

31



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**"EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE  
EN BECERRAS DE LA RAZA HOLSTEIN  
VACUNADAS CON LA CEPA RB51 DE  
*Brucella abortus*"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A:  
**MARISELA LEAL HERNANDEZ**

ASESORES:

DR. EFREN DIAZ APARICIO  
MVZ RAFAEL PEREZ GONZALEZ  
MVZ ROSA MARIA REYES PALACIOS

279515



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

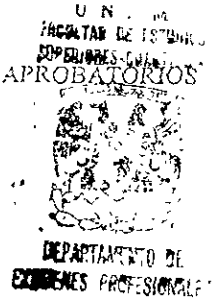
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

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

ASUNTO VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. de/ Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

De acuerdo con el Art. 23 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted  
los datos de la TESIS.

" Evaluación de la respuesta inmune en becerras de la raza holstein,  
vacunadas con la cepa RB51 de Brucella abortus".

Realizada por la pasante Marisela Leal Hernández.

Identificación de cuenta 9102021-5 para obtener el TITULO de:  
Medica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlan Izcahil, Edo de Méx, a 15 de diciembre de 1989

PRESIDENTE

MVZ. Rafael Pérez González

VOCAL

MVZ. Martha Elizabeth Pérez Arias

SECRETARIO

MVZ. Raúl Radillo Rodríguez.

PRIMER SUPLENTE

MVZ. Francisco Morales Alvarez.

SEGUNDO SUPLENTE

IAZ. Jesús Guevara González.

EMPEÑARSE EN ALCANZAR  
EL ÉXITO  
SIN ESFORZARSE,  
ES COMO  
PRETENDER COSECHAR  
EN DONDE NO SE  
HA SEMBRADO.

## DEDICATORIAS

- ❖ A mis padres quienes me brindaron la oportunidad y la confianza para poder estudiar y ser alguien en la vida y por todo su amor que me han dado.
- ❖ A mis hermanas Cecy por ser un ejemplo a seguir, Blanca por todo lo que me aguanta a lme por todo su gran paciencia y corazón.
- ❖ A mis hermanos Fernando y Angel que ha sido un reto poder convivir con ustedes y Sergio gracias por formar parte de esta familia y el más reciente miembro mi pequeñísimo sobrino.
- ❖ A Wilfrido por que sin tu apoyo no hubiese sido tan fácil lograr muchas cosas que tengo hasta hoy.

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis asesores que siempre me tuvieron la paciencia para seguir con este trabajo.
- ❖ Al MVZ. Rafael Pérez por todo el apoyo y confianza que me ha brindado desde el día en que empezamos a trabajar en equipo.
- ❖ Al Dr. Efrén Díaz por su apoyo y gran paciencia que siempre ha tenido para explicarme las cosas.
- ❖ A la MVZ. Rosa María y Lulú Reyes por haberme invitado a participar en este proyecto.
- ❖ A mis sinodales por haberse tomado la molestia de revisar este trabajo y hacerme las correcciones oportunas para mejorar la calidad de este trabajo.
- ❖ Al MC Francisco Morales por sus comentarios oportunos para poder seguir con mi trabajo.
- ❖ A todas las personas que trabajan en el departamento de Bacteriología del CENID-Microbiología (Vicky, Magy, Olga, Dra. Laura H, Dra. Laura J, Dra. Bety, Dra. Lulú, Dr. Aguilar, Dr. Mancera y al Dr. Víctor) por ayudarme a trabajar con entusiasmo.
- ❖ A mis compañeros de clase y de generación por que siempre permitieron una competencia sana y a todos mis profesores por que fueron la base al compartir sus conocimientos para que saliera adelante.
- ❖ A el propietario de las vacas de este trabajo, sin las cuales no se hubiese podido realizar.

# ÍNDICE

## RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

Historia	1
Características del agente	2
Importancia económica	5
Epidemiología	6
Salud pública	6
Transmisión	7
Patogenia y signos clínicos	8
Inmunología	11
Diagnóstico	19
Prevención y control	22

## OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
-----------------------	----

MATERIAL Y MÉTODO	29
-------------------	----

RESULTADOS	35
------------	----

DISCUSIÓN	37
-----------	----

CONCLUSIONES	42
--------------	----

ANEXOS	44
--------	----

LITERATURA CITADA	48
-------------------	----

## RESUMEN

La cadena O del lipopolisacárido (LPS) desempeña un papel central en el diagnóstico serológico de la brucelosis, debido a que es un antígeno inmunodominante capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en la mayoría de animales expuestos a brucelas lisas. Las pruebas serológicas para la brucelosis se basan en la detección de anticuerpos dirigidos hacia la cadena O. Desde hace varios años se han evaluado vacunas mutantes de *Brucella abortus* que carecen de la cadena O, por lo que los anticuerpos inducidos por estas no son detectados por pruebas de diagnóstico rutinario, como son la prueba de tarjeta, rivanol y fijación del complemento. Los objetivos del presente trabajo fueron: El evaluar la respuesta inmune en becerras vacunadas con la cepa rugosa RB51 de *B. abortus*, mediante las pruebas serológicas rutinarias; determinar la presencia de anticuerpos contra la cepa vacunal mediante la prueba de aglutinación lenta en tubo con antígeno rugoso y evaluar la respuesta inmune celular de las becerras vacunadas mediante la prueba de intradermorreacción. Se trabajó con 45 becerras de tres a seis meses de edad seronegativas a brucelosis, provenientes de Tizayuca Hidalgo, México. Las becerras permanecieron alojadas en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Se vacunaron 35 becerras por vía subcutánea con dosis  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml y diez becerras fueron el grupo testigo negativo. Se realizaron muestreos serológicos periódicos durante 405 días posvacunación, para realizar pruebas para detectar anticuerpos contra brucelas lisas y se realizó la prueba de aglutinación lenta en tubo con antígeno rugoso. A los 405 días posvacunación se realizó la prueba de intradermorreacción con el "brucellergeno". Los resultados de las pruebas serológicas para brucelas lisas en los animales vacunados, fueron 100% negativos del día 0 al 120, el día 150 se encontró el 2.8% de positivos, el día 180 el 5.7% y de los días 210 al 405 el 8.5% de positivos. De los sueros que fueron positivos a tarjeta, se les realizaron pruebas complementarias en donde se obtuvieron resultados negativos. En la prueba de aglutinación lenta en tubo los resultados fueron negativos en su totalidad. El 91% dio reacción positiva al "brucellergeno". Se concluye que la respuesta serológica inducida por la vacunación con RB51, no interfiere con las pruebas que utilizan antígenos de cepas lisas. La seroconversión observada en algunos de los animales, pueden deberse a una infección de campo o a una reacción cruzada. La respuesta al "brucellergeno" sugiere una buena respuesta de inmunidad celular.



## INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano que afecta a los animales mamíferos domésticos y silvestres, es una de las zoonosis difundida ampliamente en el mundo <sup>30,43</sup> Produce pérdidas económicas cuantiosas para el sector pecuario, siendo estos efectos particularmente apreciables en los países en vías de desarrollo debido a que afecta la reproducción y la productividad en los animales <sup>6,43</sup>. Es una causa importante de fracaso reproductivo en los animales domésticos, ya que ocasiona aborto e infertilidad. disminuye la producción láctea e interfiere con los programas genéticos <sup>16,30</sup> A esta enfermedad en el humano se le conoce como: "Fiebre del mediterráneo", "Fiebre de malta", "Septicemia de Bruce" y "Fiebre ondulante"; y en los animales se le conoce como: "Enfermedad de Bang", "Aborto contagioso" y "Aborto infeccioso"<sup>16</sup>

## HISTORIA

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*. La tercera especie de la brucelosis fue aislada por Traum en 1914 y 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 1968 fueron los primeros en reconocer infecciones en perros causadas por *Brucella canis*<sup>1,32</sup>.

Se tienen antecedentes de que el primer diagnóstico de brucelosis humana fue en 1905. En 1923 se aisló por primera vez *Brucella melitensis*. Para 1945 en México se tenía un registro de 1432 casos de brucelosis humana en 21 de las 32 entidades federativas.

Debido al impacto que tiene la enfermedad sobre la población humana, en México se llevó a cabo una encuesta serológica, para determinar la prevalencia de la brucelosis bovina en 1952. En 1970 se puso en marcha un programa permanente, que tomó carácter oficial en 1981 estableciéndose la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. En septiembre de 1993, se forma la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis (CONETEB), que da lugar a la campaña contra la brucelosis, que planificada en varias etapas propone como estrategia hacer más efectiva y expedita la constatación de hatos libres. Pero es hasta 1996 que se publica la Norma Oficial Mexicana (NOM) para regularla<sup>16,30,31,36</sup>.

## **CARACTERISTICAS DEL AGENTE**

Los organismos del género *Brucella* son cocobacilos, con un tamaño de 0.6 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$  de ancho. Por lo general aparecen aislados o en pares, pero a veces se ven en cadenas cortas o en grupos, son gram negativas, no tienen cápsula, son inmóviles. Es un patógeno intracelular facultativo.

ya que se multiplica en los fagocitos del sistema inmune. Se tiñen de rojo con el método de Macchiavello y con el método de Ziehl Neelsen modificado. El género *Brucella* no se desarrolla en medios de cultivo que contengan solamente peptonas; se requiere triptosa o tripteína y algunas veces suplementos tales como infusión de hígado, suero de bovino o hidrolizado de levadura<sup>23,36</sup>.

Las brucelas pueden permanecer viables en la orina, leche, agua y en tierra húmeda hasta por cuatro meses. Resisten la congelación (hasta -70° C con una sustancia de soporte) y descongelación pero son destruidas por las temperaturas de pasteurización y calentamiento a 60° C durante 10 minutos, por desinfectantes como el fenol, formol y cloro. *In vitro* puede variar su sensibilidad a los antibióticos, pero generalmente la afectan la estreptomycin, eritromicina y tetraciclinas<sup>21,23</sup>.

Existen seis especies de *Brucella* asociadas a sus reservorios naturales: *Brucella abortus* en bovinos, *B. suis* en cerdos, *B. melitensis* en caprinos, *B. ovis* en ovinos, *B. canis* en perros, *B. neotomae* en rata del desierto, y también se ha encontrado *B. maris* en mamíferos marinos. Sin embargo se sabe que no son específicos de estas especies y que otras especies se pueden contagiar si llegan a estar en contacto con tejidos o material contaminado de animales infectados<sup>1,16,41</sup>.

## CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS BRUCELAS

Las bacterias del género *Brucella* poseen una envoltura celular compleja formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. La membrana externa esta en contacto con el medio y

contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) <sup>24 25</sup>

El LPS es el antígeno inmunodominante de la superficie de las brucelas lisas consta de un lípido A, insertado en la membrana externa y no expuesto a la superficie, y otra región polisacarídica dirigida hacia el exterior. Se acostumbra dividir a la parte polisacarídica en dos secciones: el núcleo, más interno y la cadena "O". Existen mutantes rugosos (R), de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, en los cuales se pierde la cadena "O", e incluso parte del núcleo, como consecuencia de la mutación. Hay especies como *B. ovis* y *B. canis* que carecen de la cadena "O" auténtica en comparación con las especies típicamente lisas (L) como son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*. El LPS de las especies naturalmente rugosas, así como el de las mutantes mencionadas conservan partes en común con las especies lisas. A pesar de ello, una reacción cruzada entre LPS liso y rugoso no se observa con frecuencia <sup>24 25</sup>

La cadena "O" del LPS-L es inmunodominante en las infecciones naturales o experimentales por especies lisas de *Brucella*, así como en la vacunación con la cepa 19 y Rev 1, o en la inmunización con células muertas o fracciones que contengan LPS-L. Los anticuerpos frente a la cadena O pueden ser detectados con suspensiones celulares en fase lisa o preparaciones enriquecidas en LPS-L.

En las pruebas de diagnóstico se pueden detectar anticuerpos frente al LPS-L que sean debidos a infecciones por bacterias como *Yersinia enterocolitica* 0 9 *Salmonella* grupo N (0.30), *Vibrio cholerae*, *Escherichia hermanni*, *E. coli* 0157, *Franciella tularensis* y *Pseudomonas maltophilia*, cuyos LPS dan reacción cruzada con el LPS del género *Brucella* <sup>1 24 25</sup>.

## IMPORTANCIA ECONOMICA

La importancia económica que representa la brucelosis está dada por las pérdidas que ocasiona en los animales productivos, al causar abortos, infertilidad, esterilidad, disminución de la producción de leche entre el 10-20% e interrupción de los programas genéticos, depreciación de los animales enfermos y retraso en el crecimiento entre otros <sup>2</sup>.

Debido a lo anterior algunos investigadores han clasificado las pérdidas que causa la brucelosis de la siguiente manera:

- ◆ **Pérdidas directas aparentes:** Pérdida del becerro ocasionada por el aborto, problemas reproductivos (retención placentaria, esterilidad temporal ó permanente), disminución de la producción láctea en un 20% causada por el aborto o efecto indirecto de la infertilidad, incremento de las crías muertas de los animales de reemplazo en los hatos infectados. Gastos de asistencia del médico veterinario <sup>21</sup>.
- ◆ **Pérdidas directas no aparentes:** Reducción del valor comercial del ganado infectado, retraso en el crecimiento, pérdida de peso, interrupción de las líneas genéticas en los hatos infectados <sup>21</sup>.
- ◆ **Pérdidas indirectas consecutivas:** Por sus efectos sobre la salud pública, ocasionados por ausentismo, gastos médicos, disminución de la capacidad laboral y puede ocasionar la muerte <sup>21</sup>.

## **EPIDEMIOLOGIA**

Es una enfermedad que es considerada de distribución mundial. Sin embargo, en algunos países los programas de control y erradicación, han permitido la eliminación total, como es el caso de Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia; o bien reducir considerablemente su incidencia, como es el caso de Japón, Nueva Zelanda, Australia y Alemania. En México existen unos 38 millones de cabezas de ganado bovino, caprino y ovino que en caso de no tener las medidas preventivas mínimas son susceptibles de contraer la enfermedad, esto para la ganadería nacional representa una pérdida de 22 millones de pesos anuales, sin considerar las mermas en leche y los costos de tratamiento de infecciones secundarias<sup>32 49</sup>.

## **PROBLEMAS DE SALUD PUBLICA**

En México la brucelosis humana registra una tasa de morbilidad promedio de 6.98 casos por 100 000 habitantes de 1988 a 1993 con un comportamiento estable, registrándose cerca de 6000 casos por año, siendo los estados con mayor tasa de morbilidad Guanajuato, Coahuila, Nuevo León, Querétaro y Sonora<sup>32,49</sup>. La brucelosis es una de las zoonosis ampliamente difundida en el mundo y ocasiona grandes pérdidas para el sector salud. Es una enfermedad que a la fecha no es diagnosticada, ni tratada adecuadamente en muchos de los casos, ya que la sintomatología no es específica y puede ser fácilmente confundida con varias enfermedades. La infección es un evento accidental que ocurre cuando se

tiene contacto directo con sangre, tejidos o secreciones de animales enfermos, se considera una enfermedad de tipo ocupacional de alto riesgo de personas involucradas con el ganado como son pastores, ganaderos, carniceros y veterinarios, por haber estado en contacto con fuentes de infección. También las personas que trabajan en laboratorios y que sufren accidentes como autoinoculación o aspiración de aerosoles. La vía más importante de infección es la oral y en los países en donde aún no se ha logrado establecer programas de control sanitario en el consumo de productos elaborados con leche sin pasteurizar, el riesgo de contraer la enfermedad es muy elevado ya que la pueden adquirir por el consumo de leche y derivados provenientes de animales enfermos. Esta es la vía que genera más casos en México (6000 al año). Los afectados con mayor frecuencia son amas de casa, estudiantes y campesinos, y el grupo de edad entre 15 y 45 años, que es la población económicamente activa<sup>32,41,49</sup>. El período de incubación fluctúa entre 8 y 90 días, las manifestaciones clínicas se caracterizan por fiebre ondulante, sudoración profusa durante la noche, debilidad, malestar, cefaleas y dolores articulares. El microorganismo se puede localizar en hígado, bazo, médula ósea y nódulos linfáticos<sup>9,27</sup>.

## TRANSMISION

De manera natural el microorganismo logra su entrada al cuerpo del animal como resultado de la ingestión de alimento, agua y leche contaminados posterior al parto o aborto, orina de un animal infectado y también a partir de las membranas fetales, líquido amniótico, feto o heces de animales recién nacidos, la

transmisión venérea puede ocurrir pero es rara. Las brucelas pueden entrar al cuerpo a través de las mucosas, conjuntivas y laceraciones de la piel. Pueden actuar como vectores el hombre y otros animales para la diseminación de la enfermedad. Muchas vacas infectadas excretan brucelas desde el útero en parto normal en gestaciones que siguen a un aborto. el aborto se puede dar sólo una vez y después las vacas se convierten en portadoras, también se excreta en leche durante la vida productiva del animal <sup>22 23,36</sup>.

## **PATOGENIA Y SIGNOS CLINICOS**

En bovinos la infección uterina frecuentemente resulta en abortos después de los 6 meses de gestación, o en el nacimiento de becerros débiles. La retención de placentas y endometritis es común. dando como consecuencia infertilidad. Los linfonodos mamarios están frecuentemente afectados y los microorganismos se difunden en la leche. En el macho. en la mayoría de los casos la infección genital es inaparente, pero puede estar localizada en testículos, epidídimo o vesículas seminales y una secuela común es la formación de abscesos. Otros signos que se pueden presentar son anorexia, decaimiento, baja en la producción, repetición de calores y disminución de la libido. Ocasionalmente se observan higromas, artritis, adherencias y fibrosis de los testículos que causan infertilidad permanente <sup>9,10</sup>

El pronóstico no es favorable debido a que la bacteria es intracelular y por lo tanto el tratamiento es ineficiente y se recomienda el sacrificio de los animales.



La bacteria produce infecciones generalizadas con una fase de bacteremia seguida de una localización en el sistema reticuloendotelial y con frecuencia en el sistema genital y tejido mamario, con excreción en leche <sup>23</sup>.

Poco después de haber entrado en el organismo por cualquier vía, los microorganismos son ingeridos por células fagocíticas en cuyo interior sobreviven, se multiplican y son transportados a los linfonodos regionales. Allí siguen multiplicándose tras su diseminación hematológica, se localizan en los macrófagos y en el tracto reproductor cuando la hembra está preñada <sup>23</sup>.

La inducción del aborto es un ejemplo de la acción de la endotoxina, por la multiplicación abundante del microorganismo en los cotiledones placentarios, corión y líquidos fetales: su multiplicación es favorecida por la presencia de eritritol, que es un polisacárido que estimula el crecimiento de la *Brucella* <sup>23 46</sup>. En consecuencia las bacterias tienden a localizarse en estos tejidos donde las lesiones se originan en la pared del órgano provocando endometritis ulcerosa en los espacios intercotiledonarios y la destrucción de las vellosidades causando la muerte y la expulsión del feto <sup>23 39 43</sup>.

Si el animal no está preñado, la localización usual es la ubre donde se produce mastitis intersticial y afecta los linfonodos adyacentes. También se pueden localizar en hígado, pulmón, linfonodos y bazo donde se producen focos granulomatosos. Las vacas quedan infectadas de por vida, la bacteria es fácilmente fagocitada por los macrófagos, pero resiste la destrucción posterior por ser un microorganismo intracelular facultativo, permanece a salvo de los mecanismos de defensa por largos períodos de tiempo pudiéndose multiplicar dentro del fagocito, esta relación huésped - parásito es muy compleja y debido a

esto el período de incubación es variable y está influenciado por la fase de gestación, número y virulencia de las bacterias, edad y vacunaciones previas. Thomsen encontró que el período de incubación varía de cincuenta y tres días a doscientos cincuenta y tres días, la incapacidad de detectar animales infectados *en periodo de incubación*, es el problema más grave en la persistencia de la infección en los establos y de la diseminación de la misma hacia otras instalaciones <sup>11 19 28,37</sup>

A continuación se describen los principales mecanismos que utiliza la bacteria para invadir al hospedero, así como sus toxinas.

## **MECANISMOS ANTIFAGOCITICOS**

Existen diferentes formas en que las bacterias pueden evitar ser fagocitadas por las células especializadas del organismo, como son los polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos. Los mecanismos antifagocíticos pueden ser contrarrestados por el sistema inmune debido al fenómeno de opsonización. Este mecanismo consiste, en el auxilio a la fagocitosis que dan principalmente los anticuerpos y la fracción C3 del complemento. Los macrófagos y PMN, tienen en su superficie receptores específicos para la fracción C3 del complemento, los microorganismos una vez unidos a los anticuerpos o cubiertos por la fracción C3 del complemento son fácilmente fagocitados <sup>46</sup>

**Sobrevivencia a fagocitos.** Las brucelas permanecen largo tiempo, en forma intracelular, protegida del ataque directo de algunos componentes del

sistema inmunológico. Algunos de los mecanismos por los cuales estas bacterias sobreviven son:

- a) Bloqueo de la unión entre el lisosoma y el fagosoma, evitando la formación del fagolisosoma. el cual es el organelo celular donde la partícula fagocitada es digerida si esto sucede la bacteria podrá seguir multiplicándose en forma intracelular.
- b) La bacteria fagocitada puede escapar del fagosoma.
- c) Resistencia a la acción de las enzimas contenidas en los lisosomas.

**Producción de enzimas extracelulares.** La producción de enzimas extracelulares, es el mecanismo de virulencia más importante que facilita la invasividad. con enzimas como la hialuronidasa, la coagulasa, la fibrinolisisina, la colagenasa y las proteasas

**Citoadherencia.** La bacteria una vez que logró pasar las defensas del hospedero. debe adherirse a las células epiteliales. Una vez adheridas, podrán penetrar la célula y producir daño <sup>46</sup>.

## INMUNOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS

En bovinos, la diferencia entre el éxito o el fracaso de muchas explotaciones. está dada por el grado de inmunidad del hato y de la capacidad de los expertos responsables de mantener la salud de los animales mediante el diagnóstico. su utilización en la vigilancia epizootiológica y el adecuado aprovechamiento y manipulación de sus capacidades inmunológicas para la prevención de enfermedades infectocontagiosas <sup>16</sup>

El sistema inmune representa el medio para que los organismos puedan protegerse del efecto de las sustancias extrañas, reconocerlas y en su caso eliminarlas o metabolizarlas. Los mecanismos de protección son amplios y variados, comprenden la interacción de iones, moléculas, células y tejidos especializados en la inducción, regulación y expresión de la respuesta inmune

18 46

La protección de los individuos contra enfermedades infecciosas es resultado de la acción sinérgica de los mecanismos inespecíficos y específicos de defensa

En los **mecanismos inespecíficos** se incluyen las barreras anatómicas, piel por su integridad, el pH ácido, la acción germicida de los ácidos grasos, la flora normal, la descamación, el sudor y faneras. En el tracto respiratorio están los cornetes nasales, el reflejo tusígeno y el estornudo, la secreción del moco rico en lizosima. la flora normal, el aparato mucociliar y la presencia de macrófagos alveolares. El tracto gastrointestinal al nivel de la boca por el epitelio estratificado que recubre la cavidad, la presencia de lizosima, el lavado constante de la saliva y la flora normal en el estómago, el pH ácido, el reflejo del vómito y a nivel intestinal el pH propio (alcalino), el peristaltismo y la flora normal. En el tracto genitourinario el lavado continuo de la orina, el pH, la presencia de lizosima en secreciones, la microbiota normal, la presencia de espermina y espermidina. En la conjuntiva ocular al lavado continuo con las lágrimas y contenido en lizosima <sup>18,46</sup>.

Los **mecanismos específicos** de defensa están dados por el sistema inmunológico. Dentro de estos, esta la respuesta del organismo al estímulo de un agente infeccioso, el cual se comporta en este caso como antígeno, por el cual el

sistema inmune del hospedero lo reconoce como extraño y reacciona contra él, siendo ésta reacción específica ya que al entrar otro agente infeccioso antigénicamente diferente, el hospedero establece una nueva respuesta<sup>8,46</sup>.

El género *Brucella* por ser un microorganismo intracelular, es capaz de reproducirse en el medio extracelular así como en el interior de los macrófagos, esto da lugar al desarrollo de la respuesta inmune de tipo celular y humoral. Sin embargo, ambos tipos de respuesta se producen invariablemente y sin necesidad de que se desarrollen al mismo tiempo<sup>14,17</sup>

## RESPUESTA CELULAR

La respuesta celular es mediada por linfocitos T productores de linfocinas. Después de que la bacteria penetra al organismo, son ingeridas por las células fagocíticas cerca del sitio de entrada y llevadas a otros sitios dentro del cuerpo. Aunque los constituyentes normales del plasma, como las bacteriocidinas unidas al complemento, matan a algunos microorganismos. La ingestión ocurre rápidamente y una vez dentro de los neutrófilos las brucelas están protegidas por las bacteriocidinas. Estudios de los componentes de la pared celular de las cepas virulentas de las especies de *Brucella* sugieren que algunas fracciones como los ésteres tipo cera, lípidos neutrales, el lípido A y el alto contenido de fosfatidilcolina, interfieren con la función fagosoma-lisosoma y con ciertas actividades oxidantes subcelulares de los leucocitos polimorfonucleares. Los neutrófilos sirven principalmente como un medio para conducir las brucelas a varias regiones del cuerpo, que favorecen la multiplicación de los microorganismos, en vez de contribuir a la defensa del huésped, además causan la muerte o lisis de los

neutrófilos, monocitos, histiocitos y por ciertas células epiteliales. De ahí la bacteria pasa a localizarse principalmente en los nódulos linfáticos, en la ubre, en el útero y los nódulos asociados, hasta la mitad de la gestación.

La rápida propagación de los microorganismos por todo el cuerpo se hace a través de los vasos sanguíneos. En infecciones crónicas la bacteria tiende a localizarse en útero y glándula mamaria, testículos, glándulas sexuales masculinas accesorias y nódulos linfáticos. Los macrófagos ingieren antígenos, encerrando a la bacteria en una vacuola o fagosoma, se fusionan los lisosomas que descargan todo su contenido bactericida, pero las brucelas pueden resistir este ataque, encontrando en el medio intracelular su lugar de resistencia. Las células que han fagocitado brucelas procesan en los fagolisosomas los antígenos bacterianos, en péptidos antigénicos. Trozos de estos péptidos se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) y son presentados en la superficie celular. Otros leucocitos, los linfocitos T, tienen moléculas que les permiten reconocer esos fragmentos peptídicos unidos al MHCII. La adhesión de la bacteria se ve favorecida por la opsonización de la misma por anticuerpos (IgG) y factores del complemento (C3b). Además esta opsonización potencializa la capacidad bactericida del fagocito, incrementando la producción de una serie de productos tóxicos. Este complejo antigénico será reconocido por el linfocito T cooperador (Th 1), activándolo e induciendo la liberación del interferón e interleucinas (IL), principalmente IL-2, potentes estimuladores de la capacidad bactericida de la propia célula fagocítica. La interacción libera gran cantidad de péptidos, como el factor estimulador de colonias. En el bazo, este factor induce

infiltrado y producción de nuevos macrófagos que ingerirán las células recubiertas por el factor C3b o por anticuerpos como la IgG<sub>2</sub><sup>39,41</sup>.

El LPS, el interferón  $\gamma$  y la IL2 activarán al fagocito, haciendo que este aumente de tamaño, movilidad y actividad metabólica, así como también aumentan el número de receptores Fc con los que se intensifica el proceso de fagocitosis; de esta forma, las células asesinas son capaces de reconocer y destruir eficazmente a las células infectadas así como bloquear la multiplicación intracelular. Los Th activados además, actúan sobre diferentes tipos celulares: linfocitos B, linfocitos CD8 (citotóxicos y supresores) y células asesinas naturales (NK)<sup>8 39</sup>.

Una característica de la infección por *Brucella*, es la aparición de una hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH<sup>\*</sup>) contra la endotoxina de la bacteria, que es una reacción inmune mediada por células, es el rango distintivo sobresaliente de las infecciones debidas a bacterias intracelulares facultativas<sup>3</sup>.

La hipersensibilidad retardada se caracteriza por una reacción inflamatoria en un animal sensibilizado, habitualmente en una zona de piel que ha entrado en contacto con el antígeno. La prueba cutánea intradérmica con preparaciones antigénicas adecuadas es útil para descubrir la infección por algunos de los microorganismos que desencadenan la hipersensibilidad retardada. La subclase de linfocitos T que intervienen en la reacción se denominan células T<sub>DTH</sub>. La inyección de antígeno por vía intradérmica en la piel de un animal sensibilizado desencadena una secuencia de reacciones que empieza con el reconocimiento del antígeno por las células T<sub>DTH</sub> sensibilizadas y la elaboración de las linfocinas.

El antígeno se pone en contacto con los linfocitos T sensibilizados y provoca la liberación de linfocinas. Estos mediadores solubles atraen células accesorias a la zona donde tiene lugar la reacción de hipersensibilidad. Como consecuencia de la secreción del factor inhibidor de macrófagos (MIF) y otras linfocinas, se acumulan y son activados los macrófagos. En 48 hrs, el reclutamiento de células es suficiente para producir una inflamación indurada en el lugar donde se inoculó el antígeno. La lesión debida a la hipersensibilidad continúa aumentando durante 24 horas más<sup>3,14,21</sup>.

Los antígenos que intervienen en las pruebas de hipersensibilidad retardada (intradermorreacción) son de tipo proteico. El LPS no participa en la hipersensibilidad retardada y su presencia en los antígenos empleados en esta prueba, pueden interferir en la interpretación de resultados, al inducir una reacción mediada por sus anticuerpos específicos que pueden durar más de 24 hrs. Por lo que los alergenos empleados para este tipo de pruebas son obtenidos de cepas rugosas estables, como *B. melitensis* B 115, pues en caso de darse una contaminación con LPS, esta precaución elimina el antígeno O inmunodominante

17 25 26

## RESPUESTA HUMORAL

La respuesta humoral está dada por linfocitos B, que al ser estimulados por el antígeno se transforman en células plasmáticas que se encargan de producir

---

\* Delayed-Type Hypersensitivity



anticuerpos Así mismo los linfocitos B se transforman en células de memoria, para la protección del hospedero en reinfecciones por el mismo agente <sup>8</sup>

Por su localización en la superficie de la célula y su alta inmunogenicidad, el LPS es el primer antígeno frente al que se aparecen anticuerpos de tipo IgM, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> también intervienen los IgA y en la infección tanto como en la vacunación con vacunas vivas o muertas El polisacárido B o hapteno nativo (HN), aun estando sus determinantes expuestos en la superficie de la célula, presenta un comportamiento diferente La aparición de anticuerpos frente al mismo, parece depender de la intensidad del estímulo antigénico (dosis infectante y virulencia) <sup>17</sup>

Después de la primoinfección a una cepa de campo virulenta de *B. abortus*, se producen anticuerpos de tipo IgM permaneciendo constante su concentración de una a tres semanas, lo cual puede detectarse por pruebas de aglutinación y en parte por la de fijación del complemento (FC) y de la prueba de anillo en leche y a continuación se producen los de tipo IgG, que se incrementa hasta ser dominante; generalmente la subclase IgG<sub>1</sub> es la más abundante, persistiendo títulos aglutinantes hasta por diez meses, también podemos detectarlo con la prueba de FC y la IgG<sub>2</sub> por pruebas de aglutinación. El nivel de IgM baja paulatinamente. en tanto que la IgG y la IgA persisten en concentraciones altas. Después de varias semanas cede el estado agudo; pero cuando por diversos factores la *Brucella* permanece en una fase crónica en el huésped se puede inducir un estado de tolerancia inmunológica. La respuesta posvacunación con la cepa 19 ha demostrado la capacidad de conferir una sólida inmunidad y se considera una de las mejores armas en el control de la enfermedad En la vacunación los títulos de IgM persisten por más tiempo. mientras que las IgG descienden, haciéndose

imperceptibles por los métodos serológicos convencionales alrededor de los ocho meses. Los animales pueden contraer la infección antes y después de nacer, sin que se produzcan anticuerpos detectables hasta la gestación <sup>14,17,27,39</sup>.

## **RESPUESTA HUMORAL EN EL CONTEXTO INFECCION - VACUNACION**

Para la elección de una prueba serológica, es necesario tener en cuenta frente a que antígeno queremos detectar anticuerpos. Sin embargo, esta información sería incompleta si no se considera la clase de inmunoglobulina (IgG, IgM, o IgA) o subclase que es de interés determinar. Tanto en animales infectados como en animales vacunados con cepa 19, la respuesta humoral incluye la síntesis de anticuerpos de la clase IgM e IgG, sin embargo en la vacunación, el nivel de anticuerpos cae rápidamente de tal manera que a los seis meses no se encuentra IgG<sub>2</sub> y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG<sub>1</sub>. En contraste con los animales infectados persisten después de 6 meses altos niveles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>. Algunos estudios indican que en la infección y vacunación, se estimula la aparición de IgM e IgG frente al LPS <sup>8,17</sup>.

## DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la brucelosis se debe realizar en los laboratorios aprobados por la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), con muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y muestras de tejidos, mediante pruebas inmunológicas, estudios bacteriológicos u otros que sean autorizados por la NOM.

Las pruebas inmunológicas establecidas por la NOM y efectuadas por el personal oficial o aprobado para especies lisas son: la prueba de tarjeta, rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche <sup>30,31</sup>.

La elección de los métodos de diagnóstico para un programa de control y/o erradicación dependerá de la especie animal, población bajo vigilancia, la tasa de prevalencia en las diferentes regiones, y los programas de vacunación en curso <sup>30</sup>.

Para fines prácticos las pruebas pueden dividirse en:

### a) PRUEBAS TAMIZ

Estas pruebas se deben caracterizar por poseer una alta sensibilidad, lo que significa pocos o ningún animal falso negativo. Además son sencillas económicas y prácticas. La Prueba de tarjeta o rosa de bengala es considerada una de ellas y se puede realizar en la totalidad del hato. Con esta prueba se detecta la presencia de anticuerpos circulantes de tipo IgG e IgM, de origen vacunal o de infecciones naturales y también pueden ocurrir reacciones cruzadas con otras bacterias dando falsos positivos. Esta técnica es usada de rutina, tiene

una sensibilidad muy próxima al 100%, sin embargo los resultados que se obtienen no son confiables por el alto número de falsos positivos, por lo cual todos los sueros de los animales que resulten positivos, deben pasar a una segunda prueba confirmatoria, ya sea rivanol o fijación de complemento <sup>1,17,21,47</sup>

## **b) PRUEBAS DE VIGILANCIA EPIZOOTIOLÓGICA**

La prueba de Anillo en leche, es recomendada en áreas controladas y libres de infección para descubrir hatos presuntamente infectados, debido a que se aplica de forma colectiva tomándose la muestra de leche de los tanques contenedores de leche. Los resultados deben confirmarse individualmente con pruebas serológicas <sup>21,30,31,47</sup>.

**Prueba de anillo en leche:** Esta prueba se debe practicar en una muestra de leche cruda, fresca y fluida, realizándose con antígeno autorizado por la SAGAR, teñido con hematoxilina con un pH entre 4.0 y 4.3 a una concentración celular de 4%. En bovinos los resultados se interpretarán como negativos en ausencia de anillo teñido y positivos los que presenten anillo teñido en la superficie de los tubos <sup>31</sup>.

## **c) PRUEBAS COMPLEMENTARIAS**

Sirven para eliminación o disminución de reacciones heteroespecíficas, detección de anticuerpos incompletos y para diagnosticar correctamente el mayor número de casos, especialmente los crónicos, que suelen permanecer con diagnóstico incierto y diferenciación de títulos debidos a vacunación o a infección.

Estas pruebas se realizan en hatos problema, donde la infección persiste pese a la aplicación de exámenes serológicos y a una eliminación rigurosa de reactivos. En estas se incluyen la prueba de rivanol y la de fijación del complemento.

**La prueba de rivanol:** es complementaria cuando se tiene un resultado positivo a tarjeta, el suero problema se hace reaccionar con lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina (solución de rivanol) con el fin de precipitar las IgM, quedando exclusivamente las IgG, una vez hecho este tratamiento, se procede a realizar la prueba en forma similar a la de aglutinación en placa utilizando antígeno específico, esta prueba es de tipo cuantitativa <sup>21,47</sup>.

**Fijación del complemento:** presenta resultados más confiables con alta sensibilidad y especificidad, ya que las reacciones con antígenos heterólogos son menores y los anticuerpos posvacunación fijadores del complemento desaparecen más rápido que los anticuerpos aglutinantes. Requiere de más equipo y de personal capacitado <sup>21,47</sup>.

**El estudio bacteriológico:** se debe realizar en muestras de leche, sangre, líquidos corporales o fragmentos de tejidos infectados que deben de ser colocados en recipientes estériles provistos de una tapa hermética y se remitirán al laboratorio aprobado para que se realice el diagnóstico. La presencia de *Brucella sp* en cualesquiera de las muestras, significa que el animal es positivo, aún en ausencia de anticuerpos demostrables por los métodos serológicos <sup>30</sup> La demostración directa del agente etiológico, se puede efectuar en frotis obtenidos

con material contaminado de placenta y del abomaso fetal empleando tinciones especiales como fluorescencia <sup>27</sup>.

**Pruebas de inmunidad celular:** Se basa en poner de manifiesto reacciones de hipersensibilidad retardada tipo IV, mediante la inoculación de alérgenos adecuados. La prueba intradérmica es la más utilizada y se emplea un alérgeno proteico libre de LPS. La reacción positiva se caracteriza por la aparición de una zona indurada con eritema a la 24 hrs, que alcanza su máximo desarrollo a las 48 y 72 hrs. En este tipo de pruebas son positivos los animales vacunados con cepas vivas <sup>17</sup>.

## PREVENCIÓN Y CONTROL

El control de la enfermedad en los animales debe realizarse con dos objetivos fundamentales el 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 los puntos que se mencionan a continuación vacunación, eliminación de los animales enfermos y aplicación de prácticas de manejo orientadas a reducir los riesgos de infección, como pueden ser desinfección de locales, corrales, etc y evitar la movilización de animales infectados <sup>36</sup>. El control de la brucelosis bovina depende principalmente de la prevención a la exposición de este organismo al ganado susceptible y del aumento de la resistencia mediante la vacunación <sup>29</sup>.

Las vacunas tienen un papel muy importante en el control de la brucelosis, limitando su difusión y reduciendo su impacto económico <sup>2</sup> Desde 1936, se ha

estado usando para el control y erradicación de la brucelosis la vacunación con la cepa 19 que continúa siendo el producto inmunogénico más eficaz empleado con mayor frecuencia y produce una respuesta inmune adecuada. No se ha demostrado ningún cambio en su virulencia o inmunogenicidad. En E.U.A. se ha logrado reducir la incidencia de esta enfermedad mediante detección de vacas enfermas, el desecho y la protección de becerras con la vacunación de la cepa 19, sin embargo, puede producir efectos secundarios particularmente cuando se aplica en animales adultos, puede causar de un 2 a 3 % de abortos e infecciones mamarias persistentes, con excreción activa en leche de vacas vacunadas en edad adulta. Tras la inoculación accidental esta cepa vacunal puede provocar infección en el hombre <sup>6,13</sup>. En caso de vacunar animales de más de 6 meses de edad estos saldrán positivos por más tiempo en las pruebas rutinarias de diagnóstico. Con la cepa 19 se induce el aumento en títulos de anticuerpos contra una fracción del LPS, títulos que persisten posvacunación y dificultan el diagnóstico <sup>29,42</sup>. Los anticuerpos que se detectan al realizar un diagnóstico son principalmente dirigidos contra la cadena O lipopolisacárida <sup>6,36</sup>.

La principal desventaja de los anticuerpos posvacunales puede reducirse al mínimo, reduciendo la dosis y empleando pruebas serológicas que permitan diferenciar entre clases de anticuerpos <sup>29</sup>.

Considerando las características antes mencionadas, de las vacunas contra brucelosis que están en uso actualmente, se puede pensar que la vacuna ideal contra la brucelosis debe tener las siguientes características:

- a) Los anticuerpos que induzca la vacuna no deben interferir con el diagnóstico serológico 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, además debe ser apatógena para los humanos. La cepa vacunal no debe ser transmisible a otros animales ni de contaminar la carne ó productos lácteos.
- c) Una sola dosis vacunal debe inducir una protección fuerte a largo plazo contra infecciones sistémicas y uterinas, por lo tanto prevenir el aborto. No debe causar aborto si se inocula en animales preñados. La revacunación de animales accidentalmente ó por intención no debe causar serología positiva a las pruebas convencionales. La vacuna debe inducir protección cruzada contra las especies más importantes de *Brucella: abortus, melitensis y suis*.
- d) La vacuna debe ser estable y no tener virulencia revertible, ya sea *in vitro* ó *in vivo*.
- e) La vacuna debe tener un bajo costo de producción.

Se han realizado trabajos enfocados a la producción de mutantes ya sea por transposones o por medio de pases con antibióticos, con el fin de obtener cepas apatógenas e inmunogénicas que contengan marcadores genéticos, como candidatos para elaborar biológicos que permitan diferenciar serológicamente entre animales vacunados de animales con infección de campo <sup>47</sup>.

Para que no existan problemas diagnósticos posvacunales, la respuesta a la vacuna contra *Brucella* no debe reaccionar con las pruebas serológicas, ya que



todas ellas usan la cadena O como antígeno para la reacción. Una alternativa es que la vacuna sea mutante rugoso, la cual al carecer de la cadena O evita que haya reacción positiva a las pruebas de diagnóstico <sup>36</sup>.

Los organismos rugosos podrían ser usados para inducir respuestas inmunes protectoras evitando los problemas de diagnóstico posvacunal. Desde hace varios años un grupo de investigadores, iniciaron una serie de estudios con el fin de producir una cepa mutante de *B. abortus* que no produjera efectos colaterales, de aquí surgió la cepa rugosa RB51 <sup>47</sup>.

En el término RB51 **R** corresponde a rugosa, **B** a *Brucella* y **51** se refiere a una nomenclatura de laboratorio empleada en el tiempo que fue derivada. La cepa RB51 se obtuvo a través de varios pasajes de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* en medios de cultivo conteniendo penicilina y rifampicina siendo altamente atenuada y estable tanto *in vivo*, como *in vitro*. Después de múltiples pasajes, a través de varias especies de animales, resultó ser carente de cadena O del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, siendo su rugosidad muy estable

6.40 42

Por ser una cepa rugosa no induce anticuerpos que se detecten por pruebas de diagnóstico convencional, por lo que cualquier reacción positiva en las pruebas diagnósticas para esta enfermedad permite distinguir un animal infectado naturalmente de uno vacunado contra brucelosis sin importar la edad, dosis o frecuencia de inyecciones. En estudios realizados en el ganado bovino la bacteria es depurada en un tiempo relativamente corto y ha demostrado su escasa capacidad para inducir localizaciones mamarias, placentarias y tiene muy pocas o

ninguna característica abortiva. Cuando se usa una sola vacunación, su efecto protector es similar al que es inducido por la cepa 19. La vacunación se lleva a cabo una vez en la vida entre la edad de 3-6 meses con la dosis becerra o después de los ocho meses la dosis para vaca, sólo es recomendable una revacunación.<sup>6,42</sup>

Esta cepa vacunal ha demostrado inducir inmunidad frente a *B. abortus*, tanto en estudios realizados con ratones como en ganado bovino, sin producir interferencia en las pruebas serológicas de diagnóstico rutinario, al no inducir anticuerpos frente a la cadena O del LPS en los animales vacunados<sup>6,13</sup>. Schurig menciona la ausencia de signos de infección tras la inoculación accidental de RB51 en humanos y sugiere que esta cepa es avirulenta para la especie humana<sup>6</sup>

Estas características sugieren que la cepa RB51 puede ser una buena opción para la vacunación contra brucelosis en el ganado bovino en los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad. En muchos países han comenzado ya a utilizarla como vacuna, reemplazando el uso de la cepa 19

6.13 36 38 42

Los mejores resultados en control y erradicación se han obtenido con la eliminación de los animales reactivos a las diferentes pruebas que se utilizan en el diagnóstico de la enfermedad<sup>50</sup>.

El éxito de las campañas de control de la enfermedad radica entre otras cosas en la disponibilidad de pruebas diagnósticas confiables y sensibles y en la eliminación de animales infectados.

Lo anterior denota la necesidad de evaluar una cepa vacunal, capaz de inducir anticuerpos que no interfieran con el diagnóstico serológico de la

enfermedad, pero que confieran una adecuada protección contra la infección de campo, sobre todo en aquellas zonas endémicas del país, y con una prevalencia de media a alta.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar en becerras de un hato en la fase de control para la brucelosis, la respuesta inmune causada por la vacunación con la cepa rugosa RB51 de *Brucella abortus*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Evaluar periódicamente durante 405 días posvacunación, la presencia de anticuerpos contra brucelas lisas en los animales vacunados, utilizando las pruebas de tarjeta (PT), rivanol (PR) y fijación de complemento (FC).
- 2 Determinar la presencia de anticuerpos vacunales en las becerras, mediante la prueba de aglutinación lenta en tubo (ALT) con antígeno rugoso experimental.
- 3 Evaluar la respuesta inmune celular posvacunal de las becerras vacunadas con RB51, mediante la prueba de intradermoreacción (DTH).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**ANIMALES :** Se utilizaron 45 becerras de la raza Holstein seronegativas a *Brucella* con una edad entre 3 y 6 meses que pertenecían y provenían de un establo del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca S.A. (CAITSA), las becerras permanecieron alojadas y fueron criadas en convenio con la FES Cuautitlán en su establo localizado en la antigua Carretera Cuautitlán - Teoloyucán Km 2.5 en el municipio de Cuautitlán Izcalli, en el cual existen instalaciones para la explotación de otros animales.

**GRUPOS:** Las 45 becerras seronegativas se dividieron en dos grupos:

- Grupo experimental: 35 becerras en las que se realizó la prueba de tarjeta y el día 0 fueron vacunadas con la cepa RB51 de *Brucella abortus*.
- Grupo testigo: 10 becerras se realizó la prueba de tarjeta y permanecieron sin ser vacunadas.

Cabe hacer notar que ambos grupos permanecieron bajo las mismas condiciones ambientales compartiendo las mismas instalaciones y corrales

**VACUNA:** Se vacunó a las becerras con la RB51 de *Brucella abortus* con dosis para becerro  $1 \times 10^{10}$  (unidades formadoras de colonias) UFC/ml, se aplicaron 2 ml por vía subcutánea en la región del cuello.

## CONTEO CELULAR DE LA VACUNA

A la vacuna utilizada se le realizó el conteo de UFC siguiendo la técnica descrita por Miles y Misra <sup>1</sup>

### ANTÍGENOS:

Antígenos para pruebas serológicas de tarjeta y rivanol <sup>\*\*</sup>.

Antígeno para la prueba de Aglutinación lenta en tubo que se preparó a partir de la cepa rugosa vacunal

"Brucellergeno" <sup>\*\*\*</sup> (extracto proteico de *Brucella*) para la prueba de intradermorreacción

**TOMA DE MUESTRAS:** La toma de muestras serológicas se realizó los días 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 300 y 405 posvacunación. Las muestras se obtuvieron de la vena yugular y/o de la coccígea ventral con agujas y tubos vacutainer estériles al vacío, estos se identificaron y permanecieron a temperatura ambiente hasta que fueron centrifugados, se separó el coágulo del suero y este se almacenó en viales identificados y se congelaron a -20°C hasta la realización de las pruebas.

---

<sup>1</sup> Laboratorio LITTON DE MEXICO

<sup>\*\*</sup> Productora Nacional de Biológicos Veterinarios de México.

## PREPARACION DE ANTIGENO RUGOSO EXPERIMENTAL PARA LA PRUEBA DE AGLUTINACION LENTA EN TUBO.

- 1 Se reconstituyó la vacuna RB51 cepa rugosa de *Brucella abortus*, dosis para vacas con solución salina fenolada (SSFe) al 0.5% para su inactivación y se dejó a temperatura ambiente durante 24 hrs.
- 2 Se pesaron los tubos<sup>\*\*\*</sup> y se le agregó en estos por partes iguales la vacuna reconstituida e inactivada
- 3 Se centrifugó a 950 x g durante 20 min, posteriormente se realizarón 3 lavados por centrifugación con solución salina al 0.85%
4. Una vez sedimentado el paquete celular, se realizó el pesado de los tubos y se saco la diferencia entre el peso inicial y el peso final para obtener el peso del paquete, que fue de 14 g se reconstituyó en 180 ml de solución salina al 0.85% para ajustarlo a una concentración final de 4.5% manteniéndolos en refrigeración hasta su uso.
- 5 Para su maduración se colocó en recipientes de vidrio haciendo una dilución 1.100 con solución salina fenolada al 0.5% y se mantuvo en refrigeración<sup>36</sup>.

Terminado este proceso, se procedió a la realización de las pruebas como se describe posteriormente<sup>1, 36</sup>.

---

\*\*\* Rhone Merieux de Lyon Francia

\*\*\*\* Tubos Falcon Becton Dickinson USA

## **PRUEBAS SEROLOGICAS**

A todos los sueros se les practicó la prueba de tarjeta descrita por Alton y se consideró positivos a los que presentaron cualquier tipo de aglutinación y a estos se les practicaron las pruebas de rivanol y fijación del complemento descritas por Alton. Para la prueba de rivanol se consideró positivos en los animales no vacunados que presentaron una aglutinación completa a una dilución 1:25 y en animales vacunados se considero sospechoso a esta misma dilución y una aglutinación completa 1:50 es considerada positiva y en el caso de la prueba de fijación del complemento títulos a partir de la dilución de 1:8 <sup>1, 21</sup>.

### **PRUEBA DE AGLUTINACION LENTA EN TUBO**

Para la prueba de Aglutinación lenta en tubo se utilizó un antígeno rugoso de células completas que se elaboró a partir de la cepa vacunal.

Se colocaron el número requerido de tubos de vidrio por hileras, marcando el primer tubo de cada hilera (4 tubos por hilera) con el número de la muestra de suero. Con una pipeta automática se extrajo 80 µl la muestra de suero en el primer tubo, 40µl en el segundo tubo, 20 µl en el tercero y 10 µl en el cuarto tubo.

Se efectuó el mismo procedimiento en las muestras sucesivas de cada hilera de tubos.

Con una pipeta se introdujo a cada tubo 2 ml del antígeno diluido, obteniendo así diluciones de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200.



Se agitaron suavemente las gradillas con los tubos, se envolvieron con polipapel y se colocaron en una incubadora a 37°C por 48 hrs +/- 3hrs para su posterior lectura <sup>1,36</sup>.

**Resultados** Los tubos se observan contra un fondo negro y con luz atrás de los tubos.

- ◆ **Reacción positiva:** Es cuando una mezcla de suero antigéno es clara y al agitar suavemente no se desbaratan los grumos.
- ◆ **Reacción incompleta:** Es cuando la mezcla de suero antigéno se muestra parcialmente claro y no se desbaratan los grumos.
- ◆ **Reacción negativa:** Es cuando la mezcla de suero antigéno no muestra claridad y al agitar suavemente no se revela la presencia de grumos <sup>1</sup>.

## **PRUEBA DE INTRADERMORREACCION**

A las becerras del grupo experimental se les realizó la prueba de intradermorreacción, después de 405 días posvacunación utilizando el "brucellergeno".

1. Se depiló una área de 3 x3 cm a los animales en la región de la tabla del cuello.
2. Se realizó la medición inicial del grosor de la piel utilizando un vernier
3. Se inoculó el brucellergeno a dosis de 0.1 ml por vía intradérmica con jeringa automática.

4 Se realizó la lectura a las 72 horas después de la inoculación, midiendo el aumento del grosor de la piel con el vernier.

La prueba se considera positiva cuando el aumento en el grosor de la piel, fue igual o mayor a 20% sobre el valor de la medida inicial y cuando el aumento fue menor al 20% de la medida inicial la prueba se consideró negativa <sup>3,5,36</sup>.

## RESULTADOS

En la realización del conteo celular de la vacuna el resultado fue de  $7.6 \times 10^8$  UFC/ml.

En el cuadro 1 y 2 se muestran los resultados a la prueba de tarjeta realizadas al grupo experimental y al grupo control, confirmando que no poseían anticuerpos de *Brucella* antes de la vacunación (día 0), también se muestran los resultados posvacunación.

Se continuaron los muestreos para la realización de las pruebas serológicas rutinarias para detección de las brucelas lisas. En el cuadro 3 se muestran los resultados expresados en porcentajes, los resultados que fueron negativos el 100% hasta el día 120, el día 150 se encontró el 2.8% de positivos, el día 180 el 5.7% y de los días 210 al 405 el 8.5% de positivos. De los sueros que fueron positivos a tarjeta. se les realizaron pruebas complementarias en donde los resultados obtenidos fueron negativos. En el grupo testigo negativo siempre se presentó el 100% de los animales negativos.

En la prueba de aglutinación lenta en tubo con antígeno rugoso experimental los resultados fueron en su totalidad negativos ya que al momento de la lectura, no se evidenció aglutinación en ninguna de las muestras en ambos grupos

En el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de Intradermoreacción, aplicada a 32 animales del grupo experimental a los 405 días posvacunación, basándose en el siguiente criterio e interpretó como positivos, a los animales que resultaron con un 20% o más de aumento con respecto a la medida inicial, obteniendo que un 91% de los animales probados dieron reacción positiva a la prueba; paralelo a está se realizó la prueba de tarjeta en donde se obtuvo el 91.4% de los animales negativos.

En el caso de la intradermoreacción, el grupo testigo inicial de este estudio serológico no pudo ser utilizado, debido a que un año después de la vacunación inicial estos animales ya habían sido vacunados, por lo que no se pudo trabajar con un grupo control negativo por falta de animales adecuados

A la fecha las hembras de este trabajo experimental, incluyendo las que resultaron positivas a la prueba de tarjeta, tuvieron un parto normal y en ninguno de los casos se presentó aborto.

## DISCUSION

Uno de los principales objetivos de la investigación en brucelosis bovina, es el desarrollo de vacunas vivas que induzcan una protección adecuada al ganado contra la infección y el aborto. Además de que los anticuerpos que sean producidos por la vacunación, puedan ser diferenciados de los causados por cepas de campo de *B. abortus*, en las pruebas de diagnóstico oficial <sup>13</sup>.

Durante mucho tiempo se ha realizado la prevención de la brucelosis con vacunas elaboradas a partir de cepas lisas de *B. abortus* como es el caso de la cepa 19, que hasta ahora ha sido la de mayor uso y que produce una respuesta inmune adecuada, teniendo la desventaja de interferir con las pruebas de diagnóstico rutinario <sup>13,45</sup>.

Se han producido nuevas vacunas con la finalidad de evitar los problemas de interferencia con el diagnóstico de la enfermedad, actualmente se esta probando en diferentes hatos la cepa RB51, en el presente trabajo se obtuvo como resultado que los animales fueron negativos a las pruebas serológicas con antígenos lisos, por lo que se confirma que los anticuerpos inducidos con por esta cepa vacunal no interfieren en el diagnóstico rutinario, siendo esto una ventaja sobre la vacunación con la cepa 19 <sup>6,42</sup>. Esto es debido a que los anticuerpos que se detectan con antígenos lisos en las pruebas serológicas que se emplean para el diagnóstico oficial, son dirigidos principalmente contra la cadena "O" <sup>6,36</sup>.

Durante el estudio resultaron 3 animales positivos a la prueba de tarjeta, pero negativas a las pruebas confirmatorias de rivanol y fijación de complemento. *Reyes en 1996 menciona que la prueba de tarjeta, evaluada por diferentes autores ha demostrado que es la de mayor sensibilidad, pero es la que menos capacidad tiene para diferenciar animales vacunados de infectados, y que necesita de una prueba confirmatoria para determinar si el animal es positivo*<sup>37</sup>.

Este trabajo se realizó en un hato en control, en donde la prevalencia de brucelosis en bovinos era nula, el hecho de hacerlo así fue para conocer el comportamiento de los animales ante esta vacuna y con un riesgo de infección, debido a que en el hato caprino del rancho contiguo al establo, se presentó un brote de brucelosis alrededor de los 180 días de haber vacunado a las becerras, lo que *coincidió con la presencia de positivos en el establo, el pequeño número de reactores y la corta duración de la respuesta pueden manifestar que la vacuna fue eficiente para controlar el problema.*

Actualmente en México, se esta evaluando la vacunación con RB51; en un hato con elevada prevalencia de brucelosis los resultados indican que en el rancho donde las vacas fueron vacunadas, los casos nuevos se siguieron presentando durante 6 meses posvacunación con un promedio de 5% de incidencia mensual, lo que refleja una baja protección de la vacuna, bajo las condiciones de este hato<sup>34</sup>

*Sin embargo, Cheville en 1993 menciona que en el caso de vacas vacunadas con RB51, que presenten serología positiva a las pruebas de*

diagnóstico con antígenos lisos, esto pueda ser indicativo de que hay una infección temprana con cepas de campo de *B. abortus*<sup>13,25,26</sup>, puesto que el período de incubación puede ser hasta de 253 días<sup>28</sup> o que sea respuesta de una reacción cruzada a nivel de la cadena O con otra bacteria gram negativa<sup>25,26</sup>

En diferentes estudios realizados por Roop en 1991, Cheville en 1992 y 1993. Palmer en 1996 y Stevens en 1994, demuestran que la vacunación en bovinos con la cepa RB51, no produce anticuerpos aglutinantes que sean detectados por la prueba de aglutinación lenta en tubo con antígeno liso. Por lo que la inhabilidad de la cepa RB51 para inducir anticuerpos normalmente detectados en las pruebas de PT, FC y ALT, probablemente resulta por que la bacteria contiene muy poca cantidad o nada de antígeno O del LPS<sup>44</sup>, que es el epítotope responsable de la presencia de anticuerpos que sean detectados por estas pruebas<sup>12,13,35,38,44</sup>.

En el presente estudio se realizó la prueba de ALT con antígeno rugoso experimental y los resultados que se obtuvieron fueron negativos, lo que se atribuyó a algún posible error en la estandarización de la técnica con el uso de este antígeno. Sin embargo, en un estudio que realizó Pérez en 1997, en un establo bovino con baja prevalencia de brucelosis en donde los resultados obtenidos en la prueba de ALT con antígeno rugoso, fueron adecuados para obtener la titulación de anticuerpos, producidos por la vacuna rugosa mutante rfbk de *B. abortus* derivada de la cepa 2308, observando un comportamiento serológico parecido al producido por la vacunación con la cepa 19, además observó que el descenso de anticuerpos es similar entre ambas vacunas. También encontró que

en los animales vacunados no se presentó reacción alguna en las pruebas rutinarias, para el diagnóstico de brucelas lisas en el transcurso del estudio además de que no se presentaron casos nuevos de la enfermedad en un año posvacunación<sup>36</sup>. Por lo que se comprueba que las cepas RB51 y rfbk no interfieren en el diagnóstico de pruebas con antígenos lisos en brucelosis bovina.

Se realizó la prueba de intradermorreacción que es una evaluación de la hipersensibilidad celular tipo IV<sup>3</sup>, esta prueba es independiente de la presencia de la cadena O del LPS, en este tipo de respuestas participan proteínas citosólicas y es posible que también lo hagan otras de distinta localización celular, ya que los alérgenos clásicos no tienen un perfil proteico idéntico al del citosol<sup>25,26</sup>, los resultados se leyeron a las 72 hrs como se menciona en la literatura<sup>3,5,36</sup>.

En un estudio realizado por Bercovich en 1990 donde utilizó la prueba de intradermorreacción se señala, que cualquier aumento palpable en el sitio de inyección puede ser considerado positivo, confirmando sus resultados positivos con las pruebas de aglutinación, FC y estudio bacteriológico<sup>3</sup>. Sin embargo, con el fin de hacer más objetiva la medición, en este estudio se dio como positivos a los animales que presentaron un 20% o más en el aumento sobre la medida inicial como se indica en la literatura<sup>3,5,36</sup>.

Cheville en 1993 trabajó con diferentes grupos vacunando novillas con cepa 19 cepa RB51 y dos mutantes por transposición aplicando al ganado la brucelinización antes y 9 meses posvacunación, obteniendo sólo reactividad



cutánea a la brucelina después de la vacunación, y siendo las novillas libres de evidencia serológica contra *Brucella* <sup>13</sup>.

Pérez en 1997 en un estudio realizado con 16 becerras de un hato en una zona enzoótica de brucelosis, a los 12 meses posvacunación realizó la prueba de intradermorreacción, donde corroboró previamente que los animales fueran negativos a serología, obteniendo que el 100% de los animales probados dieron reacción positiva a la prueba y en el grupo control donde utilizo machos serológicamente negativos, el 100% de este grupo no dio reacción alguna a la aplicación del "brucellergeno" <sup>36</sup>

El hecho de que en el presente estudio diera como resultado que el 91% de reactivos en la prueba de intradermorreacción, es un indicio de que la vacuna RB51 confirió una buena inmunidad de tipo celular. Sin embargo en animales vacunados con cualquier cepa vacunal viva ya sea lisa o rugosa se produce una respuesta a esta prueba <sup>17</sup>

Los experimentos de protección frente a *B. abortus* publicados en bovinos, demuestran que la vacuna RB51 confiere un nivel de protección a corto plazo (7 a 13 meses) adecuado y muy similar al conferido por la cepa 19. Sin embargo, hacen falta estudios para determinar el nivel y la duración a mediano y a largo plazo de la protección conferida por RB51 frente a cepas de campo de *B. abortus* en ganado bovino <sup>6</sup>.

## CONCLUSIONES

Al realizarse la vacunación con la cepa RB51 de *Brucella abortus* no se induce la producción de anticuerpos que puedan ser detectados mediante las pruebas rutinarias para el diagnóstico de la brucelosis bovina con el uso de antígenos de cepas lisas

La vacunación con la cepa RB51 permite una diferenciación entre el ganado vacunado del ganado infectado con cepas de campo en una forma más eficaz, al no interferir con las pruebas de diagnóstico.

La prueba de aglutinación lenta en tubo con antígeno rugoso no fue la adecuada para evaluar la presencia de anticuerpos conferidos por la vacunación con la cepa rugosa RB51.

La respuesta a la prueba de intradermorreacción fue adecuada para evaluar la inmunidad de tipo celular y de esta manera sugiere que la vacunación con esta cepa si confiere una buena inmunidad.

## RECOMENDACIONES

No obstante que el uso de esta vacuna ya este aprobado tanto en E.U como en nuestro país, es necesario continuar con su evaluación en campo bajo diferentes condiciones de prevalencia para poder determinar su eficacia

No se recomienda la combinación de diferentes vacunas en caso de revacunaciones por ejemplo la cepa 19 con la RB51, debido a que puede dar resultados falsos al realizar las pruebas serológicas.

No es recomendable más de una revacunación con la RB51 aun cuando la zona sea de elevada incidencia.

El uso de la vacuna RB51 no debe descartarse ya que puede ser una buena herramienta para la prevención y erradicación de la enfermedad, en zonas de *baja prevalencia*.

## ANEXOS

**CUADRO 1: Resultados de la prueba de tarjeta en sueros de 35 becerras  
vacunadas con RB51 de 0 a 405 días posvacunación.**

Número	Día 0	15	30	45	60	90	120	150	180	210	405
220	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
224	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
225	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
228	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
229	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
233	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
235	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
236	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
237	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
238	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
239	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
240	N	N	N	N	N	N	N	N	RIP	-	-
241	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
242	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
243	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
244	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
245	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
246	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
247	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
248	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
249	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
250	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
252	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
254	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
256	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
257	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P
258	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P
259	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
260	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P
262	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
263	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
264	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
268	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
269	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
270	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

**CUADRO 2: Resultados de la prueba de tarjeta en sueros de 10 becerras pertenecientes al grupo testigo negativo.**

<b>Número.</b>	<b>Día 0</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>120</b>	<b>150</b>	<b>180</b>	<b>210</b>
272	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
273	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
275	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
276	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
277	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
278	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
280	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
281	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
282	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
283	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

---

**N: Negativo**

**P: Positivo**

**Rip: Muerte**

Cuadro 3: Resultados expresados en porcentaje de la prueba diagnostica para brucelas lisas, de 35 sueros del grupo experimental de bovinos vacunados con RB51.

<i>Día pos- vacunación</i>	<i>Pba. Tarjeta % Seronegativos</i>	<i>Pba. Tarjeta % Seropositivos</i>	<i>Pba Rivanol</i>	<i>Pba. Fijación complemento</i>
0	100	0	0	0
15	100	0	0	0
30	100	0	0	0
45	100	0	0	0
60	100	0	0	0
90	100	0	0	0
120	100	0	0	0
150	97.15	2.85	0	0
180	94.30	5.70	0	0
210	91.44	8.56	0	0
405	91.44	8.56	0	0

**CUADRO 4. Resultados de la prueba de intradermorreacción a los 405 días posvacunación realizada en 32 becerras vacunadas con RB51.**

<b>NÚMERO</b>	<b>Medida inicial</b>	<b>Medida final (72 hrs)</b>	<b>% aumento de medida inicial</b>	<b>Interpretación</b>
220	10 mm	11 mm	10	N
224	7 mm	9 mm	28.5	P
229	9 mm	12.5 mm	38.8	P
233	8 mm	10 mm	25	P
235	10 mm	12 mm	20	P
236	7 mm	11.5 mm	64.2	P
237	6 mm	9.5 mm	58.3	P
238	9 mm	11.5 mm	27.7	P
239	6 mm	9 mm	50	P
241	10 mm	13 mm	30	P
242	8 mm	10 mm	25	P
243	9 mm	11 mm	22.2	P
244	8.5 mm	10.5 mm	23.5	P
245	6.5 mm	10 mm	53.8	P
246	7 mm	10 mm	42.8	P
247	6 mm	9mm	50	P
248	5 mm	8 mm	60	P
249	9 mm	11.5 mm	27.7	P
250	7 mm	8.5 mm	21.4	P
252	7 mm	9.5 mm	35.7	P
254	11 mm	13 mm	18.1	N
256	9 mm	9.5mm	5.5	N
257	7 mm	10.5 mm	50	P
258	6 mm	8 mm	33.3	P
259	7 mm	10 mm	42.8	P
260	8 mm	11 mm	37.5	P
262	7 mm	10 mm	42.8	P
263	7 mm	10 mm	42.8	P
264	8 mm	10 mm	25	P
268	8 mm	10.5 mm	31.2	P
269	7 mm	9.5 mm	35.7	P
270	7 mm	10 mm	42.8	P

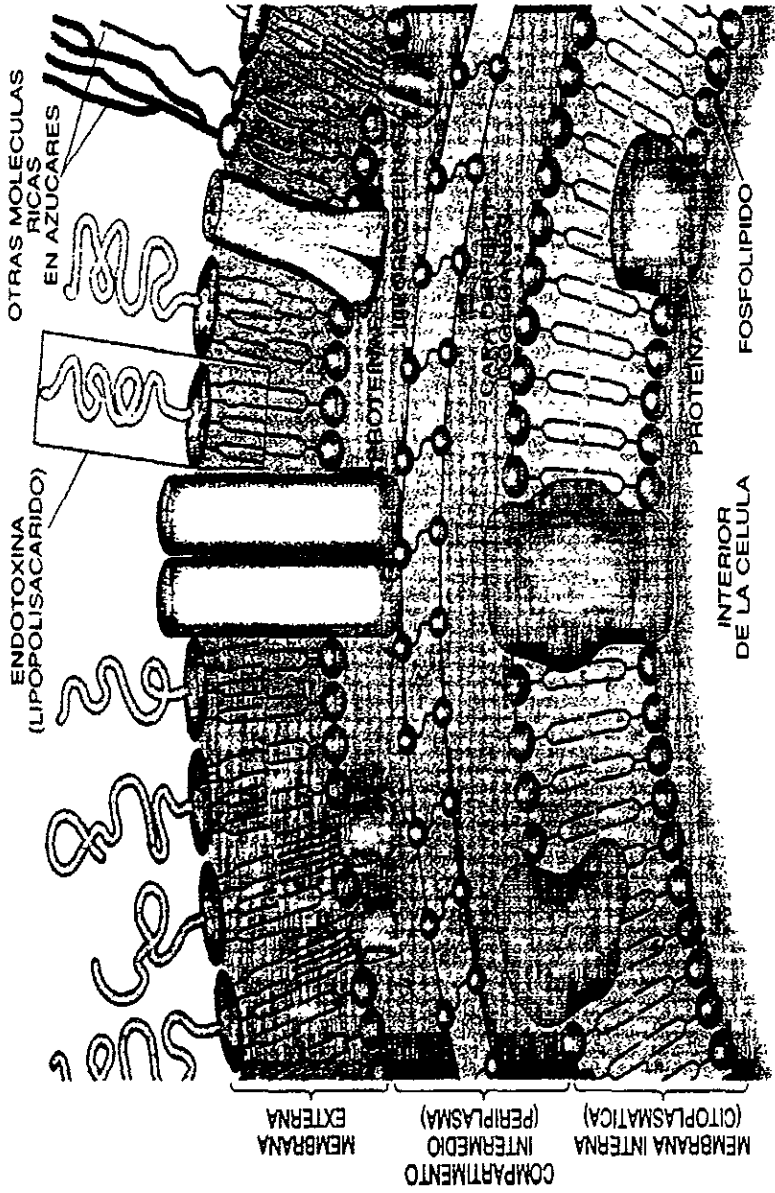


Fig. 1 Pared celular (LPS). Tomado de Ernst T R, Helmut B "Endotoxinas" Investigación y ciencia 1992.



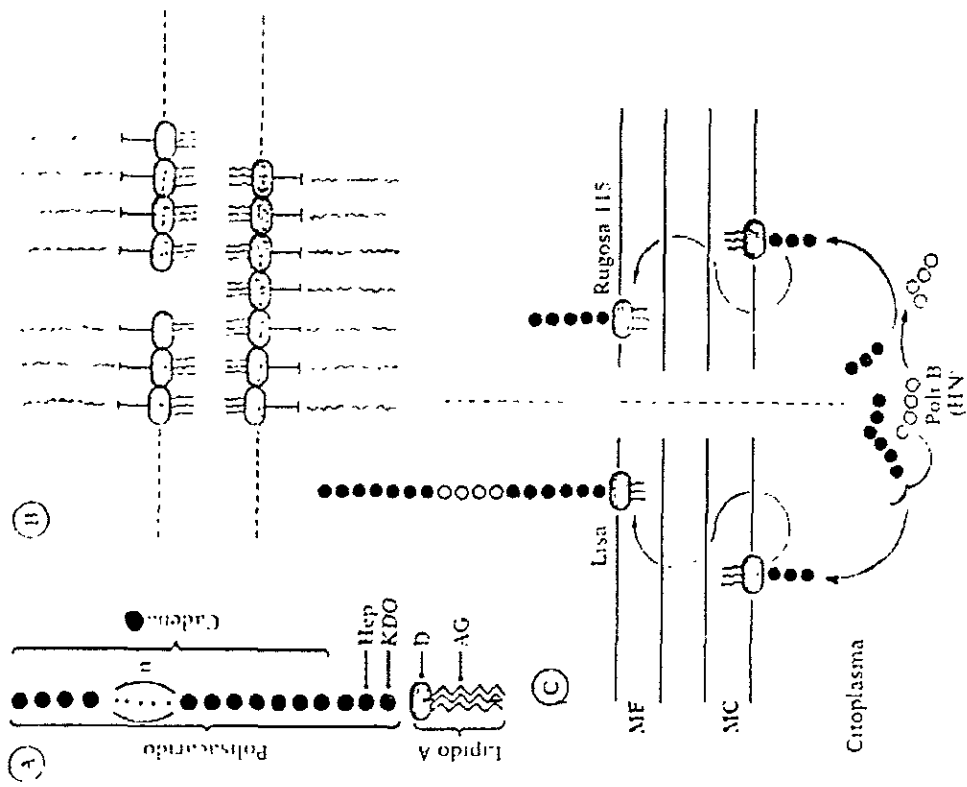


Fig 2. Diferencias entre LPS liso y rugoso. Tomado de Moriyón UJ. 1998

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

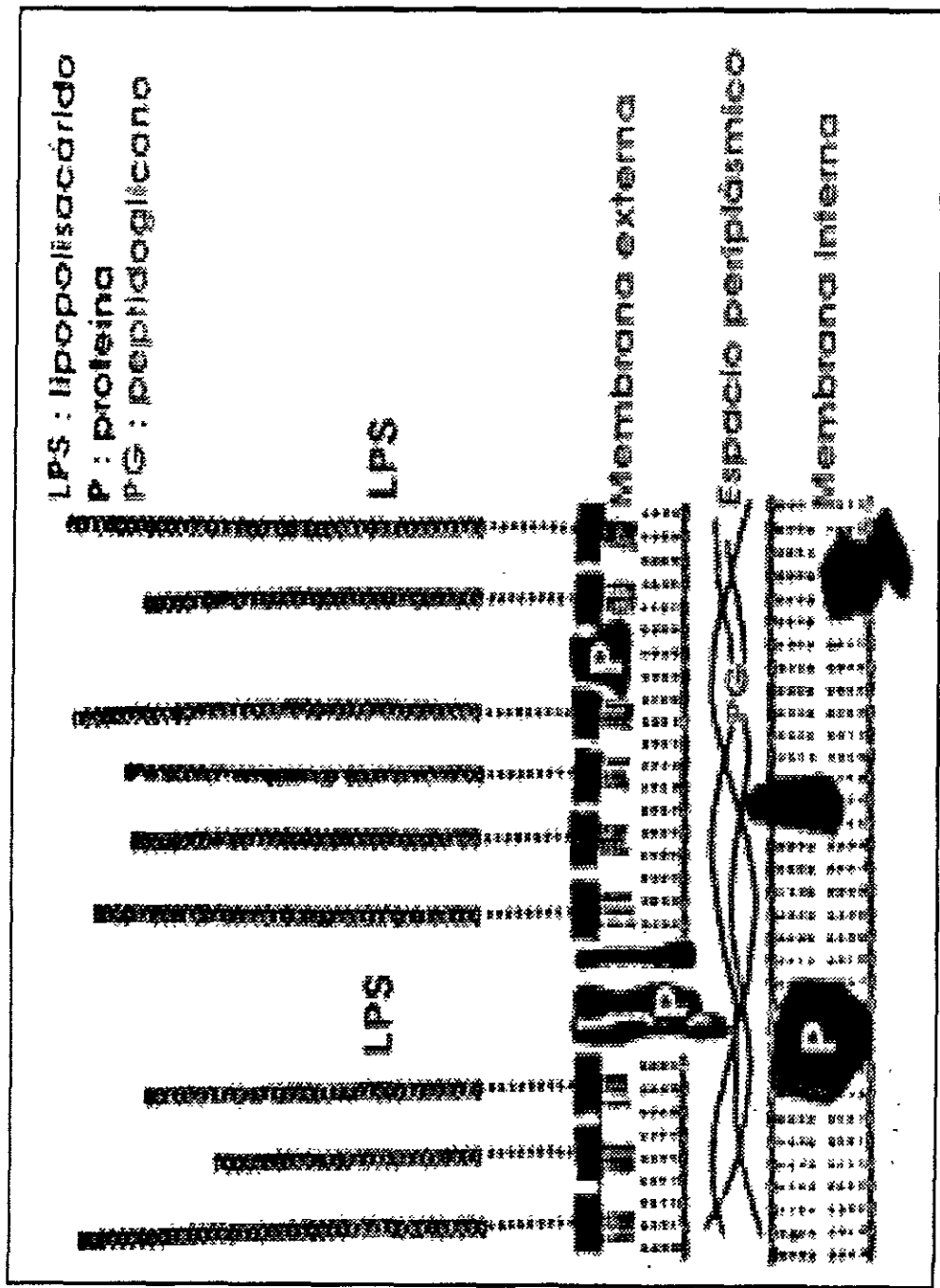


Fig 3. Estructura de la membrana de *Brucella* spp. Tomado de Sánchez CY. 1998.

## LITERATURA CITADA

- 1 Alton, GG. Techniques for the Brucellosis laboratory. Inst Nal de la Reserche Agronomique, París. 1988
- 2 Alvarado E M Determinación de la seroprevalencia de brucelosis bovina en 56 establos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo (Tesis de Licenciatura). México, DF México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM, 1997
- 3 Bercovich Z, Ter Laak EA An evaluation of the Delayed-Type Hipersensitivity Test for Diagnosing Brucellosis in individual cattle. A field study, Vet Microbiol 1990, 22:241-248
- 4 Biberstem EL, Zee CY. Tratado de microbiología veterinaria. España Ed Acribia, 1990
- 5 Blasco JM, Marin C, Jiménez M, Barberán M, Hernández A, Molina L, Velasco J, Diaz R. Moriyón I, Evaluation of allergic and serological test for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep, J. Clin Microbiol., 1994, Vol. 32, N° 8., 1835-1840.
- 6 Blasco JM. Profilaxis vacunal de la brucelosis en los rumiantes. las vacunas tradicionales y las nuevas vacunas. Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis 1998 julio 20-21; Acapulco (Guerrero) México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM 1998:205-226
- 7 Bovis Tratado de veterinaria práctica Madrid España. Ed Luzans, 1986
- 8 Bustamante S J, Salazar HFI. Estudio bacteriológico y serológico sobre brucelosis bovina en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus* (Tesis de Licenciatura) México, DF México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM. 1998

- 9 Carter GR Bacteriología y micología veterinaria. México Ed. Manual moderno 1985.230-238.
- 10 Carter GR. Cole R.J. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and microbiology, 5ª edición, EUA. San Diego California Ed. Academic press. 1990
- 11 Carter G R Chengappa MM., Essentials of veterinary bacteriology and micology, 4ª edición. London, Ed Lea & febiger, 1991.284
- 12 Cheville NF, Jensen AE, Halling SM, Tatum FM, Morfitt DC, Hennager SG, Frerichs W M, Schurig G Bacterial survival, lymphonode changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. Am J Vet Res 1992,53:10.1881-1888
- 13 Cheville NF, Stevens GM, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *B. abortus*. Am J Vet. Res 1993,54:10 1591-1597.
- 14 Corbel MJ Brucelosis. En Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria. J.A. Laing, editores México. Interamericana , 1991:190-230
- 15 Diaz AE. Prueba de IDR con hapteno nativo y prueba de rivanol para diagnóstico de brucelosis. Manual de procedimientos para el diagnóstico bacteriológico y serológico de brucelosis animal. México CENID-Microbiología. INIFAP 1994
- 16 Díaz AE, Hernández AL, Valero EG, Velázquez QF, Diagnóstico de Brucelosis. México INIFAP, SAGAR 1998.
- 17 Diaz R, Blasco JM. Diagnostico inmunológico En: Bovis, Tratado de veterinaria practica Madrid España. Ed Luzans, 1986:55-69
- 18 Garza RJ. Respuesta inmune en bovinos su utilización en diagnóstico, vigilancia epidemiológica y prevención Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría; 1997,

- Cohma México (DF) Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. AC, 1997:100-103.
- 19 Huitrón NG Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina y brucelosis en el municipio de Juanacatlán Jalisco, (Tesis de Licenciatura) México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1998
- 20 Mancera MA Prueba del antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta Manual de procedimientos para el diagnóstico bacteriológico y serológico de brucelosis animal México CENID-Microbiología. INIFAP. 1994,
- 21 Manual de actualización técnica para la aprobación de Médicos Veterinarios como unidades de verificación en tuberculosis y brucelosis. México, SAGAR, FEDMVZ México 1996
- 22 Manual Merck de Veterinaria, Brucelosis bovina, 3ª ed. Barcelona España, Editorial Centrum, 1988.
- 23 Meyer ME. *Brucella*. Editores Biberstein EL, Zee CY Tratado de microbiología veterinaria. España: Ed Acribia, 1990.283-291
- 24 Moriyón UI. Estructura antigénica del género *Brucella*. En Bovis, Tratado de veterinaria práctica Madrid España Ed. Luzans, 1986.
- 25 Moriyón UI. Características estructurales y antigénicas de *Brucella* En: Diagnóstico de Brucelosis. Díaz. A.E., Hernández, A.L., Valero, E.G, Velázquez; Q.F., editores. INIFAP, SAGAR 1998 10-22
- 26 Moriyón UI, López-Goñi I Estructura genética y fisiología del género *Brucella* Departamento de Microbiología, Universidad de Navarra, España 1999
- 27 Nicolet J Compendio de bacteriología médica veterinaria, España, Ed Acribia, 1986 82-90

- 28 Nicoletti P Epidemiología, patogenia y cuadro clínico En: Bovis, Tratado de veterinaria práctica Madrid España. Ed. Luzans, 1986.
- 29 Nicoletti P Vaccination in bovine brucellosis. Networking in Brucellosis Research. Ed United Nations University Press, 1991,9 85-92
- 30 Norma Oficial Mexicana de Emergencia, NOM - EM- 011-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la brucelosis de los animales. 01-23-95
- 31 Norma Oficial Mexicana, NOM -041-ZOO -1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. 08-20-96
- 32 Norma Oficial Mexicana, NOM-022-SSA2-1994, Para la prevención y control de brucelosis en el hombre en el 1er nivel de atención.11-30-95
- 33 Olsen S, Palmer M Stevens M La nueva vacuna contra la brucelosis no causa falsos positivos. Hoard's Dairyman 1997:90
- 34 Orozco VL, Lopez FR, Díaz AE, Vázquez EJE, Hernández AL, Suárez GF. Vacunación con RB51 en un hato bovino con un brote activo de brucelosis. Memoria XXXV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 1999 octubre 19-25, Mérida (Yucatán) México
- 35 Palmer MV, Chevillie NF, Jensen AT. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51. Pathologic, Bacteriologic, and serologic findings. Vet. Pathol 1996, 33:682-691
- 36 Perez PL. Evaluación serológica de la vacuna de *Brucella abortus* cepa rugosa mutante por transposición, en un hato de bovinos con brucelosis. (Tesis de Licenciatura) Mexico Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, 1997.
- 37 Reyes PRM. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnosticas usadas en brucelosis bovina (Tesis de Licenciatura). México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 1996.

- 38 Roop II RM, Jeffers G, Bagchi T, Walker J, Enright FM, Schurig GG Experimental infection of goat fetuses in utero with a stable, rough mutant of *Brucella abortus* Res Vet Sci 1991;51:123-127
- 39 Sánchez CY, Piedra PL., González SM., Inmunología de la *Brucella abortus*, UAM, Departamento de producción agrícola y animal, México, [www.intramed.uam.mx/brucc/content.htm](http://www.intramed.uam.mx/brucc/content.htm). 1998
- 40 Schurig GG, Roop II RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus* Vet Microbiol 1991;28 171-188.
- 41 Schurig GG The role of cell mediated immunity in brucellosis, Networking in Brucellosis Research Ed United Nations University Press, 1991 Cap 10, p 93
- 42 Schurig GG Vacunas contra la brucelosis: Pasado Presente y Futuro, cepa RB51 Memorias 14ª Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero CIGAL 1998;45
- 43 Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Boletín informativo de epidemiología Brucelosis, una enfermedad actual. SNVE, SSA 1998 15:2
- 44 Stevens GM, Hennager SG, Olsen SC, Cheville NF Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51 J Clin Microbiol 1994; 1065-1066.
- 45 Stevens GM, Olsen SC, Pugh GW, Palmer MV. Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51 or 2308 Infect Immun 1994;62 8 3206-3212
- 46 Suarez GF Inmunología en brucelosis. Departamento de Microbiología e inmunología FMVZ. UNAM

- 47 Suarez GF Perspectivas en el diagnóstico y control de brucelosis Manual de procedimientos para el diagnóstico bacteriológico y serológico de brucelosis animal Mexico CENID-Microbiología. INIFAP.1994.
- 48 Thoen CO Enright F Cheville NF. *Brucella*. Editores Gyles CL Thoen CO En Pathogenesis of bacterial Infections in animals. Ed Iowa State University Press/Ames, 1993 20:236-247
- 49 Vega P Beber leche cruda, hábito peligroso. La brucelosis en México. La Jornada 1998 enero 26: Sec Ciencia
- 50 Zambrano AJ Eficacia de dosis reducidas en la vacunación de adultos de hatos vacunos infectados con brucelosis Networking in Brucellosis Research Ed. United Nations University Press, 1991:11. 97-105