

01674
14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

RESPUESTA INMUNE EN BOVINOS VACUNADOS
CON RB51, A LA EXPOSICIÓN NATURAL CON
Brucella abortus Y ELIMINACIÓN DE LA CEPA
VACUNAL EN LECHE Y EXUDADO VAGINAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MARISELA LEAL HERNÁNDEZ

TUTOR:

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES.

COMITÉ TUTORIAL:

M. en C. LAURA JARAMILLO MEZA.

DRA. GABRIELA BÁRCENAS MORALES.

MÉXICO, D. F.

2003.

A



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.

RESUMEN

Con el objetivo de contribuir al conocimiento de la respuesta inmune que se presenta en bovinos vacunados con *B. abortus* RB51 a la exposición natural de *B. abortus* y determinar la frecuencia de eliminación de la cepa vacunal. Se trabajó con cuatro grupos de animales 1) animales seropositivos a *Brucella* revacunados, de un hato infectado 2) animales seronegativos revacunados, de un hato infectado, 3) animales seronegativos revacunados, de un hato bajo control, 4) animales seronegativos no vacunados, de un hato libre. Para dar seguimiento a la respuesta humoral en los diferentes grupos de animales, se realizaron las pruebas de tarjeta, rivanol y ELISA-Indirecto con células completas de RB51 con conjugados anti-bovino IgG1, IgG2 e IgM. Para determinar y medir la respuesta celular se hizo la detección de Interferón- γ (IFN- γ), a partir de sangre completa estimulada con 10 $\mu\text{g/ml}$ de un extracto sonicado de RB51. Así como la prueba intradérmica con brucelina a los 300 días para los grupos 1 y 2, así como a los 420 días para el grupo 3. Se intentó el aislamiento de la cepa vacunal en muestras de leche y exudado vaginal. Los resultados del primer muestreo en el grupo 1 fueron a la prueba de tarjeta del 93% de positivos y 87% a rivanol, comportándose de manera similar hacia el final del trabajo. En el grupo 2, durante el último muestreo se presentaron 7.1% positivos a rivanol (2/28). En los grupos 3 y 4 los resultados a las pruebas serológicas fueron negativos. En el ELISA-I en los grupos revacunados (1, 2 y 3) los niveles son más elevados para IgG1 seguidos por IgG2, en los que alcanzó un nivel máximo al día 60 pos-revacunación. En el grupo 3 los niveles de IgG2 son más elevados que para IgG1. Para IgM en los grupos 1 y 2 se observó aumento durante los 150, 210 y 300 días, en cambio para el grupo 3 sólo se presenta un aumento para el día 180 posterior a la vacunación. No se obtuvo aislamiento de la cepa vacunal. La producción de IFN- γ en los grupos revacunados fue elevada comparando con el grupo negativo, lo que indica que la respuesta del IFN- γ fue dependiente del grado de estimulación antigénica presente. Los porcentajes de reactores a la prueba de intradermorreacción fueron los siguientes: en el grupo 1 el 40%, grupo 2 el 100 % y en el grupo 3 el 64%. La respuesta atípica presentada en las pruebas serológicas puede deberse al antecedente de una respuesta inmune primaria al estar en contacto con las cepas de campo. Las pruebas para evaluar la inmunidad celular fueron adecuadas y sugieren que la vacunación con RB51 confiere una buena inmunidad.

Palabras clave: Brucelosis bovina, *Brucella abortus*, RB51, revacunación, respuesta inmune, interferón- γ , Hipersensibilidad de tipo retardado.

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the immune response of vaccinated cattle with *B. abortus* RB51 subjected to a natural challenge with *B. abortus* field strain and determine the elimination of vaccine strain in milk or vaginal exudates. Four animals groups were used: 1) seropositive and revaccinated cows housed in an infected herd, 2) seronegatives and revaccinated cows, housed in an infected herd 3) seronegatives and revaccinated cows housed in a herd under control phase without positive animals, and 4) seronegatives and no vaccinated animals housed in a free herd. The humoral response was measure with card and rivanol tests, and Indirect ELISA with antigen of RB51 cells and anti-bovine conjugated IgG₁ and IgG₂ and IgM. The cellular response was measure by determination of Gamma-interferon (IFN- γ) production with stimulated blood (10 μ g/ml of RB51sonicated extract). Delayed type hypersensitivity was also used. Bacteriological studies for isolation of the vaccine strain were performed from milk and vaginal samples. Serological results at sampled day 0, in group 1 showed 93% of card test positives and 87% rivanol test positive. At the end of the study group 2 had 7.1% positives in rivanol test. In the groups 3 and 4, the serological results were negative. In the revaccinated groups (1, 2 y 3), the I-ELISA had the maximum level of IgG₁ at the day 60 posrevaccination. In group 3, the levels of IgG₂ were higher than those of IgG₁. The IgM antibodies in the groups 1 and 2, increment on days 150, 210 y 300, on the other hand in group 3 the increment was observed only on 180 post-revaccination. It was not possible to isolate the vaccine strain from the milk and vaginal exudates samples. The IFN- γ production in the revaccinated groups was higher than in the control group, it was possible to demonstrate that the amount of IFN- γ was related to the degree of antigenic stimulation. The DTH positive reactors were in groups 1, 2 and 3; 40%, 100% and 64% respectively. The atypical response showed in the serological tests, is attributed to the contact of the re-vaccinated animals with the field strain in those groups that were in contact with shedding animals. The tests used for T cell immune response evaluation, indicate that the RB51 vaccine is inducing and adequate immunity, but to be able to control and eradicate the disease it is necessary the implementation of a biosecurity program.

Key words: Brucellosis bovine, *Brucella abortus*, RB51, revaccination, immune response, interferon- γ , Delayed type hypersensitivity.

DEDICATORIAS

- A mis padres **Estela Hernández** y **Fernando Leal**, por ser los pilares más grandes en mi vida y quienes hasta el día de hoy han seguido siendo dándome ese apoyo tan grande para poder terminar mi trabajo, los quiero muchas gracias.
- A **Wilfrido Ramírez** por ser una parte importante en mi vida, sin tu ayuda y apoyo no hubiese podido seguir adelante. Gracias por estar cuando te necesito. Te Amo.
- A **Frida Isabel** por ser la razón más grande de mi vida y mi pequeño pretexto, por que quiero lo mejor para ti.
- A **Blanca** por tener la gran paciencia y amor para con mi pequeña gracias por tu tiempo.
- A **Imelda** por ser como eres y por todo tu apoyo recibido.
- A **Fernando** por tener tiempo para estar cuando te necesite.
- A mi pequeño **Angel** por acompañarme cuando tenías tiempo.
- A **Cecy, Sergio, Isaac** y **Dianita** por formar parte de mi vida y por darle sentido a esos pequeños momentos.

5

Agradecimientos

- A la Dra. Laura Jaramillo Meza por su gran paciencia, por su apoyo y por ayudarme en los momentos más difíciles y no dejarme desistir muchas gracias.
- Dr. Francisco Suárez Güemes por la confianza depositada para la realización del trabajo.
- Dr. Efrén Díaz Aparicio por sus oportunos comentarios y su ayuda y apoyo brindado.
- Al Dr. Fernando Díaz O. por los consejos y su ayuda recibida.
- Dra. Gabriela Barcenas M. por sus comentarios en la revisión del trabajo.
- Dr. Francisco Morales por tus consejos para no darme por vencida y por tu ayuda incondicional.
- MC Enrique Herrera por todas las veces que me acompañaste sin tu ayuda no hubiese sido tan fácil. Y a Gaby Palomares por su comprensión.
- Dr. Rafael Pérez Gracias por se que puedo contar contigo cuando te necesito, y por permitirme faltar cuando lo necesite.
- MVZ. José Gutiérrez por facilitarme la entrada y permitirme realizar este trabajo.
- Ing. Manuel Ballesteros A. y Miguel Ballesteros por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.
- Dr. Héctor Basurto por contactar a los ganaderos y facilitar la entrada al rancho.
- Dr. Vicente Lemus y Dra. Sara Lugo por abrirme las puertas del rancho y facilitarme los animales para mi trabajo.
- Dr. Carlos Vásquez Peláez por su valiosa ayuda, en el análisis estadístico.
- Dr. Fernando Osnaya Gallardo por sus oportunas observaciones en el análisis de resultados
- Antonio R. por que te lo debía gracias.
- A Sara Nieto por tu ayuda para terminar más rápido en la fase final del trabajo.
- A Sergio A, Ana Lydia, Armando, Sarita, Martín de la Rosa y todas las personas que me ayudaron en los diferentes muestreos Gracias.
- A la Dra. Tony, y Dra. Laura Zapata por confiar y facilitarme su equipo.
- A la UNAM por darme la oportunidad de seguir mi formación académica.
- Este trabajo fue financiado con recursos de los proyectos 31642-B y 31164-B del CONACYT.

CONTENIDO

Resumen

Abstract

1. Introducción

1.1 Características del agente	1
1.1 Características estructurales de las brucelas.	2
1.3 Importancia económica	4
1.4 Transmisión	4
1.5 Vacunación	5
1.6 Factores de virulencia	7
1.7 Aspectos inmunológicos	9

2. Antecedentes

13

3. Justificación

13

4. Hipótesis

15

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

15

5.2 Objetivo específicos

15

6. Material y métodos

16

7. Resultados

27

8. Discusión

49

9. Conclusiones

60

10. Literatura citada

61

F

1. INTRODUCCIÓN

La oficina Internacional de Epizootias (OIE) incluye a la brucelosis en su lista B, lo que define como: "enfermedad transmisible que se considera importante desde el punto de vista económico y sanitario, y cuyos efectos para el comercio internacional de animales y productos pecuarios no son desdeñables". En México se considera una enfermedad endémica y se han reportado todas las especies del género. FAO-OIE-WHO 1995

1.1 Características del agente

La *Brucella* es un patógeno intracelular facultativo, con morfología cocobacilar, con un tamaño de 0.6 a 1.5 μm de largo por 0.5 a 0.7 μm de ancho, son gram negativas, carecen de cápsula y son inmóviles. 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 crioprotectores) y descongelación varios años pero son destruidas por las temperaturas de pasteurización y calentamiento a 60°C durante 10 minutos, por desinfectantes como fenol, formol y cloro. *In vitro* puede variar su sensibilidad a los antibióticos, pero generalmente la afectan la estreptomycin, eritromicina y tetraciclinas Sagar 1996, Meyer 1990

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, recientemente se ha encontrado *B. maris* que afecta a mamíferos marinos. Sin embargo, no son específicos de estas especies y pueden contagiar otras especies animales si se llegan a estar en contacto con tejidos o material contaminado de animales infectados Díaz 1998.

Utilizando herramientas de biología molecular se ha demostrado que las seis especies de *Brucella* descritas, están fuertemente relacionadas, existiendo poca variación genética entre ellas. Con base en estos estudios se ha discutido si

se deben incluir en una sola especie, siendo esta *B. melitensis* y convirtiendo las ahora conocidas especies en biovariedades por ejemplo *B. melitensis* biovar *abortus*, biovar *suis*, biovar *neotomae*, etc; o si por el contrario la clasificación anterior debe prevalecer. Moriyón y López Goñi 2001

1.2 Características 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 periplásmico intermedio. La membrana externa esta en contacto con el medio y contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) Moriyón y López Goñi 2001

El LPS de la *Brucella* posee características moleculares y actividades biológicas diferentes al de las enterobacterias, 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 polisacáridica dirigida hacia el exterior, se acostumbra dividir esta parte en dos secciones: el núcleo, más interno y la cadena O.

El lípido A contiene epítopes comunes con el de las enterobacterias, aunque químicamente es diferente, ya que está formado por un disacárido de diaminoglucosa y otros ácidos de cadena larga. Como antígeno el lípido A, no parece tener relevancia diagnóstica.

La estructura del núcleo no se conoce a detalle, pero se sabe que contiene 2-ceto, 3-deoxioctonato (Kdo), glucosa, galactosa y quinovosamina son los componentes principales y carece de heptosa. Moriyón y López Goñi 2001

El género *Brucella* se divide en especies rugosas *B. ovis* y *B. canis*, que de forma natural carecen de la cadena O y especies lisas que si la poseen, como son: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. neotomae*, que pueden perderla accidentalmente o por mutación (mutantes rugosos ó R). La cadena O del LPS es un homopolímero lineal de N-formil perosamina en enlaces α 1,2 y/o α 1,3. La variación en los enlaces se relaciona directamente con la estructura de las especies de *Brucella*.

Es un antígeno inmunodominante en las infecciones por especies lisas de *Brucella*, así como en la vacunación con la cepa 19 y Rev 1. ^{Corbel 1991.} Los anticuerpos frente a la cadena O pueden ser detectados empleando suspensiones celulares en fase lisa o preparaciones enriquecidas con LPS-L. ^{Moriyón y López Goñi 2001}

Sin embargo, en las pruebas de diagnóstico se pueden detectar anticuerpos contra el LPS-L debidos a infecciones por otras bacterias Gram negativas como *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9, *Salmonella grupo N* (O:30), *Vibrio cholerae*, *Escherichia hermannii*, *E. coli* serotipo O:157, *Franciella tularensis* y *Pseudomonas maltophilia*, que también poseen derivados de perosamina en su LPS y que pueden dar reacción cruzada con el LPS del género *Brucella*. ^{Corbel 1991, Alton 1988, Moriyón y López Goñi 2001}

El LPS-L de *B. abortus* ha sido implicado en la disminución de diversas actividades bactericidas de los fagocitos y demuestra ser esencial para la sobrevivencia intracelular de la bacteria. ^{McQuinston 1999}

El LPS-L en su extremo terminal presenta moléculas de manosa que favorecen la adherencia a los fagocitos mononucleares (FMN) del huésped a través de los receptores de manosa. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa y este hecho junto con el tropismo por el eritritol explica la avidez de la brucela por el útero grávido. ^{Arestegui 2001.} Se ha demostrado que el eritritol estimula el crecimiento de *B. abortus*. La C-19 tiene poca capacidad para utilizar el eritritol por lo que su crecimiento es inhibido en presencia de este; la reducción de la virulencia de esta cepa se ha atribuido a la inhabilidad de metabolizar el eritritol ^{Pizarro 1999}.

Se ha sugerido que la presencia de este azúcar en la placenta de bovinos, pudiese ser el responsable de la localización selectiva de las cepas virulentas de *B. abortus* en este tejido, en donde se replica preferentemente en el retículo endoplasmático rugoso en los cotiledones de la placenta, la sintomatología se presenta durante la gestación y principalmente en su último tercio, cuando las concentraciones del azúcar son más altas la bacteria causa placentitis como

consecuencia disminuye la irrigación, hay necrosis y posteriormente el rechazo por la madre dando resultado muerte fetal y aborto. Sangari y Agüero 1996

La membrana externa de *B. abortus* contiene tres grupos de proteínas principales de la membrana externa, cuyo papel como antígeno es en gran parte desconocido. Sus características se resumen a continuación:

- Grupo 1: De peso molecular aparente de 88-94 K, posiblemente relacionada con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura.
- Grupo 2: De peso molecular aparente 36-38 K, equivalente a las porinas de otros gram negativos, formando un estado nativo de agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Dos genes, *omp2a* y *omp2b*, codifican estas porinas, pero solo el segundo parece expresarse *in vitro*.
- Grupo 3: Peso molecular aparente de 25-31 K y codificados en los genes *omp25* (único expresado en *Brucella*) y *omp31*. Mariyón y López Goñi 2001

1.3 Importancia económica

La importancia económica que representa la brucelosis es debida a las pérdidas en los animales productivos, al causar abortos, infertilidad, esterilidad, disminución de la producción de láctea de un 10 a un 20% e interrupción de los programas genéticos, mermando el valor en los animales enfermos y retraso en el crecimiento. Alvarado 1997.

1.4 Transmisión

De manera natural el microorganismo logra su entrada al cuerpo del animal como resultado de la ingestión de alimento contaminado, aerosoles, o por contacto con orina, fetos, líquido amniótico y membranas fetales de animales infectados, o bien en heces de animales recién nacidos. La transmisión venérea puede presentarse pero es rara. En el útero también se puede dar la transmisión directa. Las brucelas entran al organismo a través de las mucosas, conjuntivas y laceraciones de la piel. Pudiendo actuar como diseminadores de la enfermedad el hombre y otros animales. Muchas vacas infectadas excretan brucelas desde el

útero en parto normal, o de gestaciones que siguen a un aborto. El aborto generalmente se da sólo una vez y posteriormente las vacas se convierten en portadoras. Meyer 1990, SNVE 1998

1.5 Vacunación

La vacunación es una práctica primordial para el control y erradicación de la brucelosis. Un inmunógeno eficaz, que produce una respuesta inmune adecuada para el control, ha sido la vacuna cepa 19 de *B. abortus*, la cual ha jugado un papel fundamental en el programa de control de la enfermedad en los Estados Unidos, a partir de que fue introducida en el año de 1941, diez años más tarde se introdujo en México, en donde se utilizó a dosis clásica de 5×10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC), para vacunación de becerras de 3 a 8 meses de edad, y para el año de 1979 se inicio la vacunación de animales adultos con dosis reducida de 3×10^9 UFC. Sin embargo, el mayor obstáculo para usar esta cepa fue la persistencia de títulos serológicos, que son dirigidos contra la perosamina de la cadena O del LPS y que dificultaban el diagnóstico, el riesgo de aborto en 2 a 3%, y la eventual infección en animales gestantes o sexualmente maduros, e infecciones mamarias persistentes con excreción activa en leche de vacas, pudiéndose provocar la infección en el hombre, tras la inoculación accidental con esta cepa Cheville 1994, Blasco 2001, Luna 2002

En los intentos por producir una cepa que no ocasionara efectos secundarios, que confundieran el diagnóstico, surgió la cepa rugosa mutante RB51 de *B. abortus*, la cual se obtuvo a través de varios pases de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, al ser crecida en medios de cultivo que contenían penicilina y rifampicina. Resultando ser una cepa altamente atenuada y estable tanto *in vivo*, como *in vitro*, carente de cadena O del LPS siendo su característica rugosa muy estable. Schurig 1998. Los cambios en la morfología colonial (de lisa a rugosa) en especies de *Brucella*, está asociado con cambios en infectividad y antigenicidad. No se ha reportado la reversión a morfología colonial lisa y virulencia en la cepa RB51. Jensen 1996 La rugosidad de esta cepa se debe a la interrupción del gen *wboA*

en el elemento de inserción IS711, este gen es capaz de codificar para la enzima glicosil-transferasa, que es esencial en cepas lisas virulentas de *B. abortus* para la biosíntesis del antígeno O. Por lo que la interrupción de este gen da como resultado mutantes rugosos. ^{Vermulapalli 2000.} Otras características de esta cepa es que es ureasa (+), oxidasa (+) reducción de nitratos (-), y crece con 0.5% de eritritol. ^{Blasco 2001.}

La RB51 al ser una cepa rugosa, no induce la formación de anticuerpos que reaccionen a las pruebas de diagnóstico oficial, dando como resultado la diferenciación entre animales vacunados e infectados. Lo que en teoría permitiría el uso repetido de dosis vacunales, sin los problemas de interferencia en las pruebas diagnósticas. En estudios realizados en ganado bovino, se ha determinado que la bacteria es eliminada en un tiempo relativamente corto y ha mostrado su escasa capacidad para inducir localizaciones mamarias o placentarias y su característica abortiva es reducida. Cuando se usa una sola vacunación, su efecto protector es similar al que se inducía al emplear la vacuna C-19. En México la vacunación con esta cepa fue aprobada en 1997, la cual se lleva a cabo una vez en la vida entre los 3 a 6 meses con la dosis becerra (1×10^{10} UFC) o después de los ocho meses aplicando la dosis para vaca (3×10^9 UFC), de manera práctica en zonas endémicas de brucelosis en nuestro país, sólo se recomienda aplicar una vez la revacunación con RB51 ^{Schurig 1998, Blasco 2001, Luna 2002.} Olsen y cols. 1996 indican que la vacunación con la dosis reducida de RB51 protege al ganado adulto contra el aborto o la infección en animales expuestos a la cepa virulenta de *B. abortus*. La vacunación con RB51 confiere protección tanto en ratones como en bovinos, esta protección se basa en la inmunidad mediada por células y mientras que la repuesta de anticuerpos juega un papel menor en la protección. ^{Pasquali 2001}

1.6 Factores de virulencia

La brucela tiene diferentes mecanismos que le ayudan a establecerse para producir la enfermedad como son:

- Interferencia en la formación del fagolisosoma y modificación del tránsito intracelular.
- El LPS tiene un papel sustancial en la adherencia y sobrevivencia intracelular. Además es portador de los antígenos inmunodominantes, por lo que se considera responsable de la activación de linfocitos B (LB) y de la inducción de la respuesta inmune humoral.
- El peptidoglicano está asociado con las proteínas de membrana externa de la bacteria y actúa también como factor de virulencia, al interferir con la capacidad bactericida del suero; además, permite a la bacteria resistir los mecanismos de lisis ejercidos por los anticuerpos y el complemento.
- Las proteínas de choque térmico permiten la adaptación de la bacteria al aumento de temperatura, al pH bajo, y otros factores de estrés microambientales.

Aréstegui 2001

Posterior al proceso de fagocitosis *B. abortus* se localiza en los fagosomas y fagolisosomas de macrófagos. La bacteria generalmente se enfrenta a diferentes medio ambientes, en el fagosoma con un pH entre 5 y 6 y en el fagolisosoma con un pH de 4.5 a 5, libres de radicales oxidativos y enzimas lisosomales. ^{Jyhshiu 1995}

De manera general después de ser internalizadas por la célula, los microorganismos apatógenos o virulentos son alojados dentro del endosoma temprano. *Brucella* es incorporada dentro del fagosoma y permanece en los compartimientos hasta que la célula huésped muere. Después de su internalización *Brucella* se encuentra dentro de una vacuola caracterizada por marcadores de compartimientos precoces de la endocitosis (EEA1 y el receptor de la transferrina). La bacteria esta en ese momento se localiza dentro de un compartimiento multi-membranoso autofagosomal, después en los tiempos tardíos de la infección, las brucelas virulentas se encontraran presentes dentro del retículo endoplásmico en donde se replican. En los fagocitos no profesionales, *Brucella* se

localiza en estructuras parecidas a retículo endoplasmico, retarda la fusión con los lisosomas preformados y previene la interacción con los nuevos endosomas formados. Arenas 2000, Díaz y Arellano 2003

Las brucelas no virulentas que son utilizadas como vacunas vivas, como es el caso de las cepas RB51 y cepa 19 de *B. abortus*, tienen un tránsito intracelular diferente de las cepas virulentas, ya que en más del 90% de los casos, estas bacterias pasan por el endosoma temprano, el endosoma tardío y por último por los lisosomas en donde son destruidas y los péptidos son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie de la célula a las Th1 y Th2 para inducir una respuesta. Díaz y Arellano 2003

Los procedimientos que sigue la *Brucella* para controlar la maduración de su vacuola, comprenden por un lado la inhibición de las interacciones de la vacuola con los compartimentos tardíos de la endocitosis, y por otra parte en estimular la autofagia y/o el transporte retrogrado hacia la vía de exocitosis. Algunas bacterias, entre ellas la *Brucella* utilizan sus sistemas de secreción, que les permiten inyectar dentro del citoplasma de la célula hospedera, efectores bacterianos como son complejos de ADN-proteínas o proteínas las cuales modifican el metabolismo celular del hospedero y permiten así la sobrevivencia de las bacterias. Estos son los denominados sistemas de secreción bacteriana del tipo IV en *Brucella*, este sistema es codificado por la región *virB* del genoma de *Brucella*, que es un operón formado por 12 genes los cuales inducen específicamente una acidificación (pH 4) del fagosoma dentro de las células del hospedero posteriormente a la fagocitosis. Díaz y Arellano 2003

La primera mutante *virB* fue identificada en la mutante TnB1aM de *Brucella suis*. La región *virB* es esencial para la supervivencia y replicación intracelular de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*. Díaz y Arellano 2003

1.7 Aspectos inmunológicos.

La resistencia a patógenos bacterianos intracelulares facultativos como *Brucella*, depende de la inmunidad adquirida mediada por células, caracterizada por la activación de linfocitos T (LT) y subsecuente activación de macrófagos para incrementar la muerte de tales organismos ^{Zhan y Cheers 1995, Zhan 1996}.

El género *Brucella* es un microorganismo que se reproduce dentro de los monocitos (polimorfonucleares PMN), pero puede localizarse extracelularmente cuando las células infectadas se lisan, lo cual favorece el desarrollo tanto de una respuesta inmune celular, mediada principalmente por LT (CD4⁺ y CD8⁺) y una respuesta humoral mediada por linfocitos B (anticuerpos). Sin embargo, ambos tipos de respuesta se producen invariablemente y sin necesidad de que se desarrollen al mismo tiempo. ^{Díaz 1986, Corbel 1991, Golding 2001}

Las citocinas producidas por los fagocitos mononucleares durante la fagocitosis de la brucela son de gran importancia, ya que determinan el tipo de respuesta inmune que se despliega hacia la bacteria, las respuestas Th1 y Th2 resultantes son determinadas en parte, por los macrófagos durante su interacción con la *Brucella*. Diferentes citocinas están involucradas en la regulación de la actividad de los macrófagos, dentro de las cuales se incluyen: el Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina -12 (IL-12) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). Durante la infección aparecen Inf- γ , TNF- α , IL2, IL10 e IL12, para controlar el crecimiento de ambas cepas tanto virulentas como avirulentas de *B. abortus* en macrófagos de murinos, en tanto que IL1- α , IL4, IL6, y GMCSF no tienen efectos consistentes ^{Pizarro 1999}. Mientras que el TNF- α e IFN- γ parecen ser las citocinas más críticas en la resistencia específica y natural, la IL-12 tiene una participación destacada en el control oportuno de la infección en bacterias intracelulares. ^{Zhan 1996, Arestegui 2001}

La IL-12 juega un papel importante en la inducción de células T CD4⁺ para la producción de INF- γ *in vivo* e *in vitro*. Durante la infección por *B. abortus* se promueve la producción de Inf- γ y la eliminación de la bacteria *in vivo*. ^{Zhan, Cheers 1995} La delección de IL-12, exacerba la infección en *B. abortus*, *Mycobacterium* y

Listeria monocytogenes. Esta exacerbación está relacionada con el decremento de la producción de $\text{Inf-}\gamma$ por células T y signos de disminución en la actividad de los macrófagos ^{Zhan 1996}.

B. abortus es un fuerte inductor de células Th1 CD4 y de citocinas como $\text{IFN-}\gamma$. El $\text{IFN-}\gamma$ es un mediador de la respuesta inmune celular y se ha demostrado que es de suma importancia en el control de la infección en ratones. Los macrófagos activados por $\text{IFN-}\gamma$ controlan la replicación intracelular de *B. abortus* C-19 y C-2308, más efectivamente *in vitro* y la neutralización de $\text{IFN-}\gamma$ *in vivo* resulta en la baja habilidad para el control de la infección con cepas atenuadas como la C-19 en ratones. ^{Zhan 1993, Weynants 1995, Fernandes 1995} En macrófagos peritoneales activados con $\text{IFN-}\gamma$ la C-19 se elimina rápidamente mientras que la C-2308 tiene la capacidad de replicarse lentamente y no puede ser eliminada ^{Pizarro 1999}

El $\text{IFN-}\gamma$ tiene una participación importante en la resistencia adquirida contra las bacterias intracelulares. El interferón puede ser crucial durante las fases tempranas de la infección, pero en una infección ya establecida, este juega un papel menor en la resistencia. ^{Pasquali 2001} Su actividad está dirigida fundamentalmente hacia los fagocitos mononucleares, en los cuales se incrementan la actividad fagocítica y bactericida; además favorece el procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos mediante otros estímulos, provistos por el LPS de la bacteria y el $\text{TNF-}\alpha$ endógeno, con el propósito de promover el aumento en la producción de citocinas que estimulan la inflamación, la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II. ^{Aréstegui 2001}

La activación apropiada de las células CD4^+ , resulta en su diferenciación a células efectoras y en células de memoria. Las citocinas producidas por las células T activadas determinan la subpoblación de dichas células; la subpoblación Th1 secreta IL-2 e $\text{IFN-}\gamma$; mientras que las células Th2 secretan principalmente IL-4 e IL-5. La naturaleza de los antígenos, probablemente es la responsable de modular el tipo de respuesta que se favorece por las células Th1 o Th2. Las citocinas

secretadas por las células T CD4⁺ proveen de ayuda tanto a las células T CD8⁺, como a los LB, induciendo su diferenciación a células efectoras, células citotóxicas y células que secretan anticuerpos, respectivamente. ^{Golding 2001. Vermaulpalli 2000a, Weynants 1998.}

De manera análoga a los linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺ se diferencian en células T citotóxicas tipo 1 (Tc1) y células Tc2 dependiendo del perfil de la secreción de citocinas. La subpoblación Tc1 predomina en la respuesta citotóxica hacia bacterias intracelulares y secretan principalmente IFN- γ e IL2 como las Th1 ^{Golding 2001.}

En muchas infecciones, como en el caso de *B. abortus* participan e interactúan diferentes poblaciones celulares del sistema inmune, las llamadas células presentadoras de antígenos (APCs), células asesinas naturales (NK), y LB que actúan juntas para proveer una respuesta coordinada ^{Golding 2001.}

La respuesta humoral es mediada por LB, los que al ser estimulados por el antígeno se transforman en células plasmáticas, que son los que se van a encargarse de la producción de anticuerpos. Así mismo, los LB se transforman en células de memoria para la protección del hospedero en reinfecciones por el mismo agente ^{Bustamante 1998.}

Por su localización en la superficie de la célula y su alta inmunogenicidad, el LPS es el primer antígeno frente al que aparecen anticuerpos de los tipos IgM, IgG1 e IgG2; a nivel de mucosas intervienen además los anticuerpos de la clase IgA, los cuales se desarrollan en los procesos infecciosos, así como en la vacunación.

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) ^{Diaz 1986.}

Se ha observado que después de la primoinfección, por una cepa de campo virulenta de *B. abortus*, se producen anticuerpos de tipo IgM permaneciendo constante su concentración de una a tres semanas, los cuales pueden detectarse

por pruebas de aglutinación, fijación del complemento (FC) y prueba de anillo en leche; posteriormente se producen los anticuerpos de tipo IgG, que se incrementa hasta ser dominantes; generalmente la subclase IgG₁ es la más abundante, persistiendo títulos aglutinantes hasta por diez meses, también podemos observarla con la prueba de FC. El nivel de IgM baja paulatinamente, en tanto que la IgG y la IgA persisten en concentraciones altas. La vacunación con la C-19 ha mostrado la capacidad de conferir una sólida inmunidad. En el monitoreo de los niveles de anticuerpos se ha observado que los títulos de IgM persisten por más tiempo, mientras que los de IgG descienden, haciéndose imperceptibles por los métodos serológicos convencionales alrededor de los ocho meses. ^{Corbel 1991} Por otro lado, se ha observado que los animales pueden contraer la infección antes y después de nacer, sin que se produzcan anticuerpos detectables hasta la **gestación** ^{Díaz 1986, Norm 1994, Schurig 1998}.

2. ANTECEDENTES

Previo a este estudio, se realizó un trabajo donde se vacunó un grupo de 35 animales en un establo en fase de control de brucelosis, los cuales posteriormente se introdujeron a un hato con una alta prevalencia del 39% de la enfermedad, en donde fueron revacunados. Los resultados obtenidos en las pruebas serológicas fueron negativos en el establo en fase de control. Una vez al entrar en el establo de alta prevalencia y estar en contacto con cepas de campo, después de un año el 6% de los animales presentaron serología positiva a las pruebas de diagnóstico oficial. A los 35 animales se les aplicó la brucelina a los 405 días posvacunación y el 91% de las becerras presentaron una reacción, que se considera positiva cuando existe un incremento superior o igual al 20% a las 72 h posinoculación, en relación a la medida del grosor de la piel al momento de aplicar la brucelina. Así mismo se logró el aislamiento de 65 cepas identificadas como *B. abortus* biotipo 1, de las cuales 64 correspondían a cepas lisas y una correspondió a cepa rugosa vacunal, esta última fue aislada a partir de leche y exudado vaginal (de un animal que nunca presentó serología positiva a las pruebas de diagnóstico oficial).^{Leal 2000a, b.}

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se ha observado que algunos animales revacunados con la cepa RB51, resultan ser positivos durante tres o cuatro meses a la prueba de tarjeta y posteriormente se vuelven negativos, no existiendo referencias de que esta situación se presente con el empleo de dicha vacuna, empleando las pruebas de diagnóstico oficial. Se desconoce cual es la respuesta inmune en animales revacunados en zonas de alta prevalencia y si ésta es debida a la vacunación o a la exposición natural hacia la bacteria, esto último podría reflejar una baja inmunidad inducida por la vacunación con RB51, lo anterior ha motivado que se lleve a cabo un estudio de evaluación de la inmunidad celular y humoral inducida por la RB51.

Debido al papel central que juega el INF- γ en la respuesta celular a la resistencia y protección hacia bacterias intracelulares, se pretende evaluar los niveles de producción de esta citocina después de una estimulación *in vitro*, en animales vacunados y revacunados, con el fin de determinar las variaciones de sus niveles de producción, evaluando y comparándolos en los diferentes grupos de animales estudiados.

Por otro lado, Schurig 1991 menciona que la cepa vacunal no se elimina por ningún tipo de secreción y esto representa una ventaja para su uso. Sin embargo, hemos encontrado algunas evidencias de que esto no es totalmente cierto, por lo tanto existe la preocupación por determinar el grado de eliminación de la cepa en animales revacunados.

4. HIPÓTESIS

La vacuna RB51 induce una respuesta inmune celular y humoral significativa, capaz de controlar la infección natural y que la cepa RB51 puede ser eliminada en leche y exudado vaginal, en las vacas revacunadas con dosis reducida

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta inmune que se presenta en bovinos revacunados con RB51 a la exposición natural de *B. abortus* y determinar la frecuencia de eliminación de la cepa vacunal.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Evaluar la respuesta inmune (humoral y celular) que se presenta en bovinos revacunados con RB51, a la exposición natural de *B. abortus*.

5.2.2 Determinar la eliminación de la cepa RB51 de *B. abortus* mediante el aislamiento bacteriológico, en vacas revacunadas, recién paridas, a partir de muestras de leche y exudado vaginal.

5.2.3 Determinar la incidencia de la enfermedad en los hatos revacunados, con la cepa RB51 de *B. abortus* de los animales en estudio.

5.2.4 Evaluar y comparar la producción de Inf- γ inducido por la estimulación *in vitro* de células sensibilizadas presentes en cultivos de sangre completa, mediante el empleo de antígenos de *B. abortus*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales:

Se trabajó con un total de cuatro grupos de vacas; dos de los grupos en un mismo hato estabulado en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca (con una prevalencia de 39.2% de brucelosis), un grupo en pastoreo en Tepetzotlán Edo de México (Hato en fase de control), y un grupo en pastoreo en Martínez de la Torre Veracruz (Hato libre).

Grupo 1: 30 Animales seropositivos que fueron revacunados con RB51, y eran residentes en hato infectado. (Tizayuca, Hidalgo)

Grupo 2: 30 Animales seronegativos que fueron revacunados con RB51, que eran residentes en hato infectado. (Tizayuca, Hidalgo)

Grupo 3: 35 Animales seronegativos que fueron 2 revacunados con RB51, en hato en fase de control de brucelosis (Tepetzotlán, Edo. de México)

Grupo 4: 40 Animales seronegativos de un hato negativo. (Martínez de la Torre, Veracruz.)

6.2 Vacuna:

La revacunación de los tres grupos (1, 2 y 3) se realizó con RB51 de *B. abortus* a una dosis de 3×10^9 UFC. Los grupos 1 y 2 se revacunaron 4 meses antes de iniciar el trabajo y se revacunaron nuevamente 4 meses después de iniciado este. El grupo 4, no fue vacunado.

6.3 Toma de muestras

La toma de muestras de sangre para serología y para el ensayo de IFN- γ , se realizaron de manera periódica cada 30 días hasta 270 días posvacunación. Se realizaron 2 muestreos generales en los establos. El primer muestreo fue para determinar la prevalencia inicial de brucelosis en los establos (día 1). El segundo muestreo, a los 6 meses para determinar la incidencia. Las muestras de leche

para intentar el aislamiento bacteriológico, se obtuvieron de vacas recién paridas que estuvieran dentro del primer mes posparto y se almacenaron en refrigeración, procesándose el mismo día de la toma y posteriormente se almacenaron en congelación a -20°C .

Las muestras de exudado vaginal para aislamiento bacteriológico, se obtuvieron de vacas recién paridas hasta un mes posparto, se trasladaron al laboratorio para su análisis en medio de transporte con refrigerantes, procesándose el mismo día de la toma.

6.4 Antígenos (Ag):

6.4.1 Prueba de tarjeta: se uso antígeno brucelar amortiguado estable, obtenido a partir de la cepa 1119-3 de *B. abortus*, a una concentración celular del 8% en amortiguador de lactato; a pH 3.5 y teñido con rosa de bengala. (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios).

6.4.2 Prueba de rivanol: Se utilizó antígeno elaborado con la cepa 1119-3 de *B. abortus*, a una concentración celular del 4%, con un pH 5.8-6.2 y teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta (PRONABIVE).

6.4.3 Prueba de ELISA. Se utilizó un antígeno de células completas a partir de la cepa RB51 de *B. abortus*.

6.4.4 Prueba de Hipersensibilidad de tipo retardado (DTH): "Brucelina" (extracto proteico de *Brucella*) proporcionado por la MC Laura Hernández A. CENID-Microbiología.

6.4.5 Detección de INF- γ : Los extractos de *Brucella* que se evaluaron para la estimulación de células en la prueba de Inf- γ fueron: Proteínas de Membrana Externa (PME), Proteínas de Membrana Interna (PMI), Extracto de la bacteria

sonicada (S), Citosol (C), LPS-Liso (*B. abortus* cepa-19), LPS-Rugoso (*B. abortus* cepa-RB51) y Concanavalina A.

6.5 Obtención de proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*.

Se cultivó la cepa RB51 de *B. abortus* a 37° durante 48 h con 10% CO₂ en agar *Brucella*.

Se inactivó con formol 4% durante 24 h.

Se centrifugó 15000 g, 15 m a 4° y se lavó con Hepes (N-[2-hidroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 10 mM dos veces.

Se resuspendió el paquete celular en Hepes con inhibidores de proteasas (PMSF 0.1 M [(phenylmethylsulfonyl)- fluoride; α -toluenesulfonyl- fluoride) p-hidroxy meruribenzoicacid] y EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1mM)

Se sonicó a 10 pulsaciones por 10 segundos en 3 ocasiones (se realizó un frotis para comprobar el rompimiento celular)

Se centrifugó 50 000 g 1 h a 4° para separar las PME de PMI.

Se descartó el sobrenadante y se agregó Hepes + Sarcocyl al 1% al paquete celular.

Permaneció en agitación durante 30 m.

Se centrifugó 50 000 g. 1 h. 4° C y se separó las PME.

Se agregó 400 μ l de metanol y se agitó.

Se centrifugó 15000 g. 20 m.

Se desechó el sobrenadante. El sedimento de proteína se dejó secar.

Para reconstituir se agregaron 300 μ l agua destilada. Se cuantifico la cantidad de proteína mediante la técnica de Bradford.

6.6 Protocolo para la obtención de LPS de *Brucella abortus* a partir de células completas.

Se cultivaron las cepas 19 y RB51 de *B. abortus* en caldo *Brucella* 48 h, a 37° con 10 % de CO₂.

Se inactivó con formol al 4% durante 24 h, y se comprobó la inactivación.

Se centrifugó a 7500 g, 20 m y se pesó.

Se lavó con solución salina o con PBS estéril.

Se metió en autoclave a 121° por 15 m.

Se centrifugó 12000 g durante 30 m, se desechó el sedimento y se precipitó el sobrenadante con 3 vol. de etanol frío por 24 h, se manteniéndose en refrigeración con agitación.

Se centrifugó a 5000 g, 15-20 m a 4°. El primer precipitado se disolvió en agua destilada.

Se dializó durante 48 h (H₂O destilada). ^{Díaz 1981}

6.7 Obtención de antígeno a partir de células completas de *B. abortus*.

Se cultivó la cepa RB51 de *B. abortus* en caldo *Brucella* a 37° durante 48 h con 10% de CO₂ y permaneció en agitación a 125 rpm

Se inactivó durante 1h a 60°

Se realizaron 3 lavados con PBS centrifugando a 3440 g, 15 m a 4°

Se desecho el sobrenadante y se peso el paquete celular

Se ajustó a una concentración de 4% peso /volumen

Fue titulado para su uso en los inmunoenzayos y se mantuvo en refrigeración a 4°

Alfonseca 1998

6.8 Pruebas serológicas.

6.8.1 Prueba de **tarjeta**. Se les practicó a todos los sueros considerando positivos los que presentaron cualquier tipo de aglutinación.

6.8.2 Prueba de **rivanol**. Se les realizó la prueba como confirmatoria a los sueros de los animales que resultaron positivos a la prueba de tarjeta, de acuerdo a la metodología descrita por Alton et al (1988).

6.8.3 Prueba de **Inmunoensayo enzimático-Indirecta (ELISA-I)** se les realizó a todos los sueros, utilizando conjugados **anti-bovine IgG1** producido en ovinos, **anti-bovine IgG2** producido en ovinos, conjugados con peroxidasa (Laboratorios Bethyl. Inc. Texas USA) y un monoclonal de **anti-bovine IgM** derivado de hybridoma producido por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de raton inmunizado (Sigma-Aldrich USA).

6.8.3.1 Protocolo para la realización de ELISA INDIRECTA con antígeno de células completas de la cepa RB51 de *B. abortus* para detección de IgG1 e IgG2

Sensibilización de la placa con antígeno. Se realizó en microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NUNC MaxiSorp). Se adicionó el Ag a una concentración celular de 4% se diluyéndose a 1:100 en solución amortiguadora de carbonatos, 0.06 M pH 9.6 y se agregaron 100 µl en cada pozo de la placa. Se tapó la microplaca con plástico auto adherible y se incubó a temperatura ambiente por 24 h.

El antígeno no adsorbido se eliminó mediante cinco lavados con 150 µl, de una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2 con 0.05% Tween 20 (PBS-T)

Se secó bien la placa, se cubrió con plástico auto adherible (se guarda en refrigeración a 4°C hasta por 6 meses).

Bloqueo de la placa

Una vez que se pegó el antígeno a las microplacas, se colocaron 100 µl de una solución bloqueadora de gelatina al 3% en PBS.

Se incubó por una hora a 37° C y se lavó cinco veces con 150 µl de PBS-T.

Realización de la técnica.

Se adicionaron 100 µl de los sueros controles y de los sueros problema por duplicado, a una dilución 1:100 en PBS-T en orden de columnas.

Los pozos A1 y B1 se dejaron vacíos y se utilizaron como blanco.

Se cubrió la placa y se incubó a 37° por una hora y se lavó cinco veces con 150 µl de PBS-T.

Conjugado.

Se probaron los diferentes conjugados anti-IgG1, anti-IgG2 los cuales fueron previamente titulados para conocer la dilución más adecuada para su uso, siendo esta de 1:4000 para anti-IgG1 y 1:1000 para el conjugado de anti-IgG2. Se colocaron 100 µl en cada pozo de la dilución establecida en PBS-T del conjugado y se incubó por una hora a 37° C.

Se lavó cinco veces con 150 µl de PBS-T

Cromógeno sustrato.

Se agregaron 100 µl en cada pozo del sustrato (10 ml de buffer citratos 0.05 M H 5 se adicionaron 4 mg de ortofenilendiamina y 4 µl de peróxido de hidrogeno al 3%) se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad.

Se detuvo la reacción a los 20 m mediante la adición de 50 µl por pozo de una solución de H₂SO₄ 2 M.

Se realizó la lectura de la densidad óptica con lector de microplacas a una longitud de onda de 492 nm con filtro de referencia de 650 nm.

Interpretación de resultados: Se obtuvo la densidad óptica de cada suero, y se determinaron los promedios por grupo para ser graficados.

6.8.3.2 Protocolo para la realización de ELISA INDIRECTA con antígeno de células completas de la cepa RB51 de *B. abortus* para detección de IgM

Sensibilización de la placa con antígeno. Se realizó en microplacas de poliestireno de fondo plano. (NUNC MaxiSorp). El Ag se utilizó a una concentración de 4% se diluyéndose 1:100 en solución amortiguadora de carbonatos, 0.06 M pH 9.6 y se agregaron 100 μ l en cada pozo de la placa. Se tapó la microplaca con plástico auto adherible y se incubó a temperatura ambiente durante 24 h.

El antígeno no adsorbido se eliminó mediante cinco lavados con 150 μ l, de una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2 con 0.05% Tween 20 (PBS-T).

Se secó bien la placa, se cubrió con plástico auto adherible (se puede guardar en refrigeración a 4°C).

Bloqueo de la placa

Una vez que se pegó el antígeno en las microplacas, se colocaron 100 μ l de una solución bloqueadora de gelatina al 3% en PBS.

Se incubó por una hora a 37° y se lavó cinco veces con 150 μ l de PBS-T.

Realización de la técnica.

Se adicionaron 100 μ l de los sueros controles y de los sueros problema por duplicado, a una dilución 1:200 en PBS-T en orden de columnas.

Los pozos A1 y B1 se dejaron vacíos y se utilizaron como blanco.

Se cubrió la placa y se incubó a 37° por una hora y se lavó cinco veces con 150 μ l de PBS-T.

Primer anticuerpo.

Se colocaron 100 μ l por pozo del monoclonal anti-IgM a una dilución 1:1000 en PBS-T.

Se cubrió la placa y se incubó a 37° 1h, se lavó cinco veces con 150 μ l de PBS-T y se secó la placa.

Conjugado.

Se colocaron 100 μ l del anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa desarrollado en cabras (Sigma-Aldrich USA) a una dilución 1:3000 en PBS-T

Se cubrió la placa y se incubó por una hora a 37° C. Se lavó cinco veces con 150 μ l de PBS-T.

Cromógeno sustrato.

Se agregaron 100 μ l en cada pozo del sustrato (a 10 ml de buffer citratos 0.05 M H 5 se adicionaron 4 mg de ortofenilendiamina y 4 μ l de peróxido de hidrogeno al 3%) se incubó a temperatura ambiente en la obscuridad.

Se paró la reacción a los 20 m mediante la adición de 50 μ l por pozo de una solución de H₂SO₄ 2 M.

Se realizó la lectura de la densidad óptica con lector de microplacas a una longitud de onda de 492 nm con filtro de referencia de 650 nm.

Interpretación de resultados: Se obtuvo la densidad óptica de cada suero, se obtienen promedios por grupo y se graficaron.

6.9 Pruebas bacteriológicas.

El aislamiento bacteriológico a partir de muestras de leche y de exudado vaginal, obtenidas después del parto de los animales, se realizó inoculando en medios de Farell y de agar *Brucella*, permaneciendo en incubación a 37° con 10% CO₂ de 3 a 10 días. Se realizó la identificación de las bacterias, mediante pruebas bioquímicas, haciendo la diferenciación entre cepas lisas o rugosas de *B. abortus*, mediante las pruebas de aglutinación con acriflavina, tinción con cristal violeta y sensibilidad a antibióticos ^{Alton 1988}.

6.10 Pruebas de inmunidad celular

6.10.1 Producción de IFN γ . Para la realización de esta prueba, se llevó a cabo un análisis previo, evaluando diferentes antígenos y mezclas antigénicas en grupos de animales vacunados y sin vacunar, positivos y negativos a las pruebas serológicas de tarjeta y rivanol a fin de determinar cual o cuales antígenos inducían una mayor producción o liberación de IFN- γ , en cultivos de sangre completa, la evaluación de la citocina se realizó empleando el kit BOVIGAM (Kit BOVIGAM Trademark of CSL Veterinary Australia).

Las concentraciones de los extractos empleados fueron de 10 μ g, 5 μ g, 2.5 μ g/ ml, para PME, PMI, extracto sonicado de la bacteria, citosol, concanavalina A (control positivo); para LPS -L y LPS -R se usaron 5 μ l, 10 μ l y 15 μ l por pozo, y un control negativo.

Los grupos de animales para el análisis previo:

Grupo A. Cinco animales revacunados (positivos a serología en hato infectado).

Grupo B. Cinco animales revacunados (negativos a serología en hato infectado).

Grupo C. Cinco animales vacunados (negativos a serología en hato en fase de control).

Grupo D. Cinco animales sin vacuna (negativos a serología en fase de control).

Estimulación de sangre completa.

Se obtuvo sangre heparinizada que fue transportada en refrigeración y procesadas en un periodo no mayor a 18 h.

Se llevaron a cabo los cultivos de sangre completa de cada uno de los animales colocándose 750 μ l por pozo de la muestra en las placas de 48 pozos (NUNC) en condiciones de esterilidad.

Fueron estimulados con los extractos en sus diferentes concentraciones por pozo y se dejó el control de la muestra de sangre sin estimular, se incubó 24 h a 37° en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Se colectó el plasma y se conservo a 70° hasta su uso.

La producción de Inf- γ se evaluó mediante un ELISA empleando un kit comercial.

Se adicionaron 50 μ l de diluyente verde (indicado del sistema) a cada pozo, y se adicionaron 50 μ l de las muestras de los sobrenadantes de las células estimuladas en cultivo con el antígeno, y de los controles (+/-) en los pozos con el diluyente. Se mezcla en un agitador para placas por 1 m o pipeteando cinco tiempos.

Se cubrieron las placas con su tapa y se incubaron a temperatura ambiente (22 +/- 5° C) por 60 m.

Se eliminó su contenido y se lavaron 6 veces.

Se adicionaron 100 μ l de conjugado a cada pozo y se mezcló como en el paso 2.

Se cubrieron las placas con su tapa y se incubaron como en el paso 3 por 60.

Se lavaron 6 veces las placas.

Se adicionaron 100 μ l de la solución enzima sustrato a cada pozo. Se mezcló en un agitador para placas por 1 m o pipeteando cinco tiempos.

Se cubrieron las placas con su tapa y se incubaron a temperatura ambiente (22 +/- 5° C) por 30 +/- 5 m protegiéndolas de la luz directa.

NOTA: Se inició el tiempo de incubación cuando se agregó el sustrato al primer pozo.

Se adicionaron 50 μ l de la solución de paro a cada pozo, y se mezcló con una agitación suave.

NOTA: La solución de paro se agregó en el mismo orden, en el que se adicionó el sustrato de la enzima.

Los resultados fueron expresados en índices de estimulación (IE), que se obtuvieron mediante la siguiente fórmula: La media de la DO de la muestra estimulada dividido por la media de la DO del control sin estimular. Rothel 1990, Rhodes

2000

6.10.2 Prueba de intradermorreacción

A los animales de los grupos revacunados se les realizó la prueba de intradermorreacción, en los grupos 1 y 2 a los 300 días y en el grupo 3 después de 420 días posvacunación utilizando la "brucelina".

Se depiló un área de 3 x 3 cm en la región del cuello de los animales.

Se realizó la medición inicial del grosor de la piel utilizando un vernier.

Se inoculó la brucelina a dosis de 0.1 ml por vía intradérmica.

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

La prueba se consideró positiva cuando el aumento en el grosor de la piel, fuese 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 ^{Bercovich 1990,} Chevillat 1993, Blasco 1994, Pérez 1997.

6.11. Análisis estadístico

Se realizó la comparación de datos entre grupos, por medio de un análisis de varianza con el programa SAS con un procedimiento GLM. En donde los resultados en la prueba de ELISA-I los valores ($P < 0.05$) fueron considerados como significativos. Y para en el análisis de la producción de Interferón- γ los valores \neq ($P \leq 0.01$) fueron considerados como significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Estudio serológico

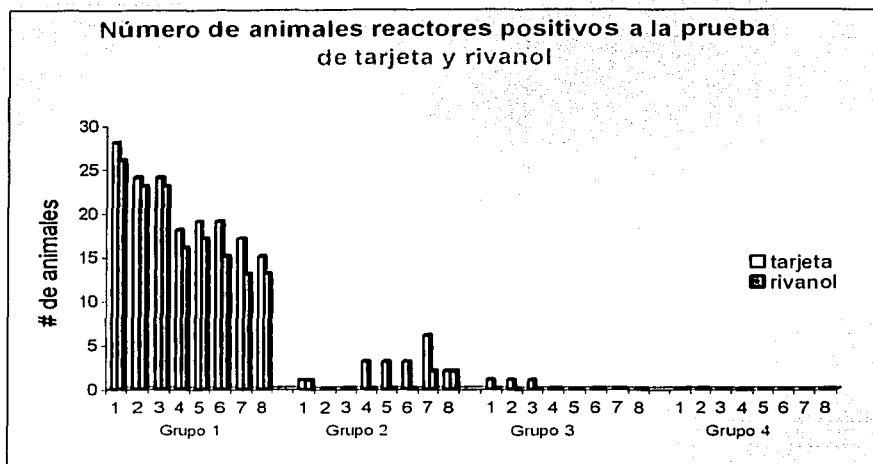
En la **Tabla 7.1.1** se muestran los resultados obtenidos a las pruebas serológicas de tarjeta y rivanol, expresados en número de animales positivos y sus porcentajes. En el grupo 1, se presentó el 93% positivos a la prueba de tarjeta y 87% a rivanol para en primer muestreo, comportándose de manera similar al final del trabajo. En el grupo 2, se presentaron animales positivos a la prueba de tarjeta y negativos a rivanol, convirtiéndose en negativos para los siguientes muestreos, con excepción del último muestreo, en el cual se presentaron dos animales positivos a rivanol con títulos de 1:200 y 1:400. En el grupo 3, se presentó un animal sospechoso a la prueba de tarjeta, pero negativo al ser confirmado con rivanol y en el grupo 4, los resultados a las pruebas serológicas fueron negativos en todos los muestreos.

En la **Gráfica 7.1.1** se muestran los resultados por grupo a las pruebas de tarjeta y Rivanol durante los diferentes muestreos. El grupo 4 que era el control negativo, fue 100% negativo en todos los muestreos.

Tabla 7.1.1: Resultados a las pruebas de tarjeta y rivanol, de grupos revacunados con RB51, durante los muestreos posrevacunación.

Muestreo	Grupo	total animales	Positivos a tarjeta	%	Positivos a rivanol	%
1	Grupo 1 seropositivos revacunados (Hato infectado)	30	28	93.3	26	86.6
2		27	24	89	23	85.2
3		27	24	89	23	85.2
4		24	18	75	16	66.7
5		23	19	83	17	73.9
6		21	19	91	15	71.4
7		20	17	85	13	65
8		19	15	79	13	68.4
1	Grupo 2 seronegativos revacunados (Hato infectado)	31	0	0	0	0
2		31	1	3.2	1	3.2
3		30	0	0	0	0
4		30	3	10	0	0
5		30	3	10	0	0
6		29	3	10.3	0	0
7		28	6	21.4	2	7.14
8		27	2	7.4	2	7.4
1	Grupo 3 seronegativos revacunados (Hato en control)	35	1	2.9	0	
2		35	1	2.9	0	
3		35	1	2.9	0	
4		35	0	0	0	
5		34	0	0	0	
6		34	0	0	0	
7		34	0	0	0	
8		29	0	0	0	
1	Grupo 4 seronegativos (Hato libre)	41	0		0	
2		41	0		0	
3		40	0		0	
4		39	0		0	
5		40	0		0	
6		41	0		0	
7		38	0		0	
8		38	0		0	

Gráfica 7.1.1: Número de animales reactivos a las pruebas de tarjeta y rivanol, en los diferentes muestreos posteriores a la revacunación con RB51.

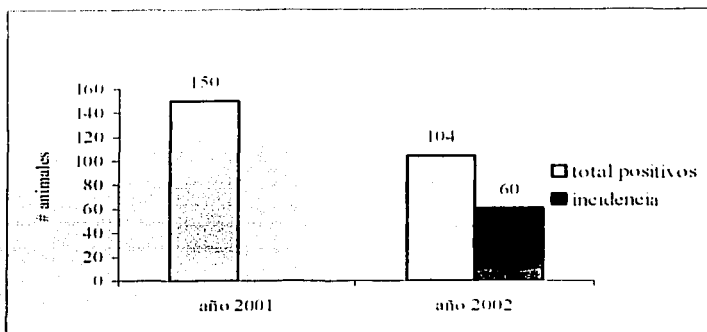


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

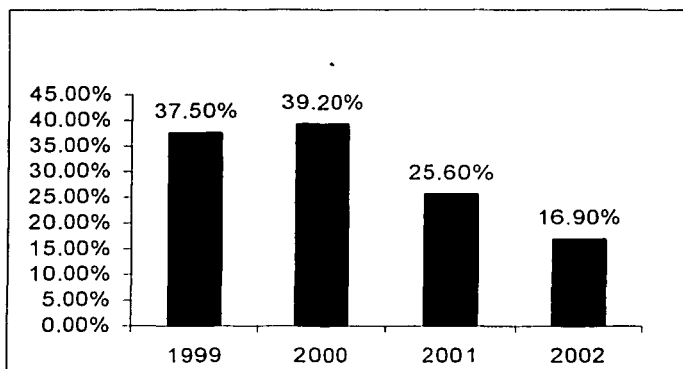
7.1.2. Incidencia en el establo de los grupos 1 y 2.

Los grupos 1 y 2, provenían del mismo establo con un total de 585 animales, un muestreo realizado a los 180 días de iniciado el trabajo sirvió para determinar la incidencia la cual fue de 10%, resultados que se muestran en las **Gráficas 7.1.2 y 7.1.3**. En donde además en esta última gráfica se presenta una comparación con las prevalencias de tres años anteriores.

Gráfica 7.1.2. Resultados obtenidos de las pruebas de diagnóstico serológico, para determinar la incidencia a los 180 días en el establo al cual pertenecían los grupos 1 y 2.



Gráfica 7.1.3. Prevalencia del día 180 en el establo al que pertenecían los grupos 1 y 2, comparándolo con prevalencias de tres años anteriores.



7.1.4 Pruebas de ELISA-I

En los grupos 1 y 2, la respuesta a **IgG1** mostró una elevación a los 180 días y 270 posrevacunación. Alcanzó sus niveles más altos al día 90 posteriores a la revacunación, empezando a descender a los 120 días; entre estos grupos los niveles siguen un comportamiento similar. (**Gráfica 7.1.4.1a**) En el grupo 3, se observa un aumento a los 30 días posrevacunación que alcanzó su nivel máximo en el día 60, descendiendo a partir del día 90. En el grupo 4, los niveles fueron bajos en los diferentes muestreos. (**Gráfica 7.1.4.1b**).

Para **IgG2**, en los 3 grupos revacunados la respuesta se eleva en el día 30 posrevacunación, alcanzando un nivel máximo en el día 60, disminuyendo hacia el día 90. En el grupo control negativo, los niveles se observan muy por debajo de los otros grupos (**Gráfica 7.1.4.1a y b**)

En la detección de anticuerpos para **IgM** en los grupos 1 y 2, se presentaron varios aumentos a los 150, 210 y 300 días (**Gráficas 7.1.4.3a**); en cambio para el grupo 3, sólo se presentó un aumento para el día 180 posterior a la revacunación; el grupo control negativo no presentó diferencias con respecto al grupo 3 (**Gráficas 7.1.4.3b**).

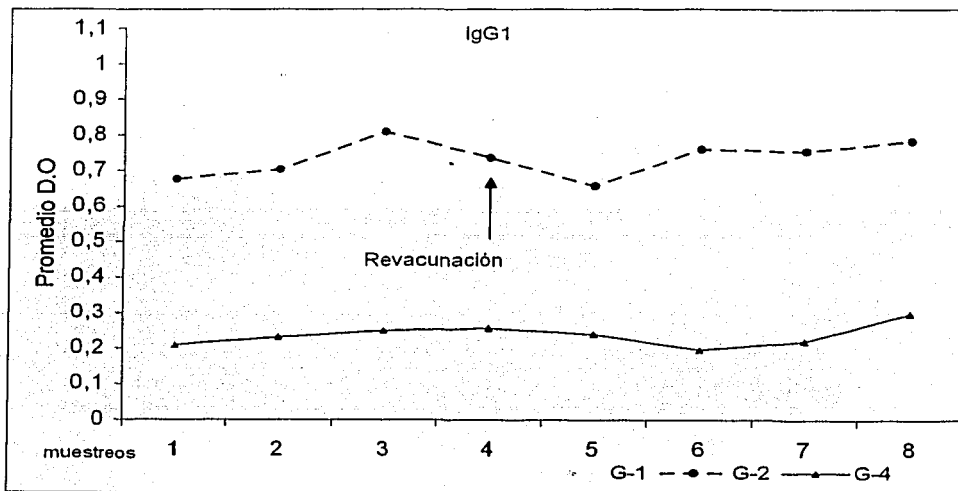
Los resultados obtenidos de la prueba de ELISA-I para detección de **IgG1** se presentan en los cuadros **7.1.4.1a y b**, y en **7.1.4.21a y b** para **IgG2**, en los cuales se observa que hubo diferencia significativa entre los diferentes muestreos en todos los grupos. En los cuadros **7.1.4.3a y b** se presentan los resultados de **IgM**, observándose que en algunos muestreos entre el grupo 3 y 4 no hubo diferencia.

En las gráficas 7.1.4.4a, b y c se presentan la comparación de los resultados obtenidos entre IgG1 e IgG2 de los diferentes grupos, con el grupo control. Observándose que en el caso de los grupos 1 y 2 hubo el nivel más alto para de IgG2 fue a los 60 días y comienza su descenso a los 90 días. Mientras que IgG1 se mantuvo un poco más elevada en los siguientes muestreos. En el grupo 3 los niveles de IgG2 fueron más elevados que para IgG1.

Cuadro 7.1.4.1a Resultados obtenidos de la prueba de ELISA-I para detección de IgG1, en los grupos 1, 2 y 4 usando como antígeno células completas de *Brucella abortus* RB51.

GRUPO	IgG1							
	MUESTREOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
G-1	0.879±.022a	0.964±.022a	1.086±.021a	0.839±.022	0.85±.022a	0.96±.023a	0.998±.024a	0.87±.025 a
G-2	0.676±.02 b	0.703±.019b	0.809±.019b	0.735±.019b	0.657±.019b	0.759±.020b	0.754±.02 b	0.783±.02 b
G-4	0.21±.017 c	0.231±.017c	0.25±.017c	0.256±.017c	0.24±.017c	0.197±.017c	0.22±.017 c	0.298±.018c

Letras diferentes en la misma columna representan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

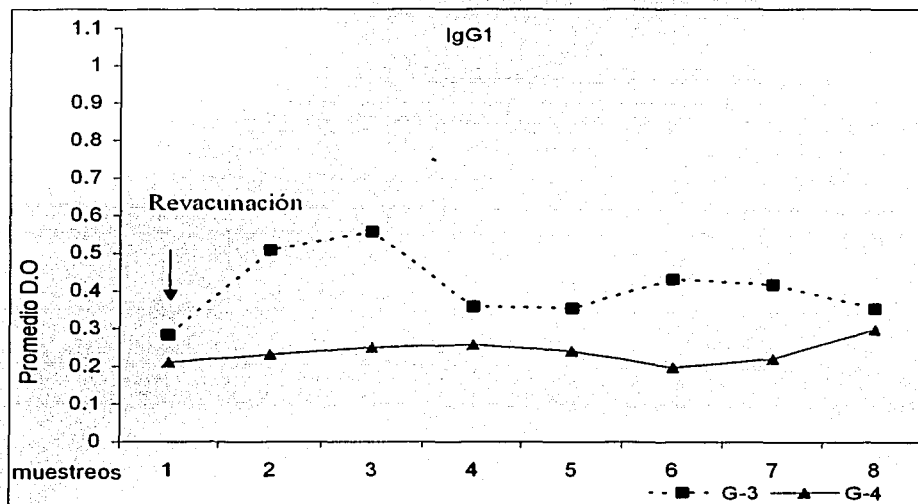


Gráfica 7.1.4.1a Promedio de la DO de ELISA-I para detección de anticuerpos contra IgG1, en bovinos revacunados con RB51.

Cuadro 7.1.4.1b Resultados obtenidos de la prueba de ELISA-I para detección de IgG1, en los grupos 3 y 4 usando como antígeno células completas de *Brucella abortus* RB51.

GRUPO	IgG1							
	MUESTREOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
G-3	0.283±.018a	0.507±.018a	0.555±.018a	0.358±.018a	0.354±.018a	0.43±.018a	0.416±.018a	0.354±.020a
G-4	0.21±.017b	0.231±.017b	0.25±.017b	0.256±.017b	0.24±.017b	0.197±.017b	0.22±.017 b	0.298±.018b

Letras diferentes en la misma columna representan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

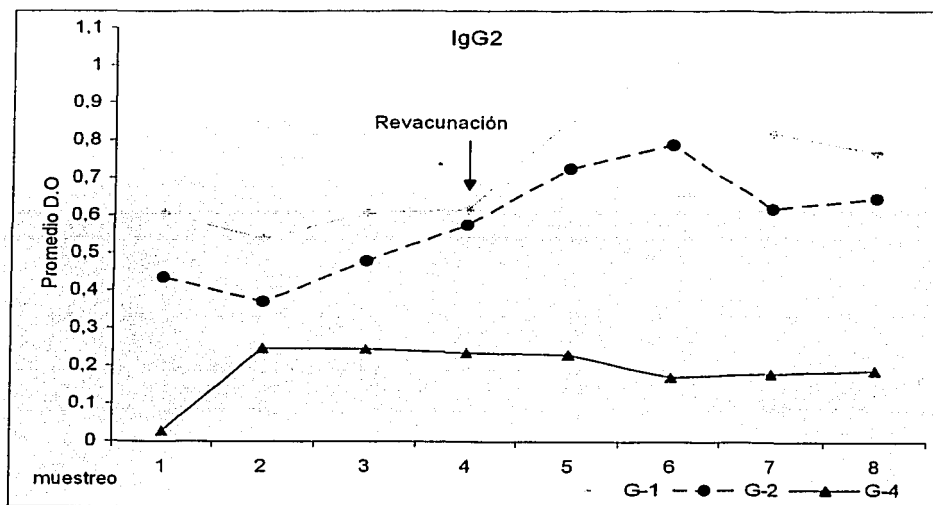


Gráfica 7.1.4.1 Promedio de la DO de ELISA-I para detección de anticuerpos contra IgG1, en bovinos revacunados con RB51.

Cuadro 7.1.4.2a Resultados obtenidos de la prueba de ELISA-I para detección de IgG2, en los grupos 1, 2 y 4 usando como antígeno células completas de *Brucella abortus* RB51.

GRUPO	IgG2							
	MUESTREO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
G-1	0.616±.036a	0.538±.037a	0.608±.036a	0.615±.036a	0.855±.037a	1.008±.039 a	0.819±.04 a	0.767±.041a
G-2	0.435±.034b	0.371±.032b	0.479±.033b	0.575±.032b	0.724±.032b	0.788±.033 b	0.619±.035b	0.645±.035b
G-4	0.271±.028c	0.247±.028c	0.245±.029c	0.236±.028c	0.231±.028c	0.171±.027 c	0.182±.029c	0.109±.030c

Letras diferentes en la misma columna representan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

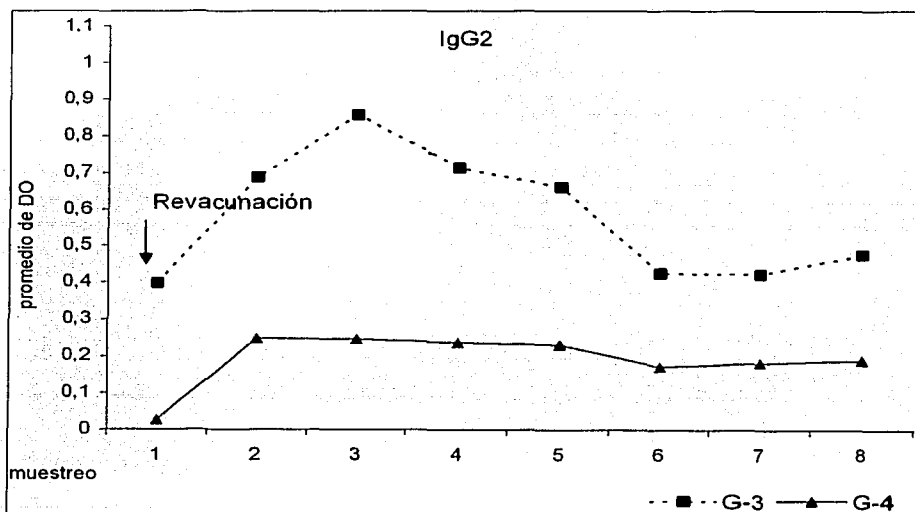


Gráfica 7.1.4.2a Promedio de la DO de ELISA-I para detección de anticuerpos contra IgG2, en bovinos revacunados con RB51.

Cuadro 7.1.4.2b Resultados obtenidos de la prueba de ELISA-I para detección de IgG2, en los grupos 3 y 4 usando como antígeno células completas de *Brucella abortus* RB51.

GRUPO	IgG2							
	MUESTREO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
G-3	0.398±.029a	0.687±.031a	0.858±.03a	0.713±.03a	0.661±.029a	0.425±.03a	0.423±.03a	0.476±.033a
G-4	0.271±.028b	0.247±.028b	0.245±.029b	0.236±.028b	0.231±.028b	0.171±.027b	0.182±.029b	0.109±.030b

Letras diferentes en la misma columna representan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

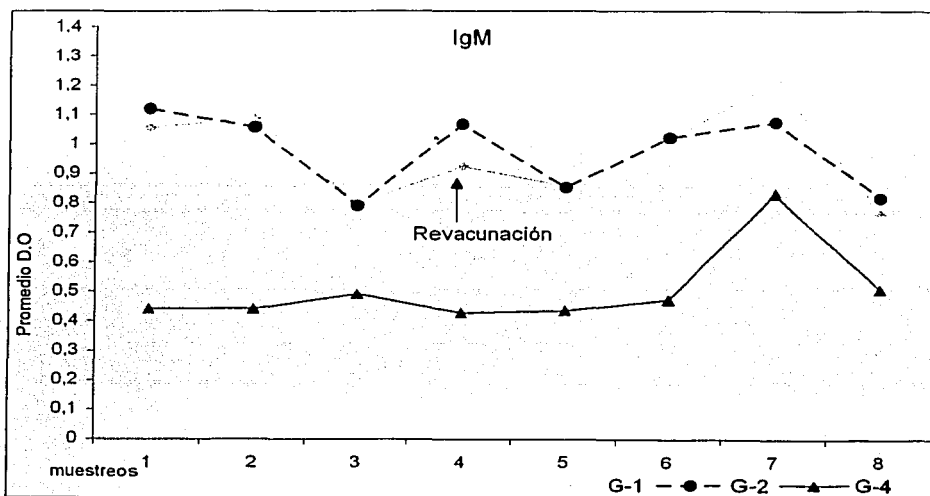


Gráfica 7.1.4.2b Promedio de la DO de ELISA-I para detección de anticuerpos contra IgG2, en bovinos revacunados con RB51.

Cuadro 7.1.4.3a Resultados obtenidos de la prueba de ELISA-I para detección de IgM, en los grupos 1, 2 y 4 usando como antígeno células completas de *Brucella abortus* RB51.

GRUPO	IgM							
	MUESTREO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
G-1	1.056±.02a	1.089±.021a	0.793±.02a	0.925±.019a	0.857±.02 a	1.012±.021a	1.217±.022 a	0.765±.022 a
G-2	1.121±.019b	1.058±.018a	0.79±.01178a	1.068±.018b	0.852±.018a	1.022±.018a	1.074±.018 b	0.81.0197± a
G-4	0.443±.015c	0.44±.015b	0.493±.016 b	0.429±.015c	0.436±.015b	0.473±.015b	0.832±016 c	0.51±.016 b

Letras diferentes en la misma columna representan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

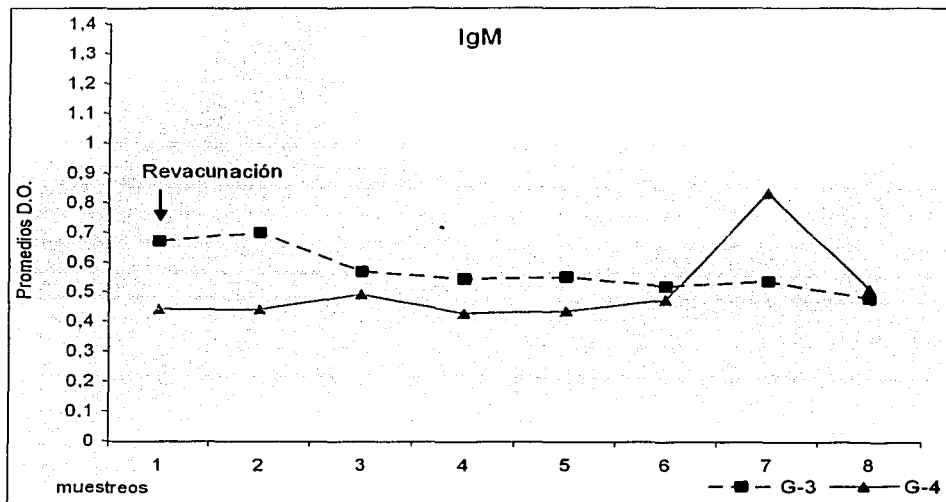


Gráfica 7.1.4.2a Promedio de la DO de ELISA-I para detección de anticuerpos contra IgM, en bovinos revacunados con RB51.

Cuadro 7.1.4.3b Resultados obtenidos de la prueba de ELISA-I para detección de IgM, en los grupos 3 y 4 usando como antígeno células completas de *Brucella abortus* RB51.

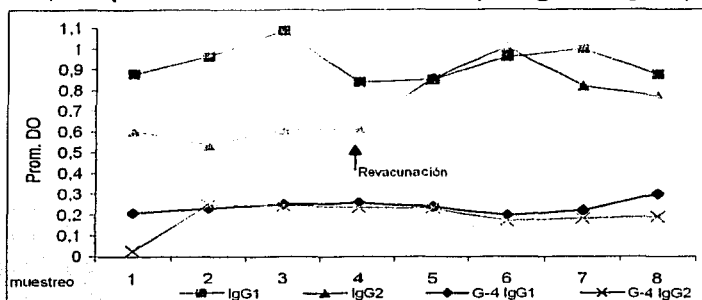
GRUPO	IgM							
	MUESTREO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
G-3	0.673±.016a	0.7±.017a	0.57±.016a	0.544±.016a	0.55±.016 a	0.519±.016a	0.536±.016 a	0.478±.018a
G-4	0.443±.015b	0.44±.015b	0.493±.016b	0.429±.015b	0.436±.015b	0.473±.015b	0.832±016 b	0.51±.016 a

Letras diferentes en la misma columna representan una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

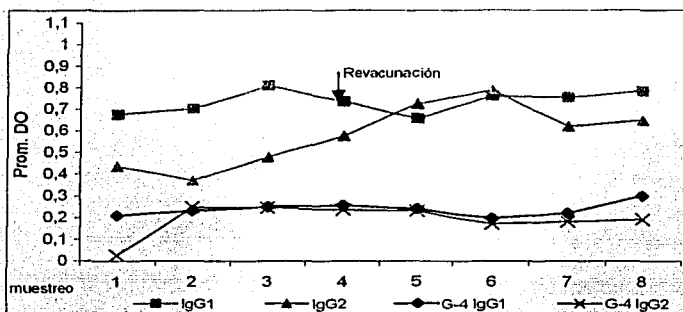


Gráfica 7.1.4.3b Promedio de la DO de ELISA-I para detección de anticuerpos contra IgM, en bovinos revacunados con RB51.

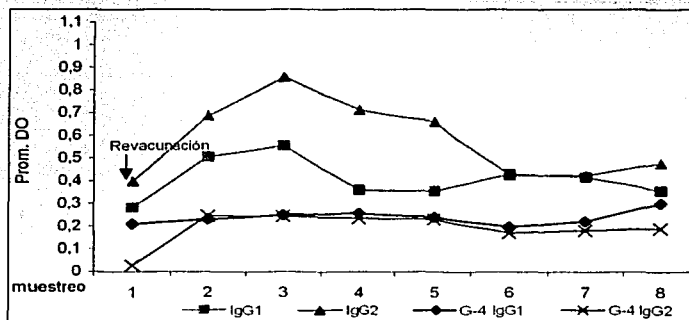
Gráfica 7.1.4.4: Resultados de las pruebas de ELISA-I con antígeno de RB51 *Brucella abortus*, comparando los niveles de los isotipos IgG1 e IgG2 por grupos.



A: Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 en la prueba de ELISA-I, en el grupo 1 bovinos seropositivos revacunados en hato infectado.



B: Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 en la prueba de ELISA-I, en el grupo 2 bovinos seronegativos revacunados en hato infectado.



C: Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 en la prueba de ELISA-I, en el grupo 3 bovinos seronegativos revacunados en hato en fase control.

7.2. Estudio bacteriológico

A partir de muestras de leche y de exudado vaginal, de vacas del grupo 1, se aislaron seis cepas lisas de *B. abortus* que correspondieron al biotipo 1. La identificación se hizo basándose en el **cuadro 7.2.1**. No se logró obtener ningún aislamiento de la cepa vacunal. En los grupos 3 y 4 no hubo aislamientos que fuesen sugerentes de *B. abortus*.

7.3. Presencia de abortos

Durante la realización del trabajo, en ninguno de los grupos hubo la presencia de abortos.

Cuadro 7.2.1. Pruebas diagnósticas para la identificación de *Brucella abortus*.

Biovariedad	Necesidad de CO ₂	Producción de H ₂ S	Crecimiento en presencia de ^a			Aglutinación con sueros monoespecíficos ^b	
			Tionina	Fucsina básica	Safranina	A	M
1	+ ^c	+	-	+	+	+	-
2	+ ^c	+	-	-	-	+	-
3	+ ^c	+	+	+	+	+	-
4	+ ^c	+	-	+ ^d	+	-	+
5	-	-	+	+	+	-	+
6	-	-	+	+	+	+	-
9	+ ó -	+	+	+	+	-	+

^a Concentración de 20 mg/ml de tionina y fucsina básica y de 100 mg/ml de safranina en medio suero dextrosa agar.

^b A= suero monoespecífico anti-A; M= suero monoespecífico anti-M.

^c Positivo para la mayoría de las cepas.

^d Algunas cepas aisladas en Canadá, Gran Bretaña y U.S.A. son inhibidas por la fucsina básica

Otras características de esta especie es que la morfología colonial habitualmente es lisa, es oxidasa positiva, ureasa positiva, sus exigencias de suero son nulas y su hospedador preferencial es el ganado bovino. Marin y Blasco 2000.

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

7.4 PRUEBAS DE INMUNIDAD CELULAR

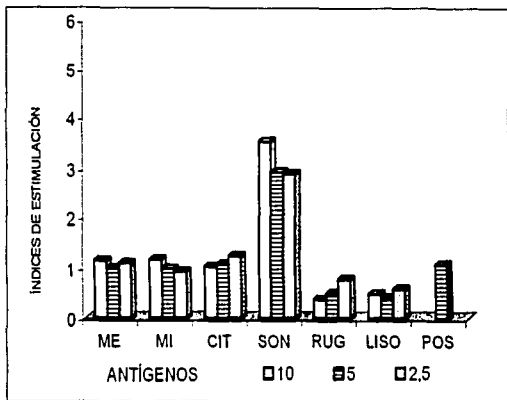
7.4.1 Determinación de los extractos empleados para la evaluación de la producción de IFN- γ .

Los resultados de la producción de IFN- γ , se expresan como los índices de estimulación obtenidos en el ELISA, indicando una mayor producción de interferón con el empleo del extracto sonicado de *B. abortus* RB51, mostrando que este fue el más apropiado para la estimulación de las células *in vitro*.

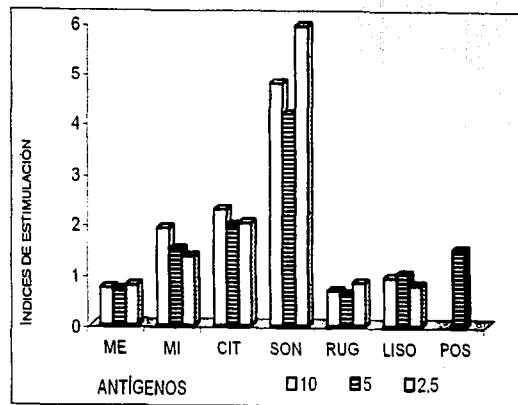
Los resultados observados en los grupos vacunados y revacunados (A, B, y C), muestran una producción elevada de IFN- γ , que no fue dependiente de las concentraciones utilizadas 10 μ g, 5 μ g y 2.5 μ g/ml, pues con cualquiera hubo producción de esta citocina. Después del extracto sonicado, las proteínas de membrana interna y citosol fueron los antígenos que siguieron en capacidad para inducir la producción de IFN- γ . La producción de esta citocina inducida por los lipopolisacáridos se observó una menor respuesta que no fue significativa para los grupos A y B; para el grupo C se observa índice de estimulación significativo principalmente con el LPS de tipo rugoso. En el grupo de animales negativos no vacunados (D), no hubo una producción significativa con ninguno de los extractos.

Los resultados del ELISA para detección de IFN- γ , con los diferentes extractos expresados en IE se presentan en las **Gráficas 7.4.1.1: A, B, C, D.**

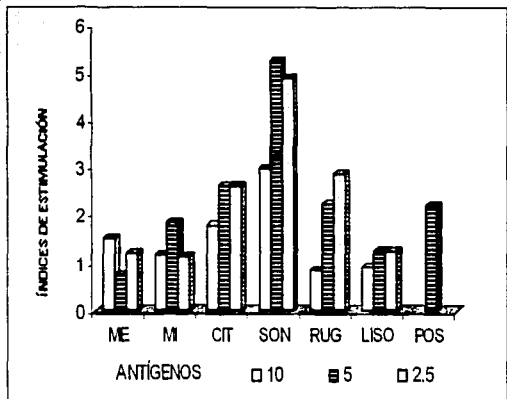
Gráfica 7.4.1.1. Resultados de la estandarización con diferentes antígenos de *Brucella abortus* de la prueba de ELISA para detección de Inf- γ representadas en IE.



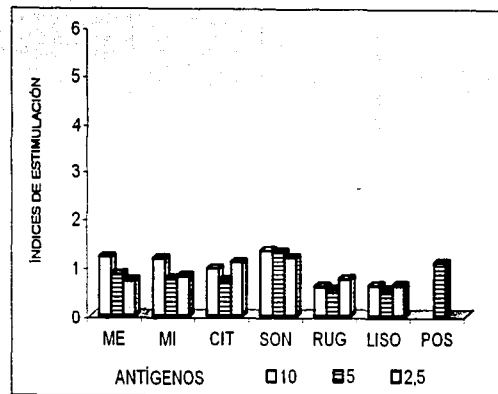
A: grupo de animales positivos revacunados en ható con elevada prevalencia



B: grupo de animales negativos revacunados en ható con elevada prevalencia



C: grupo de animales negativos vacunados en ható en fase de control

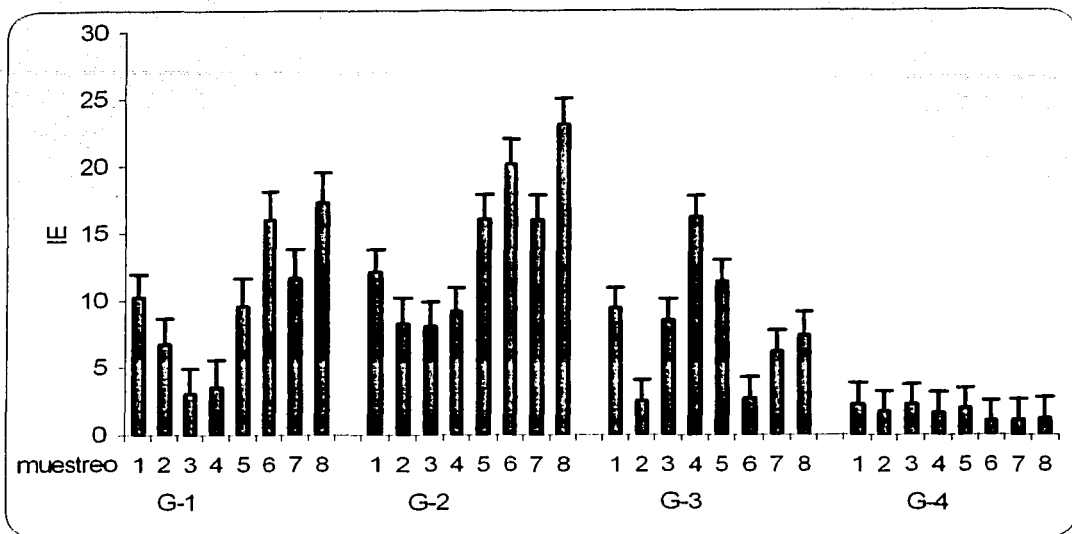


D: grupo de animales negativos sin vacuna

7.4.2 Muestreos mensuales para la detección de interferón- γ .

Los resultados de la producción de IFN- γ en los diferentes muestreos, se presentan en la **Gráfica 7.4.2.1**, En los grupos 1 y 2 se observa un aumento en la producción de interferón en el día 30 posrevacunación (muestreo 5). De manera general se observa que en los grupos en los que hubo una revacunación (Grupos 1, 2 y 3) se presenta una elevada producción de IFN- γ , a diferencia del grupo negativo (Grupo 4), lo que nos indica que la presencia del IFN- γ es dependiente del grado de estimulación antigénica que se presentó después de la revacunación.

En el análisis estadístico, no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.01$) al comparar entre los grupos 1 y 3, pero si la hay entre los dos grupos 1 y 2 que eran del mismo establo (alta prevalencia) **Tabla 7.4.2.1**.



Gráfica 7.4.2.1: Producción de Interferón- γ expresados en IE en cultivos de sangre completa de los diferentes grupos de animales. Los cultivos se estimularon con 10 $\mu\text{g/ml}$ de un extracto sonificado de *B. abortus* RB51. Grupo 1 (G-1) animales positivos serología revacunados y Grupo 2 (G-2) animales negativos revacunados pertenecientes a un hato con alta prevalencia de la enfermedad; Grupo 3 (G-3) animales negativos revacunados pertenecientes a un hato en fase de control de la enfermedad; Grupo 4 (G-4) grupo control negativo.

Tabla 7.4.2.1. Promedio de los índices de estimulación de Inf- γ de los cuatro grupos.

GRUPO	PROMEDIO DE I.E.	ERROR ESTANDAR
G- 1	9.7439072 ^a	1.56007
G- 2	14.0882131 ^b	1.55685
G- 3	8.0229692 ^a	1.05837
G- 4	1.6481505 ^c	1.09330

Las letras a, b, y c, indican que hay una diferencia significativa de ($P \leq 0.01$), entre los grupos estudiados

7.5.1. Prueba de Intradermoreacción

Se realizó el día 300 para los grupos 1 y 2 y el día 420 para el grupo 3, en 10 animales de cada grupo, los resultados se aprecian en la **Tabla 7.5.1.1**. En el grupo de animales seropositivos revacunados en hato infectado (grupo 1) se presentó un 40% de reactores, En el grupo negativo revacunados en hato infectado (grupo2), el 100 % de los animales evaluados fueron positivos y en el grupo negativo revacunado en hato en fase de control (grupo3), se obtuvo 64% de animales positivos.

El grupo control negativo inicial del estudio serológico no pudo ser utilizado, ya que en esa fecha, los animales tenían que ser reubicados, pero se usó otro grupo de cinco animales negativos y sin vacunar de los cuales el 100% fueron negativos a la prueba.

Tabla 7.5.1.1 Resultados obtenidos en la prueba de intradermorreacción en los diferentes grupos.

Grupo	NÚMERO	MEDIDA INICIAL MM	MEDIDA 72 HRS MM	DIFERENCIA	% AUMENTO INICIAL	INTERPRETACION
Grupo 1 seropositivos revacunados (hato infectado)	472	6mm	6mm	0mm	0	N
	596	6	6	0	0	N
	601	6	6	0	0	N
	695	7	7	0	0	N
	793	5	5	0	0	N
	722	5	5	0	0	N
	646	5	44	39	780	P
	771	9	12	3	33.3	P
	676	5	7	2	40	P
669	7	33	26	371	P	
Grupo 2 seronegativos revacunados (hato infectado)	52	5mm	25mm	20mm	400	P
	256	5	43	38	760	P
	593	6	9	3	50	P
	332	4	43	39	975	P
	736	5	25	20	400	P
	520	6	33	27	450	P
	648	5	34	29	580	P
	774	5	47	42	840	P
	549	6	40	34	567	P
258	5	50	45	900	P	
Grupo 3 seronegativos revacunados (hato en control)	845	8	8	0	0	N
	888	5	5	0	0	N
	38274	7	7	0	0	N
	59255	6	6	0	0	N
	861	7	25	18	257	P
	864	5	17	12	340	P
	898	12	19	7	58	P
	902	8	29	21	263	P
	38253	6	7	1	16	P
	30338	5	9	4	80	P
57221	7	23	16	229	P	

N= Negativo
P= Positivo

8. DISCUSIÓN

La vacuna RB51 de *B. abortus* que carece de la cadena O, juega un papel central en el diagnóstico serológico de brucelosis, ya que las pruebas se basan en la detección de anticuerpos contra este antígeno inmunodominante; antígeno que es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en animales expuestos a las brucelas lisas. (Schurig 1998, Blasco 2001).

La vacunación con RB51 tiene un efecto protector similar al inducido por la cepa 19, aunque se recomienda aplicarla una sola vez, con una dosis de 1×10^{10} UFC para becerro, o de 3×10^9 UFC para vaca; bajo las condiciones de la enfermedad en México es recomendable llevar a cabo la revacunación (Blasco 2001, Schurig 1998). Actualmente en algunos establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, se revacuna con RB51 cada seis meses, sin importar el estatus inmunológico del animal; de ahí la importancia de evaluar la respuesta en un grupo animales serológicamente positivos y revacunados.

A los cuatro meses posteriores a la revacunación en los animales positivos del hato con elevada prevalencia (grupo 1), se presentó un 93% de positivos a tarjeta y 87% a rivanol, en referencia a esto, la literatura menciona que los resultados positivos a las pruebas serológicas de diagnóstico, indican la presencia de anticuerpos causados por la infección con cepas de campo de *B. abortus* y no anticuerpos inducidos por la vacunación sin importar la edad, dosis ó frecuencia de vacunación (Stevens 1995, Cheville 1993, Blasco 2001, Schurig 1998, Uzal 2000). Aunque es probable que en zonas endémicas los anticuerpos detectados, sean debidos a que los animales han estado en contacto con la bacteria, y su sistema inmune ha sido capaz de controlar la infección. Está situación causa una confusión en el diagnóstico, ya que está situación que no se presenta en países donde la prevalencia de la enfermedad es baja.

En el grupo de animales negativos revacunados en el hato con elevada prevalencia (grupo 2), se presentó una respuesta *atípica* posvacunal en algunos de los animales, en los cuales durante algunos muestreos dieron una reacción positiva a tarjeta y negativa a rivanol, volviéndose negativos posteriormente, situación que se presentó después de una segunda revacunación. Respuestas similares se han observado en diferentes estudios realizados en México. Por ejemplo Leal y cols (2000) evaluaron el comportamiento de la vacuna RB51 en un establo libre de brucelosis, bajo riesgo de infección ya que en un hato caprino contiguo se presentó un brote de brucelosis, lo que coincidió con la presencia de animales positivos a tarjeta y negativos a rivanol. Sin embargo, no se encontraron vacas con brucelosis. Cantú y cols. (2001) trabajando en un establo con 8.7% de prevalencia de brucelosis, vacunaron 392 vacas con dosis vaca de RB51, las cuales fueron muestreados mensualmente durante un año. Encontrando casos positivos a la prueba de tarjeta pero negativos a rivanol hasta los seis meses posvacunación. Orozco y cols. (1999), en un hato de 137 bovinos en condiciones semiextensivas con 24% de prevalencia de brucelosis, vacunaron con RB51 dosis vaca presentándose nuevos casos a la prueba de tarjeta y negativos a rivanol durante seis meses posvacunación con un 5% de incidencia mensual. Leal y cols 2000b trabajando con 35 bovinos revacunados en un hato con elevada prevalencia, posterior a la revacunación, encontraron que el 6% fueron positivos a la prueba de tarjeta y negativos a rivanol por varios meses.

En el grupo de animales negativos revacunados que estaban en el hato en fase de control de brucelosis (el grupo 3), durante tres muestreos se presentó un animal sospechoso a la prueba de tarjeta pero negativo a rivanol, lo que puede deberse a una reacción cruzada a nivel de cadena O con otra bacteria, ya que las pruebas de diagnóstico se basan en la detección de este antígeno (Schurig 1998). Sin embargo, no se presentó la respuesta atípica como fue el caso de los grupos del hato con elevada prevalencia, confirmando lo encontrado por Uzal (2000) en un estudio con bovinos donde revacunaron tres veces con dosis reducida, no encontraron interferencia en el diagnóstico, a pesar de la aplicación de múltiples

revacunaciones estas no interfirieron con las pruebas serológicas con el fin de detectar animales infectados.

En este trabajo se determinó la incidencia y la prevalencia de la enfermedad, en donde al hacer una comparación con prevalencias de tres años anteriores se observó una disminución en el último año, la cual fue debida a que en este periodo los animales positivos fueron separados y eliminados paulatinamente a diferencia de los tres años anteriores. Herrera en 2002 realizó un estudio prospectivo durante 660 días, trabajando con 1150 vacas en dos establos, uno con una prevalencia de 15%, y otro menor al 10%. Todas las vacas se vacunaron con RB51 dosis reducida y se revacunaron después de 90 días. En el establo de baja prevalencia se eliminaron los animales positivos y todos los nuevos casos finalizando el primer año con incidencias menores al 1%, logrando que fueran nulas hacia el segundo año. En establo de alta prevalencia no se eliminaron los animales seropositivos, presentándose un incremento mayor del 17% al término del primer año. Una vez que se eliminaron los animales positivos, las incidencias llegaron a ser menores del 1%.

En la respuesta humoral que se desarrolla con la vacunación, los títulos más altos y que perduran por más tiempo son IgM, y a continuación aparece IgG que disminuye hasta hacerse imperceptible por los métodos convencionales alrededor de los ocho meses después de la exposición. (Corbel 1991, Sánchez 1998). Sin embargo, en este trabajo se realizó un ELISA-I, utilizando como antígeno células completas de RB51, para evaluar la respuesta de anticuerpos en bovinos revacunados con RB51 y los resultados obtenidos en el caso de los grupos 1 y 2 revacunados, los niveles de IgG1 fueron de mayor duración y comenzaron a descender en el día 120 posvacunal. Los niveles de IgG2 tuvieron una duración más corta, disminuyendo para el día 90. Lo que coincide con que en caso de infecciones persistentes producidas por cepas virulentas, la respuesta de IgG se mantiene y persiste en un nivel alto, frecuentemente durante años, pudiendo mantenerse alguna producción de IgM,

pero estarán cubiertos por la respuesta de IgG (Corbel 1991, Sánchez 1998). En el grupo negativo revacunado (grupo 3) las concentraciones de IgG2, son más altas que las de IgG1 en ambos casos alcanzando su nivel más alto en el día 60. Esto respalda lo reportado por Corbel (1991), que la producción de anticuerpos IgG2 también pueden aparecer particularmente después de una infección o exposición repetida mediante revacunaciones; que es el caso de tres de los grupos de animales de este trabajo. Mientras que Díaz y cols (2003) encontraron en el ELISA-I con LPS-liso como antígeno, niveles elevados de IgG2 en vacas infectadas y de IgG1 en vacas vacunadas y en revacunadas con RB51 y en el ELISA-I con LPS de RB51, la respuesta no presentó diferencia entre isotipos y grupos.

Gómez en 2000 mediante un ELISA-I con un antígeno de células completas de RB51, evaluó la respuesta de IgG en 29 becerras vacunadas con RB51, observando que el 85% de los animales presentaron respuesta a la vacunación, en la cual alcanzaron sus niveles más altos entre los 15 y 60 días, a partir de los cuales empieza a descender desapareciendo hacia los 150 días. El 15% de los animales presentó una respuesta negativa similar al grupo control. Datos que coinciden con los encontrados en el presente trabajo, ya que la concentración de IgG más altas se observaron entre los días 60 y 90, comenzando a disminuir para el día 120, y para el grupo control la respuesta fue muy baja.

Stevens y Olsen en 1996, encontraron que en un ELISA con un antígeno preparado a partir de células completas de la C-2308, los bovinos vacunados con RB51 (5×10^9 UFC) a las cuatro semanas posvacunación, tuvieron un incremento significativo en la concentración de IgG pero no de IgM. Estos resultados sugieren que la vacunación con RB51, inducen la presencia de títulos de IgG bajos o pasajeros. Estos datos son similares a los encontrados en el grupo3, pues los niveles de IgG1 e IgG2 son más elevados que los encontrados para IgM.

Montaña (1998) en un trabajo en el cual vacunó a cuatro grupos de animales con C-19, RB51, OMP-2 y OMP-2 más cadena O y desafiados el día 60 con la C-2308, encontró en un ELISA con extracto de RB51 que los isotipos IgG1 e IgG2 se manifiestan como valores positivos en todos los grupos, sugiriendo la capacidad inmunógena de estas proteínas. Las proteínas estructurales de RB51 presentes como antígenos purificados, inducen en el animal una respuesta favorable a la producción del isotipo IgG2, insinuando una respuesta de tipo Th1. Mientras que en los animales vacunados con C-19, se observó un mayor nivel de anticuerpos IgG1, mientras los niveles de IgG2 son bajos. La alta producción de IgG1 se debe a estimulación policlonal de linfocitos B, ocasionada por el alto contenido de LPS de la C-19. Uzal y cols. (2000) realizaron un ELISA-I usando LPS-R de RB51 como antígeno, para detectar anticuerpos contra RB51. Los animales tuvieron una leve respuesta inmune humoral después de la vacunación y con una segunda revacunación los títulos se incrementaron en todos los animales. Los títulos de IgG1 se elevaron en el día 29 llegando a su máximo el día 50 y posteriormente descendieron hacia el día 153. Pérez en 1997, realizó un ELISA-I con antígeno rugoso a partir de RB51, en la cual los títulos de IgG se encuentran en su pico máximo a los 30 días posvacunación, manteniéndose en forma elevada hasta el día 120 a partir del cual empezaron a descender gradualmente hasta los 270 días registrándose valores más altos que en los previos a la vacunación. En estos trabajos se observa una respuesta muy similar a los resultados que se encontraron para los grupos 1, 2 y 3 de animales revacunados, en los cuales se presentaron los niveles más altos de IgG1 en los primeros 90 días los que descendieron a partir del día 120.

Con el aislamiento de las cepas a partir de las muestras de leche y de exudado vaginal en el grupo uno, se confirma la infección en estos animales y estas cepas correspondieron a *B. abortus* biotipo 1 que es el que se ha encontrado más comúnmente en la zona (Bustamante en 1998, Leal en 2000b).

Uzal y cols (2000) reportan que la cepa RB51 fue aislada de leche en algunas vacas a los 60 días posvacunación, indicando que esta cepa puede sobrevivir en animales preñados por un mínimo de dos meses y Leal y cols. (2000b) reportan el aislamiento de dos cepas de RB51 a partir de leche y exudado vaginal a los 90 días posrevacunación. Samartino y cols (2000), en un grupo de 57 animales vacunados a los seis meses de edad con C-19 y revacunados con RB51 a los siete meses de gestación, aislaron la cepa RB51 de un animal a partir de muestra de leche a los tres días posparto. Por lo que la cepa RB51 puede ser aislada de leche en un corto tiempo en un bajo porcentaje de animales revacunados en edad adulta y gestantes, situación que es bien conocida con la C-19. A pesar de que diversos autores reportan el aislamiento de la cepa RB51, en este trabajo en ninguno de los grupos revacunados se obtuvo el aislamiento de la cepa, situación que puede deberse a que el tiempo que se consideró para la toma de las muestras fue corto, ya que solo se consideró a los animales que estuvieran dentro del primer mes posparto.

Durante el tiempo de realización del presente trabajo no se presentaron abortos debidos a la vacunación o infección en ninguno de los grupos. El aborto es un factor de transmisión de brucelosis entre bovinos, dato que indica que la vacunación con dosis reducida de RB51 puede ser efectiva en la reducción de la transmisión de la enfermedad. La vacunación con RB51 es tan efectiva como la C-19 ya que induce protección contra subsecuentes infecciones, previniendo el aborto por *Brucella* e induciendo una respuesta inmune (Olsen 2000, Samartino y cols 2000).

Brucella abortus es un patógeno intracelular facultativo, capaz de multiplicarse y sobrevivir en células fagocíticas o macrófagos, por lo que la respuesta inmune mediada por células es de gran importancia para la protección y eliminación de la infección. La protección se define en función de los linfocitos T, los cuales participan en los mecanismos de activación de macrófagos para la eliminación de la bacteria (Villamil 1995). En este trabajo se realizó la evaluación

de IFN- γ que es un potente modulador de una amplia variedad de poblaciones celulares, que participan en la adquisición de resistencia en la respuesta inmune celular. La producción de IFN- γ en respuesta a el extracto sonicado de RB51, fue usado como método de medición de la respuesta celular en bovinos revacunados; además de que los resultados se pudieron obtener en un tiempo de 24 h y fue específico para IFN- γ , además de que el estatus inmune del animal no se ve comprometido por administración de antígenos como sucede con la intradermorreacción. (Wood 1990, Rothel 1990, Weynants 1995).

Montaña en 1998 encontró que frente a un extracto crudo de *B. abortus* RB51, los índices de estimulación fueron superiores, especialmente en los grupos vacunados con RB51 y C-19, los cuales presentan mayores valores el día 60, lo que sugiere que este extracto sería el apropiado para evaluar linfoproliferación que es otra forma para medir la respuesta inmune celular. En el caso del presente trabajo, cuando se evaluó la capacidad inductora de IFN- γ , con diferentes preparaciones proteicas y lipopolisacáridos de *B. abortus*, en cultivos de sangre completa de bovinos vacunados con RB51; el extracto sonicado a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, fue el antígeno con el cual se observó una mayor producción de IFN- γ , esto puede deberse que al presentar todos los componentes de la bacteria, se tiene un mayor número de clones que reconocen a los diferentes tipos de antígenos, que los que se presentan con un antígeno más purificado. Con los grupos utilizados se observó una producción elevada de la citocina que no fue dependiente de la concentración utilizada, ya que en las diferentes concentraciones de antígeno utilizadas se obtuvo una buena respuesta.

La producción de IFN- γ inducida por la estimulación *in vitro* de las células sensibilizadas con el extracto sonicado, en los diferentes grupos de animales revacunados, fue significativa al compararla con el grupo negativo. Se presentó una menor producción para el grupo 1 que para el grupo 2, que fueron los grupos de animales expuestos a cepas de campo. En el grupo 3 la respuesta fue menor a la del grupo negativo en hato con elevada prevalencia (grupo 2), debido a que a

mayor estimulación *in vivo* es menor la producción de IFN- γ , esto indicaría que es dependiente del grado de exposición y estimulación antigénica. La detección de IFN- γ es correlacionada con la estimulación de linfocitos antígeno - específica (Burrells 1999). La determinación de niveles de IFN- γ es un reflejo del estado de protección a la infección, siempre y cuando la producción de este sea antígeno específico (Montaña 1998).

Villamil (1995) reportó que Moreno en 1981 y Brooks y Splitter en 1988 encontraron ausencia del papel mitógeno del LPS-L de *Brucella* en bovinos, pero Vendrel en 1980 sí halló una actividad linfoproliferativa. Mientras que Montaña en 1998 reporta que desde el punto de vista de evaluación de la inmunidad celular, la respuesta blastogénica frente a antígenos polisacáridos como son la cadena O y el LPS-L es muy baja, por lo que puede interpretarse como que sólo un bajo porcentaje de la población linfoide presenta especificidad por este tipo de antígenos. Situación que se comprobó cuando se realizó la selección del extracto antigénico, que indujera una mayor producción de IFN- γ para evaluar la inmunidad celular, ya que con los que se observó una menor producción de la, fue con los LPS-L y LPS-R, independientemente de la concentración utilizada.

Una opción para evadir las reacciones cruzadas de anticuerpos, debidas al LPS-L en las pruebas serológicas, es basar el diagnóstico en la medición de la respuesta inmune celular. Un ejemplo es el empleo de la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) con antígenos proteicos de *Brucella*, siendo este método muy específico para llevar a cabo la evaluación de la respuesta inmune celular inducida por la vacunación en este caso con RB51. Esta prueba está basada en el modelo desarrollado para el diagnóstico de Tuberculosis. (Pouillot y cols 1997). En este estudio la prueba de DTH fue realizada el día 300 posrevacunación para los grupos 1 y 2 y el día 420 para el grupo 3 en 10 animales de cada grupo. En el grupo de animales seropositivos revacunados en hato infectado (grupo 1), sólo el 40% resultó ser positivo, el que el restante 60% no reaccionaran a la prueba de DTH, puede deberse a una reacción anérgica. Los animales pueden

desarrollar una reacción alérgica durante largos periodos de seronegatividad y otros pueden ser anérgicos, particularmente en animales crónicamente infectados (Pouillot y cols 1997). La respuesta anérgica a los alérgenos de *Brucella* no esta bien documentada (Blasco 1994). Sin embargo, la inmunosupresión, estrés, la desnutrición, la preñez, lactancia y aplicación de algunos corticosteroides han sido sugeridos como importantes factores causantes de procesos de anergia (Wood 1991, Tizard 1996, Estrada 2001, Díaz OF 2003). En el grupo de animales seronegativos revacunados en ható infectado (grupo 2) el 100% fueron reactivos. Es reconocido que la inmunidad celular juega un papel importante en la protección contra brucela, (Fernandes 1995) por lo que al haberse presentado un 100% de positividad en la prueba se deduce que la vacuna estimuló una adecuada inmunidad celular. Sin embargo, Díaz y Blasco (1986) mencionan que cualquier vacuna viva lisa o rugosa puede producir respuesta en esta prueba, por lo que el valor diagnóstico de la DTH se pierde en zonas en las cuales el control se basa en la vacunación, que es el caso de México. En el grupo de animales seronegativos revacunados (grupo 3) solo el 64% de los animales fueron reactivos, cabe mencionar que en este ható se tienen problemas de fasciolosis y neosporosis, la fasciolosis es una enfermedad que se ve favorecida en condiciones de pastoreo, la evasión de la respuesta inmune hace que los bovinos infectados sean más susceptibles a otras enfermedades, una explicación que se puede dar a este fenómeno es por que *Fasciola hepatica* puede provocar inmunosupresión del animal (Quiroz 1984), por lo que tal situación puede generar que algunos individuos no respondan a las pruebas presentándose un proceso de anergia. En el grupo seronegativo en ható libre no se presentaron animales reactivos que era lo esperado ya que Bercovich en 2000 reporta que en bovinos de áreas con baja prevalencia o libres de brucelosis presentan un incremento mayor o igual a 2 mm puede ser considerado como un indicativo de infección. Sin embargo, diversos estudios indican que la DTH usada en combinación con las pruebas serológicas, mejora el diagnóstico de brucelosis y que cualquier aumento palpable en el sitio de inyección después de 48 h es considerado como positivo. (Bercovich 1990). Cheville en 1994 aplicó brucelina derivada de la cepa RB51, la cual indujo una fuerte

respuesta en animales vacunados con C-19, pero no causó reacción en animales vacunados con RB51, estos autores mencionan que la falla a la cual pudo deberse, es por la carencia de la cadena O del LPS de la RB51.

Pérez en 1997, evaluó la respuesta inmune celular inducida por la vacunación con RB51, en 16 hembras a los 12 meses posvacunación en un hato con 8% de seroprevalencia, para lo cual utilizó la prueba de DTH en la cual obtuvo el 100% de reactivos positivos, de la cual se deduce que la vacuna estimuló una adecuada inmunidad celular. Leal en 2000a, realizó la DTH utilizando brucelergeno en un grupo de 35 vaquillas en un hato en fase de control de brucelosis, a los 12 meses posvacunación con RB51 en el cual, el 91% de los animales fueron reactivos positivos, lo que indicó que la vacuna confirmó inmunidad celular. Mientras que Chevillé en 1993, vacunando 24 novillas a los 10 meses de edad con C-19, RB51 y con dos mutantes por transposición, aplicaron la brucelina antes y cinco meses después de la vacunación obteniendo respuesta solo después de la vacunación en animales serológicamente negativos.

El tipo de respuesta inmune que se presenta, se ve favorecido por la estimulación antigénica *in vivo*. En el grupo 1, de acuerdo a los resultados obtenidos se pensaría en una respuesta de tipo Th2; debida a la presencia de anticuerpos en las pruebas serológicas en las que se muestran elevados niveles de IgG1 (Golding y col, 2001), y una pobre respuesta de tipo celular en ambas pruebas empleadas, esto puede ser por que los animales han permanecido positivos por mucho tiempo y han tenido por lo menos dos revacunaciones propiciando un proceso de anergia en la respuesta celular.

En el grupo 2 se presentó una respuesta de tipo Th1, ya que se observaron niveles elevados de IFN- γ posrevacunación y el 100% de reactividad a la prueba intradérmica y los niveles altos de IgG2 (Vermulapalli 2000a), lo que es un indicio de que en este grupo de animales se implementó una buena respuesta de tipo

celular. Además de que es conocido, que los niveles de IFN- γ se encuentran más elevados en fases tempranas de la infección. (Pasquali 2001)

En el grupo 3 la respuesta de tipo Th1 se ve favorecida mostrando una clara respuesta de tipo celular, ya que se observan niveles elevados de IFN- γ y una buena respuesta a la prueba intradérmica y niveles elevados de IgG2. (Vermulapalli 2000a). Estos niveles elevados pueden ser propiciados por una revacunación (Corbel 1991).

La respuesta de anticuerpos del tipo IgG2, indican una absoluta correlación entre los niveles anti-IgG2 de *Brucella* y la infección del animal. El monitoreo específico de IgG2 puede ser de valor en detección de bovinos infectados con *Brucella* (Lawman 1986). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la respuesta de isotipos pueden ser polarizados bajo ciertas condiciones experimentales y que la expresión de IgG1 es positivamente requerida por la IL4 y la expresión de IgG2 es positivamente regulada por el IFN- γ . (Estes 2002)

En el caso de la respuesta inmune celular evaluada por la producción de IFN- γ y la prueba de intradermorreacción en los diferentes grupos, se observa una coincidencia en los resultados obtenidos; ya que para el grupo 1 hay una baja respuesta en las dos pruebas, los animales del grupo 2 demuestran una buena inmunidad celular y en el grupo 3 en general hubo una buena respuesta y en los animales que no se presentó respuesta a las pruebas de IFN- γ e intradermorreacción, podría atribuirse a su estado fisiológico.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

9. CONCLUSIONES

- La reacción positiva a tarjeta se debe a una respuesta inmune secundaria, debido al reconocimiento primario que adquirieron las vacas al estar en contacto con las cepas de campo y posteriormente al ser inmunizadas, se presenta un reconocimiento antigénico de las proteínas.
- En respuesta a la revacunación en animales infectados, los títulos de IgG1 fueron más elevados que los de IgG2.
- Los títulos de IgG2 en animales revacunados en hatos en fase de control, fueron más elevados que los títulos de IgG1.
- El extracto sonicado de *Brucella abortus* RB51, resultó ser adecuado para estimular la producción de IFN- γ , en sangre completa de animales vacunados y revacunados con RB51.
- La vacuna RB51 induce una buena respuesta inmune celular, que puede ser medida mediante IFN- γ .
- En el caso del grupo 1 de animales positivos revacunados, se confirma el estado de anergia inmunológica en el 60% de los animales expuestos a la *Brucella* por largos periodos.
- Las pruebas para evaluar la respuesta inmune celular sugieren que la vacunación con RB51 confirió una inmunidad adecuada.
- Para que un programa de control de brucelosis funcione adecuadamente, se deben tener estrictas medidas de bioseguridad en el establo, además del uso de la vacunación y la revacunación que está indicado en zonas endémicas de brucelosis, debiéndose realizar la eliminación de animales seropositivos al término de su ciclo de productivo.

1. **Literatura citada**

2. Alfonso SE. Determinación de isotipos en perfiles serológicos mediante inmunoensayo enzimático indirecto en cabras vacunadas y desafiadas con *Brucella spp.* Tesis de Maestría 1998, FMVZ, UNAM.
3. Alton, G.G, Techniques for the brucellosis laboratory. Inst. Nal de la Reserche Agronomique, Paris. 1988.
4. 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 Cuautitlán. UNAM, 1997.
5. Arenas GN, Staskevich S, Aballay A, Mayorga LS. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages *Inf. and Immunity* 2000.V68:7:4255-4263.
6. Aréstegui MB, Gualtier SC, Domínguez J, Scharovsky OG. "El género *Brucella* y su interacción con el sistema monocuclear fagocítico". *Veterinaria México*. 2001;32:2:131-139.
7. 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.
8. Bercovich Z. The use of delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle:a review. *Vet Q.* 2000; 22(3):123-130.
9. Blasco JM, Marín C, Jiménez M, Barberán M, Hernández A, Molina L, Velasco J, Díaz R, Moriyón I., Evaluation of allergic and serological test for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep, *J. Clin. Microbiol*, 1994, Vol. 32, Nº 8:1835-1840.
10. Blasco JM, Profilaxis médica de la brucelosis en los rumiantes: las vacunas clásicas y las vacunas nuevas: En diagnóstico de Brucelosis animal. E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano y cols. editores. INIFAP, SAGAR. 2001:158-179.
11. Burrells C, ClarkeCJ, Colston A, Kay JM, PorterJ, Little D, Sharp JM. Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymphonodes and intestines of normal sheep and those affected

- with paratuberculosis (Jhone's disease). *Vet. Immunology and Immunopathology*. 1999. V68:139-148.
12. Bustamante SJ, 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 Cuautitlán. UNAM, 1998.
 13. Cantú CA, Díaz AE, Adams G, Hernández AL, Suárez GF. Evaluación y seguimiento de dos vacunas rugosas en un hato de bovinos con brucelosis. En *Memorias XXXVI Reunion Nacional de Investigacion Pecuaria, Tuxtla Gutierrez Chiapas*, (Instituto Nacional de Investigaciones Agricolas, Forestales y Pecuarias. 2001. 49.
 14. Cheville NF, Jensen AE, Mofitt DC, Stabel TJ. Cutaneous delayed hypersensitivity reaction of cattle vaccinates with mutant strains of *Brucella abortus*, usind brucellins prepared from various brucellar strains. *Am. J. Vet. Res.* 1994, 55. 9. 1261-1266.
 15. 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.
 16. Corbel MJ. Brucelosis, En *Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria*. J.A. Laing, editores. México. Interamericana, 1991:190-230.
 17. Díaz AE, Hernández AL, Valero EG, Velásquez QF, *Diagnóstico de Brucelosis*. México. INIFAP, SAGAR. 1998.
 18. Díaz-Aparicio E, Arellano-Reynoso B, Herrera-López E, Leal-Hernández M, Suárez-Güemes F. Study of RB51 atypical post-vaccinal reaction to serological tests, in endemic brucellosis areas. 2003. *In prensa*.
 19. Díaz-Aparicio E, Arellano-Reynoso B. Mecanismos de patogenicidad de *Brucella*. *Memorias del curso "Evolución de los mecanismos de virulencia de los microorganismos patógenos"*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. 12-15 de agosto de 2003.

20. Díaz OF, Banda RV, Jaramillo ML, Arriaga DC, González SD, Estrada CC. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Veterinaria México*. 2003;34:1:13-26.
21. Díaz R, Blasco JM. Diagnostico inmunológico. En: Bovis, Tratado de veterinaria práctica. Madrid España. Ed. Luzans, 1986:55-69.
22. Díaz, R. et al. "Preparación de hapteno nativo de *B. melitensis* 16M" *Ann. Rech. Vet.* 1981.12:35-39.
23. Estes DM, Brown WC. Type 1 and type 2 responses in regulation of a isotype expression in cattle. *Vet. Immunology and Immunophatology*. 2002. 90:1-2; 1-10.
24. Estrada-Chávez C, Mancilla R, Arriaga DC, Pérez GR, Díaz OF. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con diferentes prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Veterinaria México*. 2001;32:3:207-211.
25. FAO- OIE-WHO. Anuarios de Sanidad Animal. 1993–1995. Sanidad Animal Mundial.
26. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin -10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Inf and Immunity* 1995.V63:3:1130-1133.
27. Forero de Lleras, C. Rueda de Clavijo E, Mariño JOC, Deleón LS. Purificación y caracterización de proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*. *Networking in Brucellosis Research*. Ed. United Nations University Press, 1991 Cap. 6:54-68.
28. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang L, Zaitseva M, Lapham C, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and infection*. 2001; 3: 43-48.
29. Gómez CA, Leal HM, Alfonseca SE, Monitoreo de la respuesta serológica en becerras vacunadas con cepa de *Brucella abortus* RB51, utilizando un ELISA indirecto. XXXVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Sonora 2000. p 142.
30. Jensen AE, Ewatt DR, Cheville NF, Thoen CO, Payeur JB, Determination of stability of *Brucella abortus* RB51 by use of genomic fingerprint, oxidative metabolism, and colonial morphology and differentiation of strain RB51 from

Brucella abortus isolates from bison and Elk; Journal of Clinical Microbiology, 1996.34:3:628-633.

31. Jyhshiu L and Ficht T. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage. Inf. and Immunity 1995.V63:4:1409-1414.

32. Kee H. Ng, Frank E Aldwell, D. Neil Wedlock, James D. Watson, Bryce M Buddle. Antigen-induced interferon- γ and interleukin-2 responses of cattle with *Mycobacterium bovis*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1997,57:59-68.

33. Lawman MJ, Ball DR, Hoffmann EM, Desjardin LE, Boyle MD. Production of *Brucella abortus* specific protein A-reactive antibodies (IgG2) in infected and vaccinated cattle. Vet Microbiol. 1986;12:1:43-53.

34. Leal HM. Evaluación de la respuesta inmune en becerras de la raza Holstein vacunadas con la cepa RB51 *Brucella abortus*. (Tesis de Licenciatura). México, DF. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 2000a.

35. Leal HM, Díaz AE, Pérez GR, Hernández AL, Arellano RB, Alfonseca SE, Suárez GF. "Vacunación y revacunación con RB51 *Brucella abortus* en bovinos introducidos a un hato con un brote activo de brucelosis" En: XVII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias PANVET. Celebrado en Panamá. Del 11-15 de septiembre de 2000b. p 250.

36. Luna MJE, Mejía TC. Brucellosis in Mexico: current status and trends. Veterinary Microbiology. 2002, 90, 19-30.

37. Herrera LE. Comportamiento de la vacuna rugosa RB51 en hatos bovinos con diferentes prevalencias de brucelosis. Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Octubre, 2002.

38. Marín ACM, Blasco MJM. Diagnóstico de la brucelosis animal. En: diagnóstico de Brucelosis animal. E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano y cols. editores. INIFAP, SAGAR. 2001:28-55.

39. McQuinston JR, Vermulapalli R, Inzana TJ, Schurig GG, Sriranganathan K, Fritzing D, et al, Genetic characterization of a Tn5 - disrupted glycosyltransferase

- gene homologin *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Inf. and Immunity* 1999.V67:8:3830-3835.
40. Meyer ME. *Brucella*. En: Biberstein EL, Zee CY. Tratado de microbiología veterinaria. España: Ed. Acribia, 1990:283-291.
41. Montaña SNI; Rueda LOE; Calderon PCP; Ortega A; Puentes AR; Gallego MMI; Marino JOC. Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA-CEISA, Colombia Archivos de Medicina Veterinaria. 1998, 30: 2, 109-123.
42. Moriyón UI, López-Goñi I. Estructura genética y fisiología del género *Brucella*. En: Diagnóstico de Brucelosis. E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano y cols. editores. INIFAP, SAGAR. 2001:17-27.
43. Norma Oficial Mexicana de Emergencia, NOM - EM- 011-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la brucelosis de los animales. 01-23-95
44. Olsen SC. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Research in Veterinary Science*. 2000: 69: 135-140.
45. Orozco VL, López R, Díaz AE, Vázquez J, Hernández AL, Suárez GL, Evaluación de la vacunación RB51 *Brucella abortus* de un hato bovino en un brote de brucelosis en Memorias XXXV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1999.160.
46. Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchin F. Mouse cytokine profiles associate with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *Brucella abortus* 2308. *Infection and Immunity*. 2001.69:10:6541-6544.
47. Pérez PL. Evaluación serológica de la vacuna de *Brucella abortus* cepa rugosa mutante por transposición, en un hato de bovinos con brucelosis. (Tesis de Licenciatura). México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1997.
48. Pizarro-Cerdá J, MorenoE, Gorvel JP. *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofesional phagocytes. *Advanced in Cell & Mol Biology of membranes and organelles*. 1999:V6:201-232.

49. Pouillot R, Garin-Bastuji, Gerbier G, Coche Y, Cau C, Dufor B, Motou. The brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet Research*. 1997; 28; 365-374.
50. Quiroz RH. Fasciolosis, Dicroceliasis y Paramfistomosis. En: *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. UTEHA Noriega editores, México, 1ª edición 1984:10:232-251.
51. Rhodes SG, Gavier-iden D, Buddle BM, Whelan AO, Singh M, Hewinson RG, Vordermeier HM. Antigen specificity in Experimental Bovine Tuberculosis. *Infection and Immunity*, 2000;68:5:2573-2578.
52. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine Inf- γ its use for detection of tuberculosis in cattle, *AVJ* 1990.V:67:4:134-137.
53. SAGAR. Manual de actualización técnica para la aprobación de Médicos Veterinarios como unidades de verificación en tuberculosis y brucelosis. FEDMVZ, México. 1996.
54. Samartino LE, Fort M, Gregoret R, Schurig GG, Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calthood vaccination with strain 19 in Argentina, *Preventive Veterinary Medicine*. 2000.45:193-199.
55. Sánchez CY, Piedra PL, González SM, Inmunología de la *Brucella abortus*, UAM, Departamento de producción agrícola y animal, México 1998, www.intramed.uam.mx/brucc/content.htm.
56. Sangari FJ, Agüero J, Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiología sem12*, 1996:12:2:18
57. 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.
58. Schurig GG. Vacunas contra la brucelosis: Pasado Presente y Futuro, cepa RB51. *Memorias 14ª Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero*. CIGAL. 1998:45.
59. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín informativo de epidemiología. Brucelosis, una enfermedad actual. *SNVE, SSA*. 1998:15:2.

60. Stevens MG and Olsen SC. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Inf. and Immunity* 1996;64:3:1030-1034.
61. Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus*, strain 19 or RB 51, *Vet Immunology and Immunopathology* 1995;44:223:235.
62. Tizard IR. Fármacos y otros agentes que afectan al sistema inmunitario. En: *Inmunología Veterinaria*. 5ª edición, México, McGraw-Hill Interamericana. 1996;36:504-512
63. Uzal FA, Samartino L, G Schurig, Carrasco A, Nielsen K, Cabrera RF, Tadeo HR. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle, *Veterinary Research Communications*, 2000;24:143-151.
64. Vermulapalli R, He Y, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. *Brucella abortus* strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune response. *Inf. and Immunity* 2000a;68:6:3290-3296.
65. Vermulapalli R, He Y, Buccolo S, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Inf. and Immunity* 2000;68:7:3927-3932.
66. Villamil M, Rueda E, Gallego I, Mariñon OC, Gutiérrez GA, Respuesta inmune humoral y celular en cobayos inmunizados con Proteínas de Membrana Externa de *Brucella abortus* cepa RB51. *Archivos Med Vet XXVII* 1995. 77-84.
67. Weynants V, Godfroid J, Limbourg B, Saegerman C, Letesson J-J. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. , *J. Clin. Microbiol.*, 1995, Vol. 33, Nº 3:706-712
68. Weynants V, Walraven SK, Didembourg C, Flanagan P, Godfroid J, Letesson J-J. Quantitative Assessment by flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific γ interferon in B immune cattle, *Vet Immunology and Immunopathology*. 1998;66:309-320.

69. Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based of the production of γ interferon. Reserch in Vet Science, 1990.49, 46-49.
70. Wood PR, Comer LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SI, Cousins DB, Mc Cormick BS, et al. Field Comparison of the INF γ assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust Vet Journal, 1991.V:68:9:268-269.
71. Zhan Y, Cheers C, Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. Inf. and Immunity 1993.V61:11:4899-4901.
72. Zhan Y, Cheers C, Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. Inf. and Immunity 1995.V63:4:1387-1390.
73. Zhan Y, Kelso A, Cheers C, Differential activation of Brucella-reactive CD4+ T Cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts, Inf. and Immunity 1995.V63:3:969-975.
74. Zhan Y, Liu Z, and Cheers C. Tumor necrosis factor Alpha and inteleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. Inf. and Immunity 1996.V64:7:2782-2786.