vacuna con dosis clásica, esta debe contener un título de  $3 \times 10^8$  a  $3 \times 10^9$  UFC por cada dosis, equivalente a 2 ml. Bajo ninguna circunstancia se permitirá diluir la vacuna en presentación de dosis clásica para obtener dosis reducidas. (Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Diario Oficial, 8-Nov-95).

Las vacunas vivas son probadas para inducir una mejor inmunidad protectora como es en el caso de muchas enfermedades causadas por microorganismos intracelulares facultativos. La

vacuna viva, *B. abortus* cepa 19, que es usada extensivamente para proteger al ganado bovino, contra la infección. No puede ser clasificada como una vacuna ideal, ya que tiene características indeseables.

Por ejemplo, *B. abortus* cepa 19, la cepa vacunal más usada en el ganado bovino, induce permanencia de aglutininas en suero y leche, si se aplica a dosis inadecuadas en ganado adulto, puede darnos resultados falsos positivos ya que los anticuerpos son la base para las pruebas serológicas que comúnmente se emplean en el diagnóstico de la brucelosis, y por lo tanto, interfiere con el diagnóstico de la enfermedad. Los anticuerpos que se detectan para realizar el diagnóstico son principalmente dirigidos contra la Cadena-O lipopolisacárida, la cual se encuentra en la *Brucella spp.* (20, 43).

Las pruebas de tarjeta y de fijación del complemento tienen mínima capacidad para diferenciar animales infectados de los vacunados con la cepa 19. Las vacas vacunadas con dosis reducida permanecen como reactores durante 14 a 16 meses después de haber sido vacunadas, resultando negativas a las pruebas de rivanol y fijación del complemento. La prueba de tarjeta puede arrojar positivos aún a los 9-10 meses postvacunación, (14).

En adición a los problemas de diagnóstico causados por la seroconversión de los animales vacunados, presenta otras características indeseables, y estas son: Su capacidad de infectar a los humanos, ocasionar una infección persistente en algunos de los animales vacunados, inducir aborto y ocasionalmente inducir artritis y shock endotóxico. (20, 43).

Considerando las características antes mencionadas de la

vacuna viva de *Br. abortus* cepa 19 en uso actualmente, se puede pensar que la vacuna ideal contra la brucelosis debe tener las siguientes características y debe ser parte de un programa efectivo de control, prevención y erradicación:

a) La vacuna no debe inducir anticuerpos que interfieran con el serodiagnóstico de la infección de campo, a pesar de la dosis vacunal, vía de inoculación, edad ó sexo del animal, lo cual debe ser particularmente útil en animales adultos para que puedan ser vacunados sin el riesgo de la seroconversión, así evitando los problemas actuales relacionados con la edad, encontrados con la actual vacunación con la Cepa 19.

b) La cepa vacunal debe ser altamente atenuada y no debe producir la enfermedad ó infección persistente en los animales inmunizados, y no debe ser patógena para los humanos. La cepa vacunal no debe ser transmisible a otros animales y ser incapaz de contaminar la carne ó productos lecheros.

c) Una sola dosis vacunal debe inducir una protección fuerte y a largo plazo contra infecciones sistémicas y uterinas, por lo tanto prevenir el aborto. No debe causar aborto si se inocular en animales gestantes. La revacunación de animales accidentalmente ó por intención no debe causar seroconversión. La vacuna debe inducir protección cruzada contra las tres más importantes especies de *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

d) La vacuna debe ser estable y no tener virulencia revertible, ya sea *in vivo* ó *in vitro*.

e) La vacuna debe ser barata de producir, (49).

#### NUEVAS VACUNAS MUTANTES.

Hace muchos años, se empezó la evaluación de varios mutantes

derivados de *B. abortus* para satisfacer en algo las características de la vacuna ideal. Un importante criterio de selección, fue encontrar un mutante carente de la cadena-O (por lo tanto una cepa rugosa), y que debía sobrevivir dentro del animal por unas pocas semanas post-inoculación. Por lo tanto, la falta de síntesis de cadena-O por el mutante debe evitar la seroconversión, además el hecho de sobrevivir dentro del animal por un período relativamente corto de tiempo debe permitir la inducción de una fuerte respuesta protectora.

Dentro de estas cepas mutantes, se encuentra la cepa RB51, la cual fue obtenida a partir de varios pasajes de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, en medios de cultivo conteniendo penicilina ó rifampicina, la cual es carente de la cadena-O, es altamente atenuada y estable *in vivo*; diversos pasajes hechos en ratones y ruminantes demostraron que no había reversión hacia la morfología lisa; este hecho fue comprobado en estudios *in vitro*, (44).

Posteriores trabajos realizados en animales de laboratorio, vacas adultas y jóvenes indicaron la presencia de pocas lesiones tisulares causadas por esta cepa mutante, (16, 28, 41).

Los animales vacunados con esta cepa mutante mostraron una inmunidad significativa ante posteriores desafíos post-vacunación, (16); en trabajos posteriores de este grupo de investigadores demostraron que después de la inmunización con cepa RB51 en ganado vacuno, los resultados de las pruebas de tarjeta, aglutinación en tubo, rivanol, 2-mercaptaetanol y fijación del complemento son negativos a pesar de la edad de los animales vacunados, vía de inoculación, dosis y frecuencia de

inmunizaciones, (16).

Los anticuerpos específicos para estructuras superficiales de la cepa mutante RB51 pueden ser detectados por técnicas de ELISA, después de la vacunación en ganado vacuno usando microorganismos muertos enteros de cepa RB51 como antígeno; es importante señalar que los anticuerpos detectados no interfieren con la serología diagnóstica convencional, (16).

En 1987, Smith y Heffron, (45), a través del método de mutagénesis por transposición establecen un sistema para definir factores de virulencia y para el desarrollo de cepas avirulentas de *Brucella spp.* Usando el transposón Tn5 y anticuerpos monoclonales anti-cadena-O han producido una serie de mutantes de *B. abortus* a partir de la cepa 19 y cepa 2308, las cuales se escogieron por ensayos de sobrevivencia en macrofagos *in vitro*.

De estas cepas mutantes no lisas, algunas tienen la característica de tener infección residual en bazo en ratones, lo cual es similar a la cepa 19 pero no producen reacción cruzada con los anticuerpos anti-cadena-O.

Cabras inoculadas con dos de estos mutantes ( $1 \times 10^8$  UFC subcutáneamente), no presentaron reacción cruzada en las pruebas serológicas rutinarias y la cepa mutante no fue detectada en orina, heces, saliva, sangre ó lágrimas por 120 días post-inoculación ó en la necropsia a partir de 40 muestras representativas del sistema reproductor y linfático, (2).

Estudios de sobrevivencia en macrofagos de bovinos demostraron que estas 2 cepas mutantes sobreviven intracelularmente muy similar a la cepa 19. Pero estudios posteriores, realizados *in vitro* no revelaron cualquier reversión a la

virulencia ó a la morfología lisa y a través de estudios realizados en animales de laboratorio no se ha revelado reversión a la virulencia. (2).

Una de estas cepas mutantes, es la cepa Texas, la cual fue evaluada en la Universidad de Texas A&M, donde fue inoculada en ganado vacuno bajo condiciones de laboratorio, quedando demostrada su capacidad inmunogénica ante posteriores desafíos además de no presentar reacción cruzada en las pruebas serológicas convencionales. (2).

#### **Transposición.**

Los genes de los organismos vivos no son estáticos, sino que bajo ciertas condiciones son capaces de cambiar de lugar. El proceso mediante el cual se mueve un gen de un lugar a otro se llama **Transposición** y es un proceso importante en la evolución y en el análisis genético. (10).

Primero, se debe destacar que la transposición es un evento raro, que se presenta a frecuencias de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  por generación, así los genes de los organismos son relativamente estables. No todos los genes son capaces de transposición, más bien está ligada a la presencia de elementos genéticos especiales con estos genes. En el más común de los tipos, la transposición está ligada a la presencia de secuencias especiales de bases llamadas **secuencias de inserción**, que son segmentos cortos, específicos de DNA que tienen la capacidad de desplazarse a otros sitios en el genoma. (10).

#### **Transposones.**

Los transposones son elementos compuestos móviles que contienen secuencias de inserción apareadas que colindan con

otras regiones genéticas. Las secuencias de inserción son segmentos cortos de DNA, de unos 1000 nucleótidos de largo que se pueden integrar en sitios específicos en el genoma. Las secuencias de inserción (SI), se encuentran tanto en el DNA del cromosoma, como en el del plásmido, así como en ciertos bacteriófagos. (10).

Para la transposición de una SI, se requiere de una enzima llamada **Transposasa**, que puede ser codificada por los elementos SI, pero también puede ser codificada por el cromosoma, el plásmido ó el fago al cual está unida. Otro requerimiento de una SI, es que haya en el DNA, **repeticiones terminales invertidas** que tienen una longitud de unos 40 pares de bases hasta 1000 pares, cada SI tiene un número específico de pares de bases en sus repeticiones terminales. (10).

Quando un transposón se inserta en otro DNA (el DNA blanco), la secuencia en el DNA del blanco en el sitio de integración se duplica. Esta secuencia del DNA blanco no estaba en el transposón, pero éste ha llevado a cabo la duplicación por el proceso de inserción. La duplicación proviene de rupturas de cadenas sencillas generadas por la transposasa. Entonces, el transposón se une a los extremos de las cadenas sencillas que se han generado y reparan las porciones de las cadenas sencillas que resultan de la replicación. (10).

#### **El mecanismo de la transposición.**

Se conocen dos mecanismos de transposición, que reciben el nombre de **conservador** y **replicador**. En la transposición conservadora, por ejemplo, la que se efectúa en el transposón Tn5, el elemento transponible se sale de un lugar en el cromosoma

y se reinserta en un segundo lugar. EL número de copias de un transposón conservador sigue siendo uno. En la transposición replicadora, se realiza la replicación y el conjunto replicado se inserta en otro lugar. Así una vez completado el evento, una copia del elemento de transposición permanece en el sitio original y otra copia se encuentra en el nuevo sitio. Durante el proceso, la fuente de transposones permanece en su sitio original, en ningún momento queda libre el origen del transposón en la célula. (10).

#### **Mutagénesis por transposón.**

Si el sitio de inserción para un elemento de transposición está dentro de un gen bacteriano, la inserción del transposón dará por resultado la pérdida de la continuidad lineal del gen, dando lugar a una mutación. De modo que los transposones proporcionan un medio fácil para crear mutantes cromosómicos; debido a la presencia del transposón mismo que se puede detectar por sus propiedades de resistencia a los antibióticos, la selección de células resistentes a los antibióticos después de la transposición, se puede usar para el aislamiento de una amplia variedad de mutantes. (10).

Dos de los transposones ampliamente utilizados para la mutagénesis son el Tn5, que confiere resistencia a la neomicina y a la kanamicina, y el Tn10, que contiene un marcador para la resistencia a la tetraciclina, (10).

#### **IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.**

Entre las bases generales para el control y prevención de la brucelosis bovina se encuentran la identificación y eliminación de los animales infectados, aunado a programas de

vacunación. Así que existe una urgente necesidad de contar con una prueba diagnóstica sencilla, sensible y específica, esta necesidad se hace más aguda en zonas donde la prevalencia de la infección es alta y la vacunación de animales adultos es permitida. (32).

Las pruebas serológicas se usan ampliamente en el diagnóstico de la brucelosis humana y animal. Si bien se tienen muchas pruebas para detectar anticuerpos específicos contra *Brucella* en suero, plasma sanguíneo y otros líquidos orgánicos como leche, plasma seminal y moco vaginal, no existe ninguna prueba que aplicada aisladamente permita descubrir la totalidad de los casos de brucelosis. De aquí que los programas de erradicación se basen en el criterio de diagnóstico de hato, (50).

La elección de los métodos de diagnóstico para un programa de control y/o erradicación dependerá de la especie animal, la población bajo vigilancia, la tasa de prevalencia en las diferentes regiones, y los programas de vacunación en curso, (50).

Para fines prácticos, las pruebas diagnósticas pueden dividirse en:

- a) Pruebas tamiz ó de "screening".
- b) Pruebas complementarias.
- c) Pruebas de vigilancia epizootiológica.

#### PRUEBAS TAMIZ.

Este tipo de pruebas de caracterizan porque poseen una alta sensibilidad, lo que significa que pocos ó ningún animal falso negativo resulta de su realización. Además suelen ser pruebas

sencillas, económicas y prácticas. Dentro de este grupo se incluye la prueba de tarjeta ó rosa de bengala, la cual se puede realizar en el total de los animales de un hato; todos los sueros de los animales que resulten positivos, deben pasar a una prueba complementaria, (50).

#### PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.

Estas sirven para resolver problemas como: eliminación ó disminución de las reacciones heteroespecíficas; detección de anticuerpos "incompletos"; diagnóstico correcto del mayor número de casos, especialmente los crónicos, que suelen permanecer con diagnóstico incierto; diferenciación de títulos residuales debidos a vacunación ó a infección: Estas pruebas se aplican en hatos problema, donde la infección persiste pese a la aplicación de exámenes serológicos y a una eliminación rigurosa de reactores. Entre estas pruebas se incluyen la prueba de rivanol y la prueba de fijación del complemento, (50).

La diferenciación de los títulos residuales de vacunación de los de infección es difícil e incierta (en ambas condiciones están presentes los mismos tipos de anticuerpos), pues existen diferencias en la proporción relativa y en la persistencia de cada tipo de anticuerpo, que dependerán de la edad al momento de la vacunación, el tiempo transcurrido desde entonces, la exposición a cepas de campo, la respuesta individual de los animales y la evolución de la enfermedad. En estados crónicos de la enfermedad los títulos de anticuerpos son frecuentemente irregulares, caen a niveles bajos y fluctúan durante períodos indefinidos, (50).

## PRUEBAS DE VIGILANCIA EPIZOOTIOLÓGICA.

En este grupo se incluye la prueba de anillo en leche, la cual se recomienda en áreas controladas y libres de infección para descubrir hatos presuntamente infectados, (50).

### INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS.

La Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales (NOM) establece a las siguientes cuatro pruebas inmunológicas como pruebas oficiales: pruebas de tarjeta, rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche, (14). En animales vacunados, las pruebas diagnósticas deben realizarse cierto tiempo después de la vacunación. En el caso de los bovinos, en las hembras mayores de 22 meses que hayan recibido la dosis clásica de vacuna cepa 19 a los 3 a 6 meses de edad ó bien hayan recibido una dosis reducida, las pruebas deberán realizarse 10 meses después de la vacunación. En el caso de las cabras, ya sean vacunadas con dosis normal ó reducida de cepa REV-1 sólo se podrá realizar 8 meses después de la vacunación, (14).

En el caso de animales nunca antes vacunados, las pruebas se realizan en bovinos a partir de los 6 meses de edad, y en caprinos a partir de los 4 meses de edad, (14).

En animales infectados de forma natural con *B. abortus*, la IgM es la primera clase de inmunoglobulina que aparece en el suero, alcanzando normalmente altos títulos en las infecciones agudas; la IgG aparece poco después, siendo la clase predominante cuando declina la respuesta de IgM. La IgG normalmente persiste mientras el animal permanece infectado. De las dos subclases de IgG del suero bovino (IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>), la más abundante es la IgG<sub>1</sub>,

que es también la aglutinina predominante en los anticuerpos que fijan el complemento. (29)

En animales vacunados con la cepa 19, la IgM aparece primero, seguida a los 10 días por la IgG. Los anticuerpos anti *Brucella* IgG disminuyen con el tiempo y las aglutininas persistentes se deben a anticuerpos de la clase IgM. (29).

#### PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN TARJETA.

Esta prueba tuvo su origen en la prueba de placa con antígeno acidificado. Sus autores observaron que el pH de su prueba si destruía la actividad de aglutininas "no específicas" sin afectar las "específicas". Es la prueba de rutina para diagnosticar brucelosis, es rápida, sencilla, solo se necesita el suero y un test comercial para realizarla pero solamente es cualitativa y a veces puede darnos muchos falsos positivos. (13).

Con esta prueba se detecta la presencia de anticuerpos circulantes, ya sean de origen vacunal, por infección natural ó por antígenos naturales (reacciones cruzadas con otros microorganismos como *Salmonella urbana*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas maltophilia*, *Yersinia enterocolitica*), (14).

#### PRUEBA DE RIVANOL.

Esta prueba fue desarrollada por Anderson (1964), y se basa en que el rivanol (que es un colorante de acridina) tiene la habilidad de precipitar las proteínas del suero de bovino, entre ellas las aglutininas "no específicas". Mediante el uso de cantidades iguales de suero y de solución al 1% de rivanol, queda un precipitado y su sobrenadante, de este sobrenadante se detectan exclusivamente las IgG. Sin embargo, para que la prueba pueda ser efectiva se emplea un antígeno de *Brucella abortus*

especial, que es altamente sensible, con el fin de compensar el efecto de la dilución de los anticuerpos.

Es una prueba complementaria a la prueba de tarjeta es de tipo cuantitativa, sin embargo es muy laboriosa, se necesita de una centrifuga para realizarla y puede llegar a dar resultados falsos. (13).

#### PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO.

Esta prueba se realiza en muchos países para el diagnóstico confirmatorio de *Brucella spp.* En la brucelosis bovina, aunque tanto los anticuerpos IgG como IgM fijan el complemento, el isotipo IgG, es mucho más efectivo que la IgM en la fijación de complemento. La IgG, no fija el complemento, y además evita la fijación del complemento por otras inmunoglobulinas, produciendo un fenómeno de positividad prozona (en las primeras diluciones, la prueba aparece negativa y en las más altas se observa positividad).

Aunque los resultados de la prueba de fijación de complemento son muy confiables, ya que es sumamente sensible y específica, tiene el inconveniente de ser sumamente laboriosa; además participan muchas variables que afectan su uniformidad y algunos de sus ingredientes pierden actividad rápidamente, por lo que es esencial aplicar controles para cada una de las partes.

Esta prueba se ha utilizado en los países nórdicos (Dinamarca, Finlandia, Noruega y Suecia), donde la brucelosis ya ha sido erradicada, y en países como Australia, Cuba, EUA, Nueva Zelanda, donde ya hay erradicación y/o control de la enfermedad, (50).

#### PRUEBA DE ANILLO EN LECHE.

Con esta prueba se detecta la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en muestras de leche. No se recomienda su realización en leche de caprinos, ni en leche homogeneizada.

Esta prueba se realiza como prueba de vigilancia epizootiológica sólo en leche de vacas; los resultados deben confirmarse con pruebas serológicas, la prueba está indicada para muestras de hatos (tanques mezcladores, botes de recolección, etc).

La prueba se practicará en muestras de leche entera, crema, queso u otro subproducto lácteo, con antígeno autorizado. La leche para este análisis debe ser colectada 24 horas antes de realizar la prueba y puede almacenarse un máximo de 3 días. Las muestras de leche en mal estado no se deben analizar porque dan resultados falsos, (14).

Para que esta prueba pueda realizarse y funcione adecuadamente, deberán estar presentes en la leche los siguientes elementos: Anticuerpos contra *Brucella*: Son detectados por adición a la leche de un antígeno de *Brucella* teñido con hematoxilina (azul), estas aglutininas son las responsables de que se agrupen y asciendan a la superficie, pudiendo ser destruidas por el calor y por agitación violenta de la leche.

Antígeno: El antígeno se une con el anticuerpo (si está presente) formando un complejo el cual se adhiere al glóbulo de grasa y asciende formando una capa de crema coloreada de azul (anillo de color azul). Si no existen anticuerpos contra *Brucella*, el antígeno permanecerá suspendido en la leche, dando un color homogéneo azulado bajo una capa de crema blanca (anillo

de color blanco). (13).

Existen una serie de problemas involucrados en el diagnóstico de la brucelosis como son: períodos de incubación, existencia de infecciones latentes, reacciones falsas positivas causadas por la vacunación, así como antígenos heteroespecíficos, reacciones falsas negativas y procedimientos complejos de laboratorio. (4).

Aunque se cuentan con una variedad de pruebas, éstas presentan ventajas y desventajas, incrementándose aún más cuando se hace uso de la vacuna Cepa 19 (en dosis normal) en animales de más de 1 año de edad. Ya que las pruebas cualitativas de identificación de anticuerpos son superiores, mientras que las pruebas cuantitativas son menos sensibles y específicas. (1).

El diagnóstico de la brucelosis en el ganado vacuno es complicado cuando son usadas vacunas vivas tal como la Cepa 19 de *Brucella abortus* en gran escala. El anticuerpo inducido por respuesta a estas vacunas es difícil de distinguir de aquellos inducidos por una infección natural a través de las pruebas serológicas rutinarias. (43).

Varias pruebas serológicas confirmatorias como la de rivanol, fijación del complemento e inmunodifusión en agar-gel conteniendo un antígeno soluble polisacárido pueden diferenciar algunos anticuerpos inducidos por la vacunación en los animales infectados. (43).

En recientes años, la prueba de ELISA usada también para caracterizar el lipopolisacárido liso de *B. abortus* en la técnica de ELISA Indirecto ó identificando el O-polisacárido en la técnica de ELISA Competitiva parece ser un método muy sensitivo y

específico para la medición de anticuerpos inducidos por la infección natural. (43).

#### PRUEBA DE ELISA INDIRECTO.

Se ha encontrado que el ELISA indirecto con lipopolisacáridos (como antígeno), es tan sensible como las pruebas de tarjeta y fijación del complemento para el diagnóstico de la infección por *B. abortus*. Además, al analizar sueros con esta prueba, el ELISA resultó más específico para la diferenciación entre vacunados e infectados. En el caso de los animales adultos, el ELISA fue tan específico como la Inmunodifusión Radial y más específico que las pruebas de tarjeta y fijación del complemento, aunque tampoco diferenció totalmente vacunados de infectados. En el caso del antígeno no sólo se ha empleado lipopolisacáridos, se han empleado células completas e incluso Cadena-O separada del lipopolisacárido, (18).

#### PRUEBA DE ELISA COMPETITIVO.

Esta prueba se basa en el uso de la cadena-O del lipopolisacárido de *B. abortus* como antígeno, conjugado con una poli-L-lisina para darle fijación en una placa de poliestireno, y la utilización de anticuerpos monoclonales para que compitan en contra de los anticuerpos séricos, (34). Es altamente específica, ya que se ha evaluado comparándola con las pruebas de rutina en el diagnóstico de la brucelosis (tarjeta, rivanol, fijación del complemento), esta tiene un alto grado de selección entre animales infectados y animales vacunados, las investigaciones recientes demuestran que tiende a diferenciar el 100% de los animales infectados, y es una herramienta muy útil cuando se trata de diferenciar animales que han sido vacunados

con dosis reducida en edad adulta, sin embargo, cuando los animales han recibido más de una vacunación con dosis reducida, esta prueba pierde su capacidad de diferenciar animales infectados de animales vacunados, (3).

#### PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL.

Esta prueba ha sido evaluada en el ganado bovino y, en menor medida en el ovino. En el bovino, la prueba presenta una alta especificidad para diferenciar animales con infección demostrada por aislamiento bacteriológico de los vacunados con B-19. En el caso más desfavorable, que se da en la vacunación de adultos con la cepa B-19, su especificidad es del 80%, superior al 66% de la fijación del complemento, la inmunodifusión radial puede ser positiva en bovinos vacunados en la edad adulta ó en estado de gestación, cuando se establece una infección permanente en las ubres por la cepa vacunal. El 76.5% de los animales que eliminan vacuna B-19 por la leche, contienen anticuerpos en la sangre.

Esta prueba ha sido aplicada al diagnóstico de la brucelosis bovina dentro de programas de control con buenos resultados, (18).

#### PRUEBA DE AGLUTINACIÓN LENTA EN TUBO.

Esta prueba consiste en colocar el antígeno y el suero en un medio líquido, facilitando de esta forma el reconocimiento de los anticuerpos hacia el antígeno y, su posterior aglutinación después de un período de incubación, esta prueba se le considera cuantitativa, ya que se pueden efectuar diluciones del suero para determinar los títulos de cada suero en particular.

Al igual que la prueba de tarjeta, la interpretación de esta prueba dependerá de la presencia ó ausencia de aglutinación; y

al igual que la prueba de rivanol su interpretación dependerá de que el animal haya sido vacunado ó no, con la cepa 19 de *Br. abortus*, (5).

#### DIAGNÓSTICO DEFINITIVO.

Otro tipo de diagnóstico más seguro pero más tardado es el de tipo bacteriológico, en el cual se aísla el microorganismo a partir de muestras obtenidas de animales que han obtenido resultados positivos en las pruebas serológicas. El aislamiento de *Brucella* de un animal es el único método definitivo de diagnóstico, debido a que la serología sólo puede identificar animales que tienen anticuerpos contra *Brucella*, el microorganismo debe ser aislado para lograr diferenciar la cepa 19 de *Brucella abortus* de otros tipos de *Brucella*.

El mejor medio para el crecimiento de *Brucella* es el medio de agar soya tripticaseína ó TSA, pero la desventaja es que este medio no inhibe el crecimiento de otras bacterias. El medio de Farrell inhibe el crecimiento de bacterias diferentes a *Brucella*, existe un medio de Ewalt y un medio a base de etil violeta que son buenos para controlar la contaminación y permitir el crecimiento de *Brucella*, (7).

Para la recolección y envío de una muestra al laboratorio de diagnóstico, siempre deben considerarse 3 puntos básicos:

1) Identificación de la muestra.-Es de primordial importancia insistir en lo siguiente: Nombre del propietario, descripción de los animales, fecha y hora de la muerte y/o sacrificio del animal, identificación del animal, así como del hato, datos del remitente.

2) Historia clínica.-Deben incluirse detalles del animal y

del hato, y ser lo más detallada y concreta posible: Curso de la enfermedad, número de animales afectados, tasas de mortalidad y morbilidad, edad de los animales afectados, tipo de alimentación, tipo de explotación, calendario de vacunación, tratamientos aplicados, tipo de conservador utilizado, diagnóstico presuntivo emitido por el médico veterinario, etc.

3) Para el envío de las muestras, siempre debe tenerse en cuenta que el material recolectado es potencialmente patógeno, por lo que el medio más eficaz y seguro para el envío de muestras es el mensajero directo, siempre que se llenen los siguientes requisitos: Colocar en recipientes individuales, las muestras en sus respectivos recipientes deben colocarse entre material de amortiguamiento y en las cajas dobles para aumentar la resistencia, debe etiquetarse con la siguiente leyenda "Material biológico de fácil descomposición, manéjese con cuidado", (14).

Las muestras de elección para el aislamiento de *Brucella spp* en ruminantes son:

A. Bovinos.

1. Nódulos linfáticos: Suprarrenarios, retrofaríngeos, líacos internos, preescapulares, lumbares, parotídeos, mesentéricos.
2. Bazo.
3. Ubre: Una sección de cada cuarto.
  4. Órganos reproductores: Útero y ovarios, cotiledones placentarios, testículos, glándulas accesorias.
5. Fetos abortados: Contenido abomasal, pulmón, bazo.
6. Hisopos vaginales.
7. Leche: Por cuartos individuales.

8. Semen.

9. Sangre, (14).

B. Cabras y borregos.

1. Nódulos linfáticos: Supramamarios, submaxilares, retro-faríngeos, ilíacos internos.

2. Ubre: Una sección de cada medio.

3. Bazo.

4. Órganos reproductores: Útero y ovarios, testículos, glándulas accesorias.

5. Leche: Por medios individuales.

6. Semen.

7. Sangre, (14).

Para la confirmación del género y biotipo de *Brucella* se realizan las pruebas bioquímicas correspondientes:

PRUEBA DE TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI).-Esta prueba se utiliza para determinar la fermentación de los carbohidratos (glucosa, lactosa y sucrosa), se usa como primer paso en la identificación de bacterias Gram negativos, como base de pruebas adicionales, (7).

PRUEBA DE ÁCIDO SULFÚDRICO.-Consiste en determinar la producción de ac. sulfúdrico a través de una tira de papel impregnada con acetato de plomo al 10%, éste se oscurece por la presencia del ácido producido por las bacterias, (7).

PRUEBA DE UREA.-En esta prueba se determina la capacidad de degradar la urea, a través de la producción de la enzima ureasa. Dependiendo de la capacidad de degradación será el tipo de *Brucella*, (7).

PRUEBA DE DEPENDENCIA DE COLORANTES.-Consiste en sembrar en

medios base de Brucella ( con tionina, fucsina y safranina); el microorganismo puede ser inhibido por la presencia de estos colorantes, (7).

**PRUEBA DE REACCIÓN CON ANTISUEROS.**-Se utiliza para determinar el biotipo correspondiente ó sea, se determina si la bacteria es de tipo liso ó rugoso; se utiliza los anticuerpos A y M, (7).

**PRUEBA DE FAGOTIPIFICACIÓN.**-Esta prueba consiste en determinar qué tipo de fagos inhibe el crecimiento de la bacteria, para que de ésta forma se clasifique el biotipo de que se trata; algunos de los fagos más utilizados son: Iz, Rc, Wb y Tb, (7).

#### **PRUEBA DE INTRADERMOREACCIÓN.**

La entrada de *Brucella spp.* al organismo induce una respuesta inmune caracterizada por la producción variada y abundante de anticuerpos y de una respuesta mediada por células; se ha demostrado que ambas contribuyen de alguna manera en la protección inmunológica de los animales. Sin embargo, dada la localización de las brucelas, se le ha concedido un papel más preponderante a la inmunidad basada en las células inmunocompetentes.

El huésped ha desarrollado mecanismos para responder a los microorganismos y controlar la infección. Los anticuerpos producidos contra ciertos componentes antigenicos de la bacteria son eficaces durante la fase extracelular del crecimiento bacteriano. Se estimulan los linfocitos para producir sustancias mediadoras que afectan a otras células, por ejemplo, los macrofagos son activados para destruir los microorganismos intrace-

lulares, (48).

A continuación de una infección intracelular, las células huésped guardan la memoria de ese microorganismo específico y están en condiciones de responder más rápidamente si se exponen una segunda vez. La primera observación indicativa de una respuesta celular específica es la reacción alérgica consecutiva a la inyección intradérmica del microorganismo ó sus productos, (48).

Por otro lado, las brucelas son fagocitadas por los macrofagos, pero, a diferencia de lo que ocurre con otras bacterias, resisten a la destrucción intracelular, de ahí su clasificación como parásitos intracelulares facultativos, (39).

Desde un tiempo a la fecha esta prueba de intradermoreacción la han empezado utilizar en el diagnóstico de campo de la brucelosis con resultados prometedores.

Un estudio realizado por Blasco y sus colaboradores (1995), donde evaluaron la prueba de intradermoreacción junto con otras pruebas serológicas como la prueba de tarjeta, prueba de fijación del complemento y prueba de ELISA Indirecto en un total de 291 ovejas infectadas con *B. melitensis* y no vacunadas ( realizaron el aislamiento bacteriano) junto con 100 ovejas libres de la infección, encontraron los siguientes resultados: De las 140 ovejas de las cuales se aisló el agente, las sensibilidades de las pruebas fueron: ELISA 100%, Intradermoreacción 97.1%, Tarjeta 92.1%, Fijación 88.6%; de las 151 ovejas de las cuales no aislaron el agente (pero eran del rebaño infectado), los porcentajes fueron: ELISA 100%, Intradermoreacción 94%, Tarjeta 57.6%, Fijación 53.6%. En contraste, todas las pruebas fueron

negativas en las 100 ovejas libres de la infección, (9).

Otro estudio realizado por Bercovich y colaboradores (1990) donde evaluaron la prueba de intradermoreacción junto con la prueba de aglutinación en tubo, prueba de fijación del complemento, y la prueba de anillo en leche en un total de 1077 vacas de distintas granjas, se encontraron 984 animales negativos a todas las pruebas; los restantes 93 animales positivos fueron sacrificados para realizar el aislamiento, tan sólo 12 animales con títulos 1:200 en fijación del complemento y con aislamiento positivo dieron reacción negativa a la prueba intradérmica, por lo que la sensibilidad (calculada en 81 vacas) es del 81% y la especificidad de 83%, en estos animales coincidieron los resultados de las pruebas serológicas con la prueba intradérmica, los autores mencionan que la eficacia de la prueba intradérmica pudo tener variaciones en su experimento debido al proceso de estandarización, al brucellergeno (extracto proteico de *Brucella*), ó a causa de que la prueba intradérmica es suprimida por la inmunidad humoral, (8).

En general, estos y otros autores (15, 27, 47), sugieren que la prueba de intradermoreacción debe ser usada en combinación con las pruebas serológicas, teniendo un valor adicional en determinar el estado de ganado vacuno sospechoso cuando resultan negativos ó dudosamente positivos en otras pruebas.

Por todo lo anterior, se denota la necesidad de evaluar una cepa vacunal capaz de inducir anticuerpos que no interfieran con el serodiagnóstico de la enfermedad, pero que confieran una adecuada protección contra la infección de campo, sobre todo en aquellas zonas enzooticas del país.

#### OBJETIVO GENERAL.

Evaluar en becerras Holstein de un hato con problemas de brucelosis, la protección conferida por la vacunación de *Brucella abortus* con la cepa rugosa mutante por transposición.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Determinar el comportamiento serológico de los animales vacunados utilizando las pruebas rutinarias.
- 2.- Estandarizar pruebas experimentales para evaluar la presencia de anticuerpos contra la cepa rugosa.
- 3.- Evaluar la presencia de brucelosis, utilizando estudios serológicos y bacteriológicos en el grupo vacunado debido al riesgo de estar en un hato enzootico.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### Animales de experimentación.

Se utilizaron 16 becerras de la raza Holstein con una edad entre 4 y 6 meses de edad, las cuales resultaron negativas a la prueba serológica de tarjeta, dichos animales pertenecen al hato propiedad de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan-UNAM localizada en la antigua Carretera Cuautitlan-Teoloyucan Km 2.5 en el Municipio de Cuautitlan Izcalli, compartiendo las instalaciones con explotaciones de ovinos, caprinos, equinos, aves y conejos así como áreas de cultivo e instalaciones dedicadas a la docencia.

Dicho hato es dedicado a la producción de leche y sus derivados, cuenta con 90 bovinos, de los cuales 35 están en producción y el resto constituyen el reemplazo del hato en sus diferentes etapas, se le realizó un muestreo serológico mediante las pruebas rutinarias a las brucelas lisas así como lográndose aislar el microorganismo en 6 vacas, y en base a esto determinar la prevalencia de brucelosis del hato siendo del 8.33%.

Las becerras fueron muestreadas el día 0 para comprobar que no poseen anticuerpos contra la brucelosis y siendo negativas fueron vacunadas con la cepa rugosa mutante por transposición de *B. abortus*, vía subcutánea, a la dosis de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, posteriormente se realizaron muestreos sanguíneos a los 15, 30,

45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 270 días posvacunales; para realizar las pruebas serológicas para las brucelas lisas se utilizaron las pruebas de tarjeta, rivanol, a estas mismas muestras se les realizó las siguientes pruebas serológicas: ELISA Indirecto, tarjeta, prueba de aglutinación lenta en tubo empleándose un antígeno rugoso de *Brucella abortus*, así como se realizó la prueba de intradermoreacción utilizando un brucellergeno comercial (extracto proteico de *Brucella*).

#### Diseño Experimental.

Los animales se encontraron conviviendo constantemente con el resto del hato durante la realización del trabajo, ya que se mantuvo en las mismas condiciones de estabulación como se tenían antes de la vacunación.

El muestreo serológico se realizó de la siguiente manera:

-Se ocupó tubos y agujas vacutainer para la toma de muestras, una vez formado el coágulo fue eliminado por centrifugación, quedando únicamente el suero, se mantuvo en congelación hasta el día en que se realizaron las pruebas, siendo un tiempo máximo de 72 horas.

#### Vacuna.

Se prepararon Cajas de Petri conteniendo Agar Brucella (Bioxon), donde se sembró la cepa rugosa de *Brucella abortus* mutante por transposición a partir de un cultivo madre<sup>1</sup>, se incubaron por 48 horas a 37°C, posteriormente se cosechó la cepa a partir de las cajas con 100 ml de solución peptonada.

Posteriormente, se realizó el recuento de gérmenes viables

---

<sup>1</sup>El cultivo madre fue proporcionado por el Dr. Garry L. Adams, investigador de la Universidad de Texas A&M.

a través del método de Miles y Misra, empleando micropipetas automáticas de 40 a 200  $\mu$ l, se prepararon diluciones de la suspensión a razón 1:10, mezclando 0.1 ml con 0.9 ml de PBS, cambiando puntas para cada dilución. Las placas de Agar Brucella se secaron en la estufa con la tapa cerrada durante 24 horas a 37°C y después se siguió secándolas por 2 horas con la tapa entreabierta. Las placas debían estar lo suficientemente secas para absorber una gota de 0.02 ml en 15 a 20 minutos.

Se depositó en las placas, una gota de 0.02 ml a una altura de 2.5 cm, para que la gota cubra una superficie de 1.5 a 2.0 cm de diámetro. Se prepararon 8 diluciones y se sembraron en las cajas de Petri con 8 repeticiones cada una, absorbidas las gotas, se incubaron de la manera habitual. Los recuentos se realizaron en las diluciones que contuvieran el 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 valor medio de las ocho repeticiones de cada dilución, el promedio de colonias por gota, multiplicado por 50 veces el factor de dilución en la gota, dio el número de gérmenes viables por mililitro, (5).

A través del método descrito y la medición de la transmitancia de la suspensión bacteriana a 600 nm, se realizaron los ajustes necesarios para colocarla a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml, siendo el volúmen de vacuna preparada de 50 ml.

Obtenida la concentración requerida, se efectuaron pruebas de inspección, se le realizó la prueba de identidad que consistió en realizar la tinción de las placas con cristal violeta, además la prueba de aglutinación con acriflavina, colocando una gota de

la suspensión en un portaobjetos y agregando el colorante para confirmarla morfología rugosa, además la prueba de ausencia de gérmenes contaminantes y el recuento de gérmenes viables, antes de la inoculación, (5).

Elaborado el inóculo el mismo día de la vacunación, se mantuvo en refrigeración durante el traslado, se aplicó a las becerras por vía subcutánea, a dosis de  $1 \times 10^7$  UFC/ml, en la región axilar.

#### Antígenos.

Para realizar las pruebas serológicas de tarjeta y rivanol, se emplearon los antígenos comerciales elaborados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios-México. Para la prueba de tarjeta se utilizó el antígeno autorizado de *Brucella abortus* cepa 1119-3 al 8% de concentración celular, teñido con rosa de bengala en ácido láctico con un pH de 3.65 (+/- 0.05); mientras que para la prueba de rivanol se utilizó el antígeno autorizado de *Brucella abortus* cepa 19, teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta, con un pH de 5.8 a 6.2, y una concentración celular del 4% y la solución de rivanol al 1% (lactato de 2-etoxi-6,9-diamino acridina).

#### Brucellergeno (Extracto proteico de *Brucella*).

Para realizar la prueba de intradermoreacción, se utilizó el brucellergeno OCB (Batch No. 26 N151), el cual es elaborado por Rhône-Mérieux (Lyon, Francia). Conforme a su manufactura, es preparado a partir de *B. melitensis* B115 (Cepa rugosa), y el producto contiene 2,000 unidades de proteína/ml y 0.1 mg/ml de merthiolate sódico en 0.15 M NaCl.

#### Antígenos Rugosos.

Para realizar la prueba de tarjeta (con antígeno rugoso) se utilizó un antígeno con células completas de la cepa rugosa, el cual se elaboró de la siguiente manera: Se prepararon 20 tubos inclinados de 20 x 150 mm como mínimo conteniendo Agar Brucella (Bioxon) inclinado, se colocaron en ángulo mientras se solidificaba el medio, de manera que la superficie inclinada del medio debía tener por lo menos 50 mm de longitud.

Se realizó la siembra de cada uno de ellos a partir de un cultivo madre de la cepa mutante rugosa de *Brucella abortus* y se incubó por 48 horas.

Posteriormente, se prepararon botellas Roux, conteniendo Agar Brucella se agregó 8 grs de Agar Bacteriológico (Bioxon) por cada litro de Agar Brucella.

Cumplido el tiempo de incubación, a cada tubo se agregó unos 20 ml de solución salina en forma estéril, se agitó para desprender las colonias, con una jeringa se obtuvo la suspensión, y por aspersión se sembró cada botella, se agitó para que el material se extienda por toda la superficie del medio, se incubó por 48 horas a 36°C colocadas en forma invertida.

Para cosechar las bacterias, se agregaron 20 ml de sol. salina a cada botella y se agitó, el sobrenadante se vertió en un matraz Erlenmeyer, para inactivarse en baño María a 90°C por 60 min.

La suspensión se lavó por medio de centrifugación por 40 min a 4000 rpm y el paquete celular se resuspendió en 500 ml de sol. salina al 0.8% y fue teñido con 3 ml de Rosa de Bengala al 1% manteniéndose en agitación magnética, por 2 horas, después las

células se lavaron 2 ocasiones con sol. salina y se centrifugaron para eliminar el exceso de colorante.

La pastilla antigénica se resuspendió en 100 ml de sol. amortiguadora de carbonato-bicarbonato (pH de 8.9) y por último se midió la concentración celular en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 460 nm. para colocarla al 8%. (5, 12).

Para la prueba serológica de ELISA Indirecto, se utilizó un antígeno rugoso con células completas irradiadas, el cual se elaboró de la siguiente manera:

Se prepararon tubos inclinados de 20 x 150 mm como mínimo conteniendo Agar Brucella (Bioxon) inclinado, se colocaron en ángulo mientras se solidificaba el medio, de manera que la superficie inclinada del medio debía tener por lo menos 50 mm de longitud. Se realizó la siembra de cada uno de ellos, a partir de un cultivo madre de la Cepa mutante rugosa de *B. abortus*, se incubaron por 48 hrs. a 36°C. Posteriormente, se prepararon botellas Roux, conteniendo 200 ml de Agar Brucella por botella, cumplida la incubación, se obtuvieron las bacterias por agitación con sol. salina de cada tubo, para ser sembradas en las botellas, se incubaron por 48 hrs a 36°C.

Las bacterias fueron cosechadas con sol. salina de todas las botellas, se vertieron en un matraz Erlenmeyer, y posteriormente se realizó la medición de la densidad de la suspensión para lograr una concentración de 4.0%, finalmente fueron irradiadas a una dosis de 1.0 Mrad en la Planta de Irradiación del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares para su utilización en la Prueba de ELISA Indirecto, (5).

Para la prueba de aglutinación lenta en tubo, se preparó el

antígeno de células completas de la sig. manera:

Se prepararon 5 recipientes de plástico conteniendo 300 ml de Caldo Brucella (Bioxon) cada uno, a partir de un cultivo madre de la cepa mutante rugosa de *B. abortus*, se realizó la siembra de cada uno de ellos, tomando con el asa de inoculación, un conjunto de colonias del cultivo, se introdujeron a incubación a 37°C por 72 horas.

Cumplida la incubación, se sometió a centrifugación cada uno de los recipientes (5000 rpm/30 min) para sedimentar el paquete bacteriano en el fondo del recipiente.

Este paquete celular fue suspendido en una solución salina al 0.85% (8.5 gr NaCl/lit de agua destilada) combinada con formol al 1% para su inactivación y se sometió a agitación magnética por un lapso de 3 horas.

Una vez inactivado el paquete celular, se realizó la medición de la concentración para colocarla al 4.5%, se colocó en recipientes de vidrio, haciendo una dilución 1:100 con una solución salina fenolada al 0.5% (5 gr Fenol/lit de agua destilada) y se colocó en refrigeración a 4°C por 72 horas para su "maduración". Terminado este proceso, se procedió a realizar la prueba como se describe posteriormente, (5).

Prueba de tarjeta.

Se ocupó una placa de vidrio perfectamente limpia y seca.

Se empleó el antígeno Rosa de Bengala de tipo comercial.

Se dejó a temperatura ambiental tanto suero como antígeno por un lapso de 30 min.

Se colocó en la placa de vidrio 0.030 ml de suero al que se agregó una cantidad igual de antígeno, seguido de esto, se mezcló

con un agitador múltiple, tomando la placa se agitó en forma circular en 6 ocasiones en un sentido, seguido por otras 6 veces en sentido opuesto. La mezcla de suero-antígeno se agitó por 4 minutos, transcurrido el tiempo, se observó las reacciones en un trasiluminador. Los resultados se interpretaron como positivo ó negativo, según la presencia ó ausencia de aglutinación. (7).

#### Prueba de rivanol.

Se mezclaron 0.4 ml de suero con 0.4 ml de solución de rivanol en un tubo de ensayo, se dejó reposar por un lapso de 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se tomó el sobrenadante en una pipeta de 0.2 ml y se colocó en una placa de vidrio cuadrículada 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml respectivamente, se agregó a cada uno 30  $\mu$ l de antígeno para test de rivanol, se mezcló de menor a mayor concentración, se agitó en forma circular por 4 ocasiones, se dejó reposar en un estuche para prueba de rivanol durante 6 minutos, cumplido el tiempo se agitó en 4 ocasiones y se volvió a dejar reposar por 6 minutos, en la forma ya descrita, transcurrido el tiempo se observó las reacciones en una fuente luminosa para realizar la lectura. (18).

#### Prueba de aglutinación lenta en tubo.

Se utilizó el método de dilución decimal (en el cual se realizan diluciones no superiores a 1:400):

Se colocaron el número requerido de tubos de ensayo de vidrio claro (13 mm x 100 mm) en hileras.

Se marcó el primer tubo de cada hilera (5 tubos por hilera) con el número de la muestra de suero.

Con una pipeta de 0.2 ml, se extrajo el suero del tubo hasta

que el nivel de la pipeta llegará un poco arriba de la graduación máxima.

Se deja que el suero vuelva al tubo hasta que el fondo del menisco en la luz de la pipeta coincida con la graduación máxima, se retiro la pipeta con la punta deslizándose a lo largo de la superficie externa de la pipeta.

Se introdujo la pipeta hasta el fondo del 1er. tubo, se dejó salir 0.08 ml de suero y se retiro la pipeta.

Por el mismo proceso, se introdujeron 0.04 ml de suero en el 2o. tubo, 0.02 ml en el 3o., 0.01 ml en el 4o. y 0.005 ml a un 5o. tubo.

Se efectuó las mismas operaciones en las muestras sucesivas de cada hilera de tubos.

Con una pipeta, se introdujeron en cada tubo 2.0 ml del antígeno diluido, obteniendo así diluciones de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.

Se agitaron suavemente las gradillas con tubos, se envolvieron con polipapel, y se colocaron en una incubadora donde se dejaron a 37°C por 72 hrs.

Para la lectura, se observó contra un fondo negro mate, con la luz situada detrás de la gradilla; se dio como reacción positiva cuando la mezcla de suero y antígeno es clara y una leve agitación no disgrega los grumos; hay reacción negativa cuando la mezcla de suero y antígeno no muestra claridad alguna y la agitación leve no revela la presencia de grumos, (5).

Prueba de ELISA Indirecto.

Se realizó sobre microplacas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano, el antígeno a utilizar fueron células completas

de la cepa rugosa de *B. abortus* inactivadas por radiación, tras una titulación previa, se empleó la dilución 1:64 que resultó ser la más adecuada, se diluyó el antígeno en buffer carbonatado (0.06 M, pH 9.6). La adsorción se consiguió añadiendo a los pocillos 100  $\mu$ l de esta solución e incubándolos por 24 hrs a 37°C. El antígeno no absorbido se retiró mediante 3 lavados con PBS-Tween, se sellaron las placas y se guardaron a 4°C. La técnica se realizó como se describe a continuación:

a) Incubación de 100  $\mu$ l de suero problema, diluido en PBS (solución buffer de fosfatos) a 1:200, durante 60 minutos a 37°C.

b) Lavado 3 veces con PBS-Tween, de las placas.

c) Incubación (60 min, 37°C) de 100  $\mu$ l de conjugado a la dilución 1:2000, se empleó proteína G (Pierce) conjugada con peroxidasa.

d) Lavado 3 veces con PBS-Tween, de las placas.

e) Adición de 100  $\mu$ l de sustrato e incubación durante 15 min a temperatura ambiente. Como sustrato se empleó ácido 2-2 azinobis, 3-etilbenzotiazolona sulfónico (ABTS, Sigma Chemical Co, 5.5 mg en 50 ml de buffer citrato 0.05 M pH 4, más 19  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, al 1.2%).

f) La lectura se realizó a los 15 min, sin detener la reacción, a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro múltiple (Titertek Multiskan), provisto de un registrador de datos, (18).

Se realizó una titulación previa tanto del antígeno como del conjugado para encontrar la dilución adecuada, está se determinó analizando las densidades ópticas obtenidas en varias diluciones del antígeno y del conjugado, empleando sueros control positivo

y control negativo, las diluciones empleadas fueron aquellas que diferenciaron claramente los sueros positivos de los negativos, y que presentaron menor variación entre las repeticiones realizadas.

#### Prueba de intradermoreacción.

Los animales vacunados fueron sometidos a la prueba de intradermoreacción utilizando el brucellergeno comercial (Brucellergene OCB, Rhône Mérieux), después de 12 meses post-vacunación. Una área de 3 x 3 cm fue rasurada en la región del cuello, se realizó una medición inicial del grosor de la piel utilizando un calibrador vernier empleando una jeringa insulínica se administró la dosis de 0.1 ml del brucellergeno (extracto proteico de *Brucella*) intradermicamente, posteriormente se realizaron revisiones a las 24, 48 y 72 hrs. post-inoculación, la lectura se realizó a las 72 hrs. utilizando el calibrador vernier para obtener la medida final. La prueba se consideró positiva cuando el grosor de la piel aumentó por lo menos en un 20% sobre el valor medido antes de la inoculación, (8, 9).

Paralelamente se realizó la prueba de intradermoreacción en un grupo de 10 bovinos machos, a los cuales, se les realizó la prueba de tarjeta convencional para confirmar que no tuvieran anticuerpos, este grupo fue utilizado como control negativo de la prueba intradérmica.

#### Seguimiento serológico y bacteriológico.

En caso de encontrar un animal positivo a las pruebas utilizadas para detectar las brucelas lisas durante el muestreo periódico, se le realiza un muestreo de sangre para el

aislamiento bacteriano, posteriormente se sacrifica el animal y se toman muestras de nódulos linfáticos, bazo, útero, y glándula mamaria para un estudio bacteriológico; las muestras se siembran en medio Farrell y se identifican utilizando las pruebas rutinarias (7).

## RESULTADOS.

En la Tabla No.1, se enlistan las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas de 6 animales pertenecientes al hato, identificándose como una cepa de campo de *B. abortus* biotipo 1, determinando la prevalencia del hato basándose en el número de aislamientos obtenidos en un 8.33%.

En la Tabla No.2, se mencionan los resultados de las pruebas serológicas realizadas en el grupo experimental, para confirmar que no poseían anticuerpos contra la brucelosis antes de la vacunación.

Fue elaborado un antígeno rugoso a partir de la cepa mutante rugosa por transposición para la prueba de tarjeta, este fue sometido a aglutinación con sueros negativos y sueros positivos a las brucelas lisas para evaluar la especificidad y sensibilidad del antígeno, debido a que se presentaron resultados falsos positivos, se determinó que la especificidad de la prueba era nula, por lo que se optó por descartarla.

La Gráfica No.1, presenta el comportamiento serológico del grupo vacunado con la prueba de aglutinación lenta en tubo, donde se observa un ascenso paulatino de los títulos, alcanzándose el título más alto, a los 30 días post-vacunación, manteniéndose en esta forma hasta los 90 días, posteriormente, se inicia un

descenso gradual de la curva, detectándose anticuerpos solo en la dilución más baja al final del período de evaluación, (9 meses post-vacunación).

Se describe en la Gráfica No.2, la prueba de ELISA Indirecto, donde se observa en la dilución 1:200 del suero, una elevación gradual de los valores de la densidad óptica, obteniéndose la mayor lectura en el espectrofotómetro a los 30 días post-vacunación, manteniéndose los valores en forma elevada hasta los 120 días, seguido de un decremento gradual de las lecturas, registrando valores aún mayores que la lectura previa a la vacunación, cerca del final del trabajo. (9 meses post-vacunación).

Para obtener las diluciones óptimas de los antígenos rugosos para las pruebas de ELISA y tubo de los sueros experimentales, se realizaron varias diluciones hasta encontrar las que diferenciaron claramente resultados positivos de negativos, además de presentar una menor variación entre los resultados de las repeticiones realizadas, por ello, se utilizó para la prueba de ELISA Indirecto, la dilución 1:200 de los sueros y 1:64 del antígeno y la dilución 1:2000 del conjugado, por su parte, para la prueba en tubo, el antígeno colocado a la concentración celular del 4.5%, fue diluido 1:100 para la realización de la prueba.

En forma adicional, se presenta en la gráfica No. 3, la respuesta inmune obtenida en la vacunación de bovinos utilizando la vacuna viva atenuada de *B. abortus*, cepa 19 en dosis clásica.

En la Tabla No.3, se presentan los resultados obtenidos en la prueba de intradermoreacción aplicada al grupo experimental

a los 12 meses post-vacunación, en base al criterio antes mencionado, se obtuvo que el 100% de los animales probados dieron \*reacción positiva a dicha prueba, paralelamente se les realizó la prueba de tarjeta convencional, resultando negativos, el 100% del grupo.

En forma complementaria, se enlista en la Tabla No.4, el grupo de animales utilizados como control negativo de la brucelización, donde además se muestran como animales negativos para la prueba de tarjeta; el 100% de este grupo no dio reacción alguna a la aplicación del brucellergeno (extracto proteico de *Brucella*).

Debido a que durante todo el transcurso del seguimiento, ningún animal resultó positivo a las pruebas serológicas utilizadas para detectar a las brucelas lisas, no hubo necesidad de realizar el aislamiento bacteriológico.

Para ambas pruebas experimentales se utilizaron sueros negativos a la prueba de tarjeta, dando valores promedio de 0.530 de densidad óptica en la dilución 1:200 (valores más bajos que los obtenidos del grupo vacunado) en la prueba de ELISA Indirecto así como resultados negativos en la prueba de aglutinación lenta en tubo.

Como marco de referencia, se incluye en el Anexo, las características diferenciales entre las especies del género *Brucella spp* y sus biotipos.

**TABLA No.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN  
REALIZADAS A LAS CEPAS AISLADAS.**

PRUEBA BIOQUÍMICA.	No. 108	No. 121	No. 128	No. 132	No. 153	No. 161
TRIPLE AZÚCAR HIERRO.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PROD. AC. SULFÍDRICO.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
UREA.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
DEPENDENCIA DE COLORANTES.						
TIONINA.						
1/25,000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1/50,000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1/100,000	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
FUCSINA.						
1/50,000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/100,000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
SAPRANINA.						
1/100,000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
REACCIÓN CON ANTISUEROS.						
A	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
FAGOTIPIFICACIÓN.						
Ix	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Rc	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Wd	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Td	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CRECIMIENTO EN ANTIBIÓTICO.	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

**TABLA No.2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS RUTINARIAS  
APLICADAS AL GRUPO EXPERIMENTAL ANTES DE LA VACUNACIÓN.**

No. ARETE	Tarjeta	Rivanol	I.D.R.	Fijación del Complemento	ELISA Indirecto
21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
26	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**TABLA No.3. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INTRADERMOREACCIÓN  
APLICADA AL GRUPO DE ANIMALES VACUNADOS.**

NO. ARETE	*Prueba de Tarjeta	Medida Inicial	Medida Final (a las 72 hrs.)	Resultado
21	(-)	0.5 cm	0.8 cm	Positivo.
22	(-)	0.9 cm	1.2 cm	Positivo.
23	(-)	0.6 cm	0.9 cm	Positivo.
24	(-)	0.6 cm	0.9 cm	Positivo.
26	(-)	0.8 cm	1.1 cm	Positivo.
27	(-)	0.4 cm	0.8 cm	Positivo.
28 **				
29	(-)	0.5 cm	0.8 cm	Positivo.
30 **				
31	(-)	1.0 cm	1.3 cm	Positivo.
25	(-)	0.5 cm	0.8 cm	
32	(-)	0.7 cm	1.0 cm	Positivo.
33	(-)	0.8 cm	1.1 cm	Positivo.
34	(-)	1.1 cm	1.4 cm	Positivo.
35	(-)	0.6 cm	0.9 cm	Positivo.
36 **				

\* La prueba de tarjeta referida, es la prueba rutinaria para el diagnóstico convencional.

\*\* Estos animales fallecieron antes de la realización de la Prueba de Intradermoreacción.

.Nota: Se considera como reacción positiva, un aumento del 20% o más sobre la medida inicial.

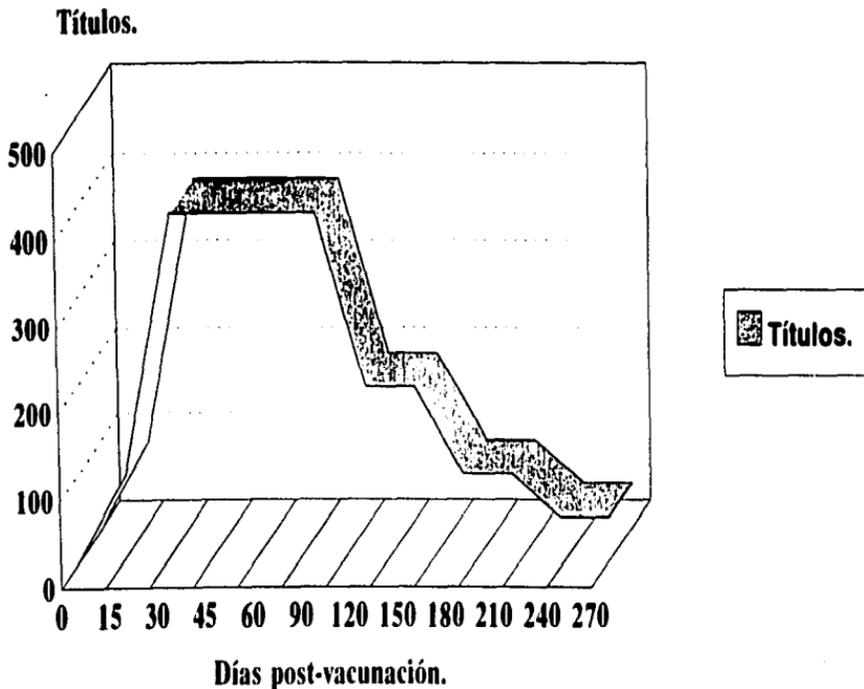
**TABLA No.4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INTRADERMOREACCIÓN  
 APLICADA AL GRUPO DE ANIMALES UTILIZADOS COMO CONTROL  
 NEGATIVO.**

<b>No. Arete</b>	<b>*Prueba de Tarjeta</b>	<b>Medida Inicial</b>	<b>Medida Final (a las 72 hrs.)</b>	<b>Resultado</b>
47	(-)	0.5 cm	0.5 cm	Negativo
63	(-)	0.6 cm	0.6 cm	Negativo
64	(-)	0.7 cm	0.7 cm	Negativo
70	(-)	0.5 cm	0.5 cm	Negativo
73	(-)	0.5 cm	0.5 cm	Negativo
76	(-)	0.6 cm	0.6 cm	Negativo
77	(-)	0.5 cm	0.5 cm	Negativo
79	(-)	0.7 cm	0.7 cm	Negativo
88	(-)	0.7 cm	0.7 cm	Negativo
92	(-)	0.8 cm	0.8 cm	Negativo

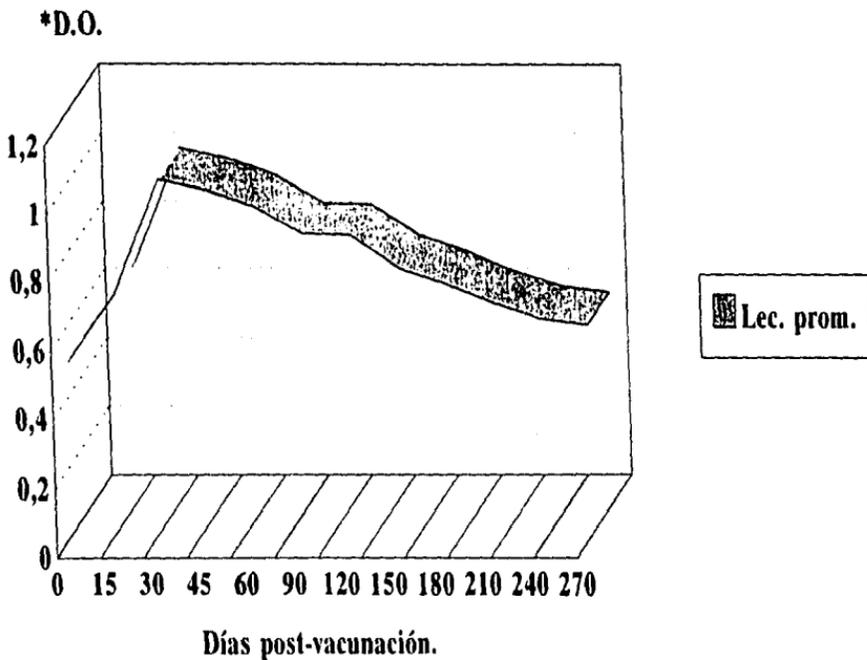
\* La prueba de tarjeta referida, es la prueba rutinaria para el diagnóstico convencional.

# GRÁFICA No.1. EVALUACIÓN SEROLÓGICA DEL GRUPO VACUNADO.

Prueba de aglutinación lenta en tubo.

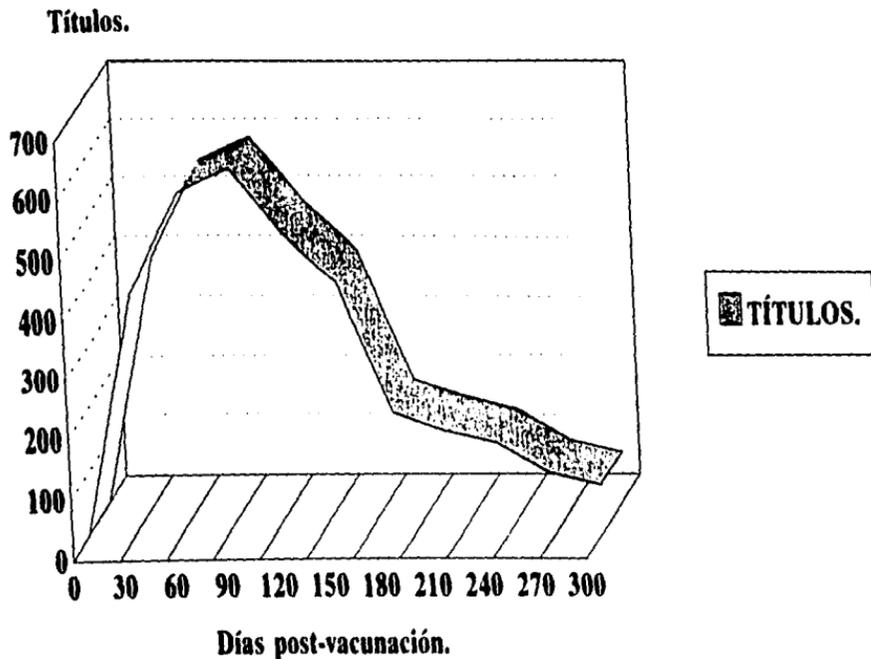


## GRÁFICA No.2. EVALUACIÓN SEROLÓGICA DEL GRUPO VACUNADO. Prueba de ELISA Indirecto.



\*D.O. Densidad Óptica.

### GRÁFICA No.3. RESPUESTA INMUNE A LA VACUNA DE B. abortus CEPA 19 EN DOSIS CLÁSICA.



Fuente: CONETB, 1995.

## DISCUSIÓN.

En la investigación en brucelosis es importante el desarrollo de nuevos inmunogenos que pueda inducir una protección adecuada al ganado vacuno contra la infección y el aborto, y que además los anticuerpos puedan ser diferenciados de la respuesta inducida por las cepas virulentas de campo de *Brucella abortus* en las pruebas serológicas normales usadas para el diagnóstico. (17).

La actual vacuna de *B. abortus* cepa 19 induce protección adecuada, pero induce anticuerpos en el ganado que interfieren con el diagnóstico, puede causar aborto en ganado gestante al utilizar la dosis clásica y es patógena para el ser humano. (17).

Para que no existan problemas en los diagnósticos post-vacunales, la vacuna contra *Brucella* no debe reaccionar en las actuales pruebas serológicas, todas ellas usan el lipopolisacárido como antígeno para la reacción, (17).

Una alternativa es que, la vacuna sea un mutante rugoso de *B. abortus*, la cual al carecer de la cadena-O lipopolisacárida evita la seroconversión, además solo sobrevive un período relativamente corto dentro del animal, (2).

La corta sobrevivencia de esta cepa en los bovinos puede explicarse parcialmente por lo referido por Price y col., (1990), que reportan que el lipopolisacárido "S" (smooth o liso), presente en el género *Brucella*, como un factor de sobrevivencia principalmente al proceso de fagocitosis, debido a que observaron una reducción de la virulencia en las cepas mutantes rugosas in

vítro, utilizando macrofagos mamarios de bovinos, estos autores evaluaron en su estudio las cepas: *B. abortus* lisa 2308, mutante rugosa RB51, cepa vacunal 19 y dos mutantes por transposición derivados de la cepa 19. (38).

Es conocida la persistencia de microorganismos vivos de la cepa vacunal 19 en los bovinos y por lo tanto una potencial infección, afectando principalmente la placenta y el feto resultando un elevado riesgo para los demás animales y para el humano, (17). De esta forma, al ser rugosa, la cepa vacunal es eliminada poco tiempo después de su inoculación, sin inducir anticuerpos que interfirieran en las pruebas oficiales para el diagnóstico de la brucelosis bovina, y resultando menos infectiva para los demás animales y el hombre.

Schurig y col., (1991), inocularon medios de cultivo con la cepa mutante rugosa RB51, y observaron que el microorganismo es altamente estable *in vitro* y no presentaba reversión a la morfología lisa, paralelamente, inocularon animales de laboratorio y ganado vacuno, observando que la cepa es altamente atenuada y no presentaba reversión a la virulencia debido a que los animales no mostraron algún signo clínico de la enfermedad exceptuando un escaso incremento en la temperatura corporal durante los primeros días post-inoculación, y a la necropsia de estos animales, observaron pocas lesiones tisulares, (44).

Adams y col., (1990), inoculando cabras con dos mutantes rugosos de *B. abortus*, reportan que las cepas no fueron detectadas en orina, heces, saliva, sangre o lágrimas por 120 días post-inoculación, y que no se aislaron las cepas mutantes de los tejidos del sistema reproductor y linfático tomadas al

sacrificio de estos animales, (2).

Tobías y col., (1992), inoculando ratones gestantes con la cepa vacunal 19 a una dosis de  $1 \times 10^7$  UFC, reportan lesiones presentes de una severa placentitis necro-supurativa acompañada con muerte fetal, (49). Por su parte, Roop II y col., (1991), inocularon un total de 100 cabras gestantes con la cepa rugosa mutante RB51 a una dosis de  $1 \times 10^8$  UFC, observando la presencia de una leve placentitis y ausencia de muerte fetal. Posteriormente, inocularon cabras gestantes *in útero* a una dosis de  $1 \times 10^8$  UFC de la cepa rugosa mutante RB51, y observaron que a esta dosis, dicha cepa puede llegar a ser infectiva pero no causa aborto, (41).

Aparte del principal determinante antigénico que es el lipopolisacárido (LPS), existen proteínas de la membrana externa, y hapteno nativo de *B. abortus* que funcionan como determinantes antigénicos, (19). Para la vacunación con la cepa mutante rugosa por transposición, los anticuerpos específicos para las estructuras superficiales del microorganismo pueden ser detectados a través de pruebas diagnósticas experimentales como ELISA Indirecto y aglutinación lenta en tubo empleando como antígeno, cultivos inactivados de la cepa vacunal, (17).

Con base a los resultados de este estudio, se observó en ambas pruebas que la cima de títulos de anticuerpos se presentó a las 4 semanas post-vacunación decreciendo los títulos hasta casi desaparecer en el último muestreo sanguíneo, (270 días post-vacunación). Esto se asemeja a los resultados que reportan Cheville y col., (1993) al inocular 24 novillas de 10 meses de edad con varias cepas mutantes de *B. abortus*, donde al

cuantificar los títulos de anticuerpos con la prueba de aglutinación en tubo, detectaron el mayor título a las 4 semanas post-vacunación, (17).

Como reportan Blasco y col., (1995), la prueba de intradermoreacción evaluada en ovejas infectadas y no vacunadas comparada con las pruebas de ELISA, tarjeta y fijación del complemento, obtuvo una sensibilidad y especificidad solo menor que la prueba de ELISA y mayor a las otras: como también reportan Bercovich y col., (1990), que evalúan la prueba de intradermoreacción en ganado vacuno positivo, negativo y sospechoso junto con la prueba de fijación del complemento, prueba de aglutinación en tubo y prueba de anillo en leche, la encuentran como una prueba muy sensible y bastante específica para el diagnóstico, (8, 9).

En este trabajo fue utilizada la prueba de intradermoreacción para evaluar la respuesta celular inducida por la vacunación, debido a que las brucelas tienen la característica de ser microorganismos intracelulares facultativos, se le concede un papel más preponderante a la inmunidad mediada por células inmunocompetentes inducida por la vacunación, se obtuvo un 100% de positividad, teniendo en cuenta que los animales previamente se comprobaron que fueran negativos a la serología diagnóstica y a que se aplicó el mismo brucellergeno (extracto proteico de *Brucella*) a un grupo control negativo, (un grupo de 10 bovinos machos negativos a la serología diagnóstica).

En su estudio, Cheville y col., (1993), vacunaron a 24 novillas a los 10 meses de edad, con las cepas de *B. abortus*: Cepa 19, cepa RB51 y dos mutantes por transposición, aplicaron al ganado la brucelinización, antes y después de la vacunación,

obteniendo solo reactividad cutánea a la brucelina (extracto proteico de *Brucella*) después de la vacunación, y siendo las novillas libres de evidencia serológica contra *Brucella*, (17).

En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó un comportamiento serológico parecido al producido por la vacunación con cepa 19, (14), teniendo en consideración que en este estudio se utilizaron sólo 5 diluciones de los sueros para la prueba de aglutinación lenta en tubo, por lo que no se pudo cuantificar en un título mayor, como lo observado en la gráfica de la vacunación con cepa 19, además se observa que el descenso de anticuerpos es similar entre ambas vacunas.

En base a estos mismos resultados obtenidos, se observó que los sueros de los animales vacunados con la cepa mutante no presentaron reacción alguna en las pruebas serológicas rutinarias el diagnóstico de las brucelas lisas en todo el transcurso del estudio, por lo que se deduce que la vacunación con la cepa rugosa mutante no induce anticuerpos que interfieran en el diagnóstico, el hecho de que tampoco se presentaron animales seropositivos podría ser un parámetro para indicar que esta vacuna indujo una respuesta inmune adecuada confiriendo protección a los animales vacunados, cabe mencionar que dichos animales estuvieron en un desafío natural de la enfermedad, como demuestra el hecho de que se logró aislar el microorganismo a partir de muestras de leche de 6 animales vacunados pertenecientes al hato e identificarlo como una cepa de campo, por lo que el grupo vacunado estuvo ante un elevado riesgo de infección por el microorganismo. Además que todos estos animales quedaron gestantes y parieron normalmente, sin ningún caso de

aborto, además es importante señalar que la inmunidad celular contra la brucela juega un papel muy importante en la protección, por lo que al haberse presentado un 100% de positividad en la brucelinización en el grupo vacunado (a los 12 meses post-vacunación, se deduce que la vacunación estimuló una adecuada inmunidad celular, esto se confirma por el hecho de que los animales antes de la aplicación del brucellergeno (extracto proteico de *Brucella*), fueron evaluados para confirmar que fueran negativos a las pruebas serológicas.

Estos resultados se asemejan a los encontrados por Cheville y col., (1992), que vacunaron ganado vacuno adulto con la cepa rugosa RB51 utilizando las vías subcutánea y conjuntival, y posteriormente desafiándolos con la cepa virulenta 2308, obteniendo que solo dos de los 20 animales vacunados, abortaron después del desafío, con la gran diferencia de que en el caso del presente trabajo, el desafío se dio en forma natural ya que la enfermedad era endoótica en el hato al que pertenecían los animales.

Además señalan que después de la inmunización con la cepa RB51, las pruebas de tarjeta, aglutinación en tubo, rivanol, 2-mercaptaetanol y fijación del complemento dan resultado negativo a pesar de la vía de inoculación, dosis y frecuencia de inmunizaciones con la cepa RB51 de *B. abortus*; por lo que la detección de cualquier anticuerpo anti-LPS liso por estas pruebas en el ganado vacuno, es indicativo de una infección de campo con *B. abortus*, (16).

Otro estudio realizado por Cheville y col., (1993), donde inocularon 24 novillas Polled Hereford de 10 meses de edad,

utilizando las cepas de *B. abortus*: Cepa 19 (n=6), cepa RB51 (n=4) y dos mutantes por transposición derivados de la cepa vacunal 19 (4 novilla por cepa) a una dosis total de 1 a  $1.4 \times 10^{10}$  a cada novilla, así como 6 animales control inoculados con solución salina, todas por la vía subcutánea, y emplearon las pruebas de aglutinación en tubo, tarjeta, ELISA, Inmunohistoquímica.

En este mismo trabajo, las novillas fueron probadas con la brucelinización antes y después de la vacunación, posteriormente fueron desafiadas al quinto mes de gestación con la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, a una dosis de  $1 \times 10^7$  UFC en 100  $\mu$ l de solución salina, por vía conjuntival. Observaron que todas las novillas fueron libres de evidencia serológica después de la vacunación con la cepa RB51 a la serología diagnóstica convencional. Para todas las cepas utilizadas, se obtuvo la cima de títulos de anticuerpos a las 4 semanas post-inoculación que descendió hasta casi desaparecer al momento del desafío, (5o. mes de gestación). En comparación con los resultados de este estudio, en donde se encontró la cima de títulos a las 4 semanas decreciendo hasta casi desaparecer a los 270 días post-vacunación.

La reactividad cutánea a la brucelina (extracto proteico de *Brucella*) no fue observada en alguna novilla antes de la vacunación, todas las novillas eran negativas a la brucelosis antes de la vacunación.

Todas las novillas vacunadas fueron protegidas contra el aborto y parieron normalmente crías sanas, en el grupo control (n=6), 3 novillas abortaron y una novilla parió una cría débil,

pequeña y prematura, el aborto ocurrió en un período de 3 días post-desafío. Finalmente, inmediatamente después del parto o del aborto, todas las vacas y crías fueron sacrificadas para obtener muestras de linfonodos, sangre, pulmón, contenido gástrico, placenta, bazo, glándula mamaria, aparato reproductor para realizar el análisis bacteriológico y el examen histopatológico.

De los grupos vacunados de vacas y crías, no se aisló la cepa de desafío, así como se conservaron los tejidos sin alteraciones histológicas. En las novillas que abortaron fueron altamente infectados los tejidos reproductivos, linfonodos y glándula mamaria así como presentaron lesiones severas en estos tejidos en el examen histológico. Las novillas control que no abortaron no tuvieron evidencia serológica ni cultivo de la cepa de desafío posterior al parto, (17).

Enright y col., (21), inocularon un total de 10 vacas adultas por vía oral con la cepa rugosa RB51, y posteriormente desafiadas en el segundo tercio de gestación con la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, ellos encontraron que solo dos de los 10 animales vacunados abortaron después del desafío.

En su estudio, Soberón y col., (1996), vacunaron 15 cabras adultas, negativas a *Brucella*, a una dosis de  $4 \times 10^{10}$  UFC/ml, por vía subcutánea y mantuvieron sin vacunar a 10 cabras como control. Se realizaron muestreos sanguíneos periódicos para estudios serológicos y se sometieron las 25 cabras a desafío, a los 51 y 96 días post-vacunación con una cepa de campo de *B. melitensis* a una dosis de  $9 \times 10^5$  UFC, por vía conjuntival. Posteriormente, sacrificaron los animales a los 45 días después del segundo desafío y se recolectaron muestras de útero, glándula

mamaria, bazo, linfonódulos (submandibular, preescapular y retromamario) para su estudio bacteriológico. La cepa de desafío fue aislada solamente de una de las 15 cabras vacunadas (6.6%), y de 6 de las 10 cabras no vacunadas, que corresponden al 60% (46).

Conjuntando los resultados de este estudio con los resultados de otros autores, se observa que la vacunación del ganado vacuno utilizando cepas mutantes rugosas de *B. abortus* reúne características valiosas para solventar los problemas en el diagnóstico presentes por la vacuna actual, a pesar de que la mayoría de los estudios se refieren a la cepa rugosa RB51, la cepa rugosa mutante por transposición da resultados similares a la RB51, por lo que se debe considerar como otra opción a estudiar para encontrar la vacuna ideal.

## CONCLUSIONES .

Al término del presente trabajo, se concluyó lo siguiente:

1.- La vacuna rugosa mutante por transposición es capaz de inducir respuesta humoral y celular, como se pudo comprobar con las pruebas serológicas experimentales utilizadas, así como, por la prueba de intradermoreacción.

2.- Debido a que no se presentaron casos de la enfermedad en las becerras inmunizadas en más de dos años después de la vacunación a pesar de haber estado en un elevado riesgo de infección por ser enzootica la brucelosis en el hato, se concluye que esta vacuna parece conferir una adecuada protección a los animales vacunados.

3.- Esta vacuna no induce anticuerpos que puedan ser detectados mediante las pruebas oficiales para el diagnóstico de la brucelosis bovina, (tarjeta, rivanol y fijación del complemento) con antígenos producidos a partir de brucelas lisas.

4.- Se logró la estandarización de la prueba de aglutinación lenta en tubo y ELISA indirecto empleando un antígeno rugoso, para evaluar la presencia de anticuerpos contra la cepa vacunal.

**ANEXO. CARACTERES DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO BRUCELLA SPP. Y SUS BIOTIPOS.\***

ESPECIE	BIOTIPO	H <sub>2</sub> S	UREA	TIONINA 1/25.000	TIONINA 1/50.000	TIONINA 1/100.000	FUCSINA 1/50.000	FUCSINA 1/100.000	ANTISUELO A	ANTISUELO M
<i>B. melitensis.</i>	1	(-)	V	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
	2	(-)	V	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	3	(-)	V	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>B. abortus.</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
	2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
	5	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
	6	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	7	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	8	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	9	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>B. suis.</i>	1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
	2	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
	3	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
	4	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>B. neotomas.</i>	1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
<i>B. ovis.</i>	1	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
<i>B. canis.</i>	1	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)

V=Variable.

\* Basado en Alton, (7).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

#### BIBLIOGRAFÍA.

1. Abeledo, M.A.A., 1982. Eficacia comparativa entre diferentes métodos serológicos para el diagnóstico de la Brucelosis bovina.
2. Adams Garry L., 1990. *Advances in Brucellosis Research*. Texas A&M. University Press.
3. Alfonseca, S.E., Díaz, A.E., Hernández, A.L., y Suárez, G.F., 1995. Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en diferentes grupos de bovinos. Anuario de la "Reunión Nacional de Investigación Pecuaria", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., 25, p.p. 46.
4. Alton, G.G., Jones, L.M. y Pietz, D.F., 1975. Laboratory techniques in Brucellosis. *World Health Organization*, Génova.
5. Alton, G.G., Jones, L.M., 1976. Las técnicas de Laboratorios en la Brucelosis. *Instituto Nacional del Departamento de Agricultura*, Ginebra.
6. Alton, G.G., 1981. La lucha contra la Brucelosis bovina; Acontecimientos recientes. *Rev. Mun. de Zoot*, No. 39.
7. Alton, G.G., 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory. *Inst. Nal. de la Recherche Agronomique*, Paris.
8. Bercovich, Z., and Ter Laak, E.A., 1990. An evaluation of delayed-type hypersensitivity test for diagnosing brucellosis in individual cattle: a field study. *Vet. Microbiol.* 22, p.p. 241-248.
9. Blasco, J.M., Marin, C., Jiménez de Bagüés M., Barberán, M., Hernández, A., Molina, L., Velasco, J., Díaz, R., and Moriyón, I., 1995. Evaluation of allergic and serological test for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. *Depto de*

*Sanidad Animal Y Depto de Microbiología, Universidad de Navarra, España.*

10. Brock, D. Thomas, Madigan, T. Michael, 1993. Microbiología. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A, México, D.F, p.p. 284-288.
11. Campos López H., 1993. La Salud Animal en México. Informe Anual de la Dirección General de Salud Animal, D.G.S.A, SARH, México, 1994.
12. CENID-Microbiología, 1994. Memorias del Curso Teórico Práctico de diagnóstico de Brucelosis animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
13. Ciprián Carrasco Abel, Rodríguez Villela Martha, Mendoza Elvira Susana, 1990. Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas, Material para Actualización Técnica en brucelosis y tuberculosis bovina, diagnóstico serológico de brucelosis y su interpretación. Edit. SARH, p.p. 59, 61 y 70.
14. CONETB-SAGAR, FEDMVZ, 1995. Manual de Actualización Técnica para la aprobación del Médico Veterinario en Tuberculosis Bovina y Brucelosis. Comisión Nacional para la erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis, Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México, A.C.
15. Cunningham, B., Miler, J.J., Dolan, L., Mckee, F., and O'Meara, M., 1980. Immunological characteristic in cattle of allergens derived from smooth *Brucella abortus* S-99. Vet. Rec., 107, p.p. 369-375.

16. Cheville, N.F., Jensen, A.E., Halling, S.M., Tatum, F.M., Morfitt, D.C., Hennager, S.G., Frerichs, W.M., and Schurig, G.G., 1992. Bacterial survival, lymph node changes, and immunological responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *B. abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 53, p.p. 1881-1888.
17. Cheville, N. F., Stevens, M. G., Jensen, A. E., Tatum, F. M., Halling, S. M., 1993. Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *B. abortus*. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 54. No. 10.
18. Díaz Aparicio Efrén, 1993. Diagnóstico serológico de la Brucelosis Caprina. Tesis de Doctorado, *Universidad de Navarra, España*. p.p. 13-16.
19. Díaz, G., Toyos, J., Salvo, M.D., Fernández-Lago, L., Alonso, B., Moriyón, I. and Dorronsoro, I., 1984. Studies on the polysaccharide B and native hapten of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 9. *Develop. Biol. Standard.* 56, 213-220 p.p.
20. Díaz, R.L.M., Jones, D. Leons and Wilson, J.B., 1968. Surface antigens of smooth *Brucellae*. *J. Bact.* p.p. 893-901.
21. Enright, F., Boyle, S., Schurig, G. G., Sriranganathan, N., Toth, T., Kopec, J. *Brucella abortus* strain RB51: A promising vaccine candidate for Brucella eradication programs. (artículo en preparación).
22. Flores Castro R., 1992. Uso de la vacuna elaborada con cepa 19 en dosis reducida, para el control de la brucelosis en la República Mexicana. Memorias del Simposium Internacional de Medicina Preventiva, UANL, p.p. 23-28.

23. García-Carrillo, C., 1980. Comparison of *B. melitensis* Rev 1 and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against Brucellosis in cattle. *Zentralbl. Vet. Med.*, p.p. 131.
24. Gurría T.F., 1993. Memoria de la " Primera Reunión Anual del Consejo Nacional de Sanidad Animal". *Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina y la Brucelosis en México.*
25. Ivanov, M.M., Taramaishuili, M.E., 1971. Vaccination of goats against Brucellosis. *Vet. (Moscow)*, p.p. 48-49.
26. Koneman, W.E., 1984. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. *Ed. Médica Panamericana, S.A.* Buenos Aires, Argentina, p.p. 200-255.
27. MacDiarmid, S.C., and Hellstrom, J.S., 1987. An intradermal test for the diagnosis of brucellosis in extensively managed cattle herds. *Prev. Vet. Med.*, 4, p.p. 361-369.
28. Montaraz, J.A., and Winter, A.J., 1986. Comparison of living and nonliving vaccines for *B. abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 53, p.p. 245-251.
29. Morilla González Antonio, 1989. *Inmunología Veterinaria. Ed. Diana S.A.* México, D.F. p.p. 509.
30. Moyer, N.P., y Hausler, W.J., 1991. The genus *Brucella* in the prokaryotes. V. 3, 2a ed, *Editor. Albert Balows y col.* N.Y. p.p. 2384-2400.
31. Nicoletti, P., 1976. The effects of adult cattle vaccination with strain 19 on the incidence de Brucellosis in dairy herds in Florida and Puerto Rico. *Proceedings of the 83rd Annual Meeting. US Animal Health Association.* p.p. 83.
32. Nicoletti, P., 1978. Control de la Brucelosis con énfasis en la vacunación de ganado adulto en Foro Nacional sobre Brucelosis.

INIP-ENEP. Memorias. p.p. 106-109.

33. Nicoletti, P., 1990. Vaccination against *Brucella*. In bacterial vaccines. Alan. R. Liss Inc, USA. p.p. 147-168.
34. Nilsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Nicoletti, P., y Kelly, W. Improved competitive enzima inmuno for the diagnosis of bovine brucellosis, (artículo en preparación).
35. OMS/FAO, 1982. Zoonosis bacterianas y víricas. Informe de un Comité de Expertos de la OMS con participación de la FAO. Series de Informes Técnicos. No. 682. Impreso en España.
36. Orlov, E.S., Vlassevich, P.S., and Ivanov, M.M., 1965. Duration of immunity in sheep inoculated with *B. abortus* strain 19 or *B. melitensis* strain Rev 1 vaccines. Trudy vsrs. Inst. Eksp. Vet. p.p. 3-7.
37. Plommet M., 1986. Control y profilaxis. En "Brucelosis bovina", *Bovis*, Madrid, p.p. 71-78.
38. Price R. E., Templeton T. W., and Adams L. G., 1990. Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 26, p.p. 353-365.
39. Ruiz-Castañeda, M., 1986. Brucelosis. Ed. La Prensa Médica Mexicana, 3a ed. México, D.F.
40. Rodríguez H.G.A., 1978. Epizootiología de la Brucelosis. Memorias del "Foro Nacional sobre Brucelosis". México. p.p. 26-28.
41. Roop II, R.M., Jeffers, G., Bagchi, T., Walker, J., Enright, F.M., and Schurig, G.G., 1991. Experimental infection of goat fetuses in utero with a stable, rough mutant of *B. abortus*. *Res. Vet. Science.* 51, p.p. 123-127.

42. Scanlan Ch. M., 1988. Introducción a la Bacteriología Veterinaria. Ed. Acribia S.A, Zaragoza, España, p.p. 315-322.
43. Schurig, G.G., Pringle, A.T. and Breese Jr, J.R., 1981. Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus* infected cattle. *Infect. Immun.* p.p. 1000-1007.
44. Schurig, G.G., Roop II R.M., Bagchi T., Boyle S., Buhram D., and Sriranganathan N., 1991. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *B. abortus*. *Vet. Microbiol.* 28, p.p. 171-188.
45. Smith, L.D., Heffron, F., 1987. Transposon mutagenesis of *B. abortus*. *Infect. Immun.*, p.p. 2774-2776.
46. Soberón, M.A., Maldonado, E., Díaz, A.E., Hernández, A.L., Suárez, G.F., 1996. Evaluación de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en cabras adultas. Memorias de la "Reunión Nacional de Investigación Pecuaria". Morelos, p.p. 47.
47. Stenshorn, B.W., 1984. Recent progress in the diagnosis of brucellosis. *Develop. Biol. Standard.*, 56, p.p. 325-340.
48. Tizard, I., 1995. Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana, 4a ed. México, D.F.
49. Tobías, L., Schurig, G.G. and Cordes, D.O., 1992. Comparative behavior of *Brucella abortus* strain 19 and RB51 in the pregnant mouse. *Res. Vet. Science.* p.p. 175-183.
50. Valero G., 1993. Diagnóstico Veterinario. Requisitos, proceso, interpretación, ventajas y desventajas de técnicas diagnósticas. *Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.*, México, D.F.