

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“ESTUDIO DE LA RESPUESTA POSTVACUNAL ATÍPICA, EN VACAS
REVACUNADAS CON RB51 DE *Brucella abortus*”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

ANGEL SALVADOR ROBLEDO AGUILAR

ASESOR: DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO

COASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2006.



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.

DEDICATORIAS

A MI ABUELITA ANDREA (†).

Por enseñarme que nada es obstáculo para realizar lo que uno se propone y que la felicidad no depende de cuanto dinero tengas, y me sigue cuidando desde el cielo.

A MIS PADRES

Por darme el mejor regalo que es la vida y demostrarme que todo es posible si se hace con buena voluntad.

A MIS “APAS” ROSA Y CARLOS

Por su apoyo a través de todos estos años, por enseñarme los valores que siempre irán conmigo y sobre todo porque nunca perdieron la paciencia para que pudiera lograr este gran sueño.

A MI HERMANITO CARLOS (“CHAMUCO”)

Porque 20 años no fueron obstáculo para tener un hermano con el cual jugar, platicar y divertirme, porque se que va a lograr todo lo que se proponga.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por realizarme a su imagen y semejanza, pero aceptarme como una “copia pirata”

A MI MADRINA BETY

Sobre todo por el apoyo a mi hermana y a mi cuando mas lo necesitamos y por permitirse ser mi primer “cliente” de esta bella carrera
(por supuesto gracias a Cici y a Gamma).

A “DON CARLITOS” (ANGEL)

Tarde, pero se lo prometí “ese” día

A MIS MASCOTAS

Porque por ellas y para ellas estudie Medicina Veterinaria.

AL DOCTOR OSCAR DÍAZ

Gracias por enseñarme todo lo que se de la clínica de perros de manera desinteresada, siempre tener un consejo cuando lo necesito, por nunca saber decir “no se puede” demostrándome que todo es cuestión de ingenio.

A MIS ASESORES

Dr. Morales, Dr. Efrén: quizá no fui el tesista mas dedicado, pero quiero que sepan que si soy el mas agradecido con ustedes por todo el apoyo brindado en esta tesis.

A MIS SINODALES

Por sus acercados y oportunos comentarios para la mejora de esta tesis.

A TODOS MIS MAESTROS

Porque me llevo de ellos valiosos conocimientos, que han juntado a través de sus años de experiencia, y que estoy seguro me ayudaran en mi práctica profesional.

EN EL INIFAP

A toda la gente que me ayudo en esta tesis, a todos los Doctores, compañeros tesisistas, no doy nombres por no cometer algún pecado de omisión, pero todos y cada uno de ustedes saben cuanto contribuyeron en este proyecto.

COMPAÑEROS DE FACULTAD

Porque compartimos la misma pasión por los animales, y de antemano se que nos estaremos apoyando para juntos dignificar aún mas esta hermosa carrera.

A TODO EL BARRIO DE “SANTA JULIA”

Por ser mi origen, por darme una fiesta de 3 años que durará toda mi vida, por mostrarme que no importa quien seas ni a lo que te dediques, siempre estarán allí para ayudarte

INDICE

	Página
Título	
Resumen	
Introducción.	
• Agente etiológico.1
• Epidemiología.2
• Cultivo y Morfología.3
• Inmunología de la brucelosis.5
• Diagnóstico8
• Profilaxis.9
• Hipótesis.12
Objetivos.	
• Objetivos Generales.12
• Objetivos Particulares.12
Material y métodos	
• Sueros de animales.13
• Pruebas serológicas.15
• Obtención del NH.15
• Protocolo para la realización de la ELISA.16
• Realización de la IDR.18
Resultados.19
Discusión.30
Conclusiones.35
Anexo.36
Bibliografía.38

RESUMEN

Un hato lechero localizado en una zona endémica de brucelosis y con una prevalencia del 39.2% fue vacunado y revacunado con la cepa RB51. Un grupo de nueve vacas y otro de seis vacas fueron clasificados de acuerdo a su respuesta a las pruebas serológicas de tarjeta y rivanol. Adicionalmente, un grupo de animales infectados y otro de animales provenientes de un hato libre de brucelosis se usaron como testigos positivos y negativos respectivamente. Realizándose un seguimiento serológico mensual mediante ELISA indirecta con LPS de *B. abortus* 2308 (LPS-S) como antígeno primario y anti-IgG1, IgG2 e IgM como antígenos secundarios. Las vacas vacunadas y revacunadas, positivas a tarjeta y rivanol, presentaron una respuesta mayor a la IgG1. Los animales infectados mostraron principalmente una respuesta a la IgG2 y fueron positivas a la prueba confirmatoria de Inmunodifusión radial (IDR). Las vacas inmunizadas tuvieron respuesta inmune frente al contacto con la cepa de campo, que se observó como positividad temporal de dos o tres meses a la prueba de tarjeta, volviéndose después negativa, lo que evidencia que la infección de campo fue controlada. En zonas endémicas de brucelosis las pruebas confirmatorias como IDR, rivanol con títulos a partir de 1:100, o el ELISA con LPS-S como antígeno de captura e IgG2 como anticuerpo secundario, son indispensables para diferenciar a los animales vacunados con RB51 que presentan una respuesta inmune transitoria, de aquellos que están infectados.

INTRODUCCIÓN.

La brucelosis, también conocida como Enfermedad de Bang, Fiebre ondulante, Fiebre de Malta ^{4, 9, 12, 13}, Fiebre rocosa de Gibraltar, Fiebre del Condado de Constantinopla, Fiebre de Creta ²³ en los humanos y Aborto contagioso en los animales. ^{9, 12, 13} Es una enfermedad importante en los bovinos y es considerada como la principal zoonosis de origen bacteriano. En algunos países la han erradicado, pero en otros como el caso de México la brucelosis sigue siendo un problema endémico al que se enfrenta el sector salud. ^{5, 9, 13, 25, 31,}

La brucelosis fue descrita inicialmente en forma clínica por Marston en 1859, David Bruce, identificó a *Micrococcus melitensis* (*Brucella melitensis*) en 1887 de soldados británicos enfermos, que murieron aparentemente a causa de brucelosis en Malta, ¹⁰ *B. abortus* fue reconocida por Bang en 1897 y *B. suis* por Traum en 1914. ¹³

Sus principales hospedadores son: bovinos (*B. abortus*), cabras (*B. melitensis*), cerdos (*B. suis*), borregos (*B. ovis*), perros (*B. canis*) y rata silvestre (*B. neotomae*) aunque puede haber infecciones cruzadas. ^{2, 8, 13, 20, 25} En ovejas y cabras existe una alta tasa de positividad a pruebas serológicas con antígenos de *B. abortus* sin aislamiento de *B. melitensis*. ³⁴

Las especies de *Brucella* muestran más de 95% de homología en el ADN entre ellas, ² por lo que estudios de similitudes del ADN tratan de demostrar que sólo existe una especie en el género: la *Brucella melitensis* con múltiples biotipos. ^{4, 21}

Aunque *B. suis* y *B. canis* pueden infectar al humano, *B. melitensis* y *B. abortus* representan unas de las causas más importantes de brucelosis humana. Esta enfermedad ha sido considerada ocupacional, los trabajadores de alto riesgo como veterinarios y los ordeñadores se infectan principalmente por el contacto con secreciones vaginales, animales en proceso de parto y leche contaminada.

Además, esta enfermedad representa un gran riesgo para la salud pública, ya que el consumo de leches no pasteurizadas o subproductos lácteos, como quesos y mantequillas contaminadas pueden ser fuente de infección.^{2,,30}

La principal especie causal de la brucelosis en los bovinos, es *B. abortus*^{5, 25} y se han identificado al menos 9 biotipos, incluyendo variantes de algunas cepas. El biotipo 1 es el más importante en México.²⁵

EPIDEMIOLOGIA

La infección se produce en bovinos de todas las edades, en los becerros a través de la ingestión de leche contaminada con brucela proveniente de vacas infectadas,^{24, 28, 30} por vía congénita se puede presentar en terneros nacidos de vacas infectadas; aunque su frecuencia es baja la infección se produce *in útero* y puede permanecer latente en los animales durante los primeros meses de vida debido a los anticuerpos recibidos en el calostro y ser serológicamente positivos hasta los 4-6 meses de edad y posteriormente ser seronegativos hasta su primer parto, momento en el que comienzan a eliminar la bacteria.²⁵

La infección es más frecuente en adultos, especialmente en vacas lecheras^{13, 25} la principal ruta de infección es cuando un animal susceptible tiene contacto directo con los fetos abortados, membranas placentarias, fluidos uterinos o descargas vaginales (derivadas de animales infectados) y esto dependerá del número de bacterias eliminadas, las condiciones ambientales para la sobrevivencia de la bacteria y que el animal susceptible se exponga a un número de bacterias suficientes para producir una infección.²⁵ Por vía sexual es rara la transmisión.

Los abortos se producen con mayor frecuencia en el último tercio de la gestación y antes se afirmaba que esto dependía de la presencia de eritritol,^{4, 23} un alcohol polihídrico de 4 carbonos (HOCH₂-CHOH-CHOH-CH₂OH) que se encuentra en los líquidos alantoideo y amniótico bovino y que era un factor que estimulaba el

crecimiento de *B. abortus*,^{4, 5} pero estudios mas recientes¹¹ afirman que la alta patogenicidad es independiente a la presencia ó no de eritritol. Los toros pueden padecer aunque no frecuentemente orquitis, epididimitis y vesiculitis seminal,^{2, 13, 25, 34} además puede producir higromas y esterilidad.

CULTIVO Y MORFOLOGIA

El análisis del ácido nucleico y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a *Brucella* dentro de la subdivisión -2 de la Clase *Proteobacteria*, en la que están también otros patógenos intracelulares animales.^{12, 20} Está clasificada como un cocobacilo Gram negativo, que mide aproximadamente de 0.6 a 1.5 µm de longitud y 0.5 a 0.7 µm de diámetro,^{9, 13, 30, 35} son microorganismos que crecen en medios enriquecidos y selectivos en el primoaislamiento; sin embargo, su crecimiento es lento ya que requiere de un periodo de incubación de tres días o más. La temperatura de crecimiento varía de 20°C a 40°C, con un óptimo de 37°C y un pH entre 7.0 y 7.2.²⁵ En los cultivos por lo general aparecen los bacilos aislados o en pares, a veces se ven formando cadenas cortas o en grupos; no tiene cápsula y son inmóviles.^{3, 5, 13, 35} Forman colonias lisas y transparentes; durante el cultivo tienden a cambiar a la forma rugosa, que es avirulenta.⁴ La bacteria es sensible al calor, la luz solar y a los desinfectantes convencionales, su congelación le permite una supervivencia indefinida.^{13, 25} Es un patógeno intracelular facultativo, puede sobrevivir dentro de los fagocitos, particularmente dentro del macrófago.^{3, 7, 9, 13, 30, 35}

La brucela posee una envoltura celular conformada por una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos (LPS) proteínas y fosfolípidos,^{29, 30} no se conoce en detalle la estructura del núcleo del LPS, si bien se sabe que contiene 2-ceto, 3-deoxioctulosonato (KDO), glucosa, galactosa y quinovosamina, y que carece de heptosa.^{2, 9,} Como en otras bacterias gram-negativas, el LPS consta de una parte glucolipídica (lípidio A), formada por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con betahidroxiácidos y otros ácidos grasos de cadena larga insertados en la

membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie,^{2, 9, 20} pero que se ha demostrado que juega un papel importante en la resistencia a los péptidos catiónicos bactericidas^{9, 29,} y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior, esta última se divide en dos secciones: el núcleo, más interno, y la cadena O.^{2, 9, 20}

A esta composición se debe el que algunas de las funciones características de los LPS relacionados con la endotoxicidad, como la pirogenicidad, sean diferentes en *Brucella*, lo que podría tener gran significado en la patogénesis. Como antígeno, el lípido A no parece tener relevancia diagnóstica.²

Hay especies de *Brucella* que de forma natural siempre carecen de cadena O auténtica, llamadas especies rugosas (*B. ovis*, *B. canis*) y las especies lisas que característicamente la poseen como *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*. Esta diferencia, sea por causas naturales o por mutación es importante, ya que las brucelas habitualmente patógenas para el hombre (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) poseen LPS en fase lisa (LPS-S) que está formado sólo por un tipo de azúcar, la N-formilperosamina y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica ya que contiene los epítomos relevantes para el diagnóstico serológico realizado con pruebas que detectan anticuerpos frente al LPS-S, que son aquellas que emplean suspensiones celulares o extractos que contienen LPS-S.²

Además de la cadena O del LPS, las brucelas en fase S contienen un segundo polisacárido, habitualmente llamado hapteno nativo. Salvo en la unión al núcleo del LPS, el hapteno nativo es químicamente idéntico a la cadena O, su papel biológico, sin embargo, podría ser diferente, pues el hapteno nativo podría representar una molécula de superficie que, insertada entre los LPS-S, contribuiría a dar a la superficie características de tipo S sin incrementar la densidad de LPS y sus secciones internas.²

Inmunología de la brucelosis

Durante el curso de la infección con *B. abortus* la bacteria permanece dentro de las células, por lo que éstas últimas son las responsables, ya sea de destruir al patógeno o ser destruida para que otros mecanismos puedan acceder a *Brucella* y eliminarla, por ejemplo, los mediados por anticuerpos que a través de receptores entregan señales para activar células presentadoras de antígenos (CPAs) para facilitar la fagocitosis de las bacterias y esta sea procesada y sus péptidos sean expresados en la superficie de la CPAs, junto con moléculas clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC),¹² esta reacción inicial no es específica, y es llamada inmunidad innata. Las células fagocíticas como los macrófagos y los PMN poseen mecanismos microbicidas intracelulares oxígeno dependiente y oxígeno independientes capaces de destruir patógenos intracelulares, estos mecanismos incluyen funciones como la acidificación de los lisosomas, proteínas quelantes de hierro, hidrolasas lisosomales, producción de arginasa, lisozima y péptidos catiónicos.⁹

En esta fase de la respuesta temprana, unas células del mismo precursor linfoide que las células T, las células NK (asesinas naturales) juegan a menudo un papel importante para responder a la invasión de microorganismos.¹² Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las brucelas son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los nódulos linfáticos más próximos.²

Se ha sugerido que la cadena O del LPS es un factor esencial para la sobrevivencia de brucela, una vez que la bacteria ha sido fagocitada, es expuesta al medio hostil de los compartimentos fagolisosomales dentro de la célula fagocítica. El ensamble de esta estructura puede ser inhibido por cepas virulentas de *B. abortus*, mediante extractos de superficie (proteínas, azúcares, aminoácidos y carbohidratos) no relacionados con el LPS, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, de esta manera, el LPS se considera un factor de virulencia, que genera una eficiente barrera protectora cuando la bacteria se expone a la actividad digestiva de los fagocitos,^{9, 29} además de la expresión de proteínas como enzima

superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) y la proteasa de respuesta a temperaturas aumentadas (HtrA). Estas proteínas juegan un papel importante en la patogenicidad inducida por la *B. abortus*, ya que son importantes componentes de defensa contra la respuesta oxidativa generada por el hospedero.²⁹ pudiendo sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células del sistema reticuloendotelial.²

Si las bacterias no son destruidas, los nódulos linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses. Cuando las bacterias no son aisladas y destruidas en los nódulos, se produce su diseminación a través de la vía linfática o más frecuentemente a través de la sangre. La bacteremia puede persistir intermitentemente durante meses, dependiendo de la resistencia del hospedador, sin embargo, su interacción con los componentes del suero (anticuerpos, complemento, etc.), neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales da como resultado la producción de una amplia variedad de sustancias capaces de activar los macrófagos, expandir clones de linfocitos T, estimular la hematopoyesis e inducir una reacción inflamatoria.²

Debido a que la brucela es capaz de replicarse en el medio ambiente intracelular, se asume que una respuesta inmune celular es de vital importancia para eliminar o proteger al hospedero de la infección por este microorganismo.^{7, 12, 16, 27} La producción rápida de interleucina 12 (IL-12) durante la infección con *B. abortus*, es de vital importancia para activar las células Th1 productoras de interferón gamma (IFN γ) y de esta manera contribuir a la inducción de la respuesta celular adquirida. De igual manera el factor de necrosis tumoral (TNF α), una citocina proinflamatoria producida durante la infección intracelular, participa en el desarrollo de la resistencia a la *B. abortus*, probablemente mediante una acción directa sobre las células efectoras y no mediada por el interferón, ya que la ausencia de esta citocina no causa una disminución en la producción de IFN γ .^{29, 30}

La inmunidad contra *B abortus* involucra respuestas humorales y activación de células T antígeno-específicas, células T CD4⁺ y CD8⁺, y la inmunidad protectora, particularmente por los linfocitos CD8⁺, ha sido demostrada por ensayos en ratones.^{3, 8, 20} La activación de las células T CD4, puede inducir su diferenciación en células efectoras y células de memoria.¹²

Además las células T CD4⁺ y CD8⁺, expresan IL12, que activa a las células Th1 que son productoras de INF γ e IL 2, estas citocinas estimulan la diferenciación de las células B en células secretoras de anticuerpos predominando la clase IgG₂ y a las células T CD8 para diferenciarse en células efectoras, como lo son las células T citotóxicas que también pueden secretar INF γ ⁸ para contribuir a la inducción de la resistencia celular, ya que en éstas se promueve una eficiente actividad citolítica contra células infectadas del huésped.^{7, 12, 16, 27}

Estudios recientes demostraron que *B. abortus* induce una respuesta principalmente tipo Th1,³⁵ que se reconocen como las mediadoras de la inmunidad celular, entre las citocinas que se producen, el INF γ desempeña un papel preponderante por ser la citocina con mayor capacidad activadora de los macrófagos. aún los macrófagos parasitados por la brucela responden al efecto del INF γ produciendo TNF α ,²⁷ por lo que la inducción de una respuesta Th2 parece ser contraproducente para el control de la infección causada por brucela, ya que se produce IL-10, citosina que esta involucrada en la regulación negativa de la respuesta inmune protectora, inhibiendo el patrón Th1 que está relacionado a la producción de INF γ o bloqueando las citocinas inducidas por la activación del macrófago, pero se sugiere que las células CD8 pueden inhibir la producción de IL-10.^{29, 30}

Los linfocitos B reconocen al antígeno asociado a moléculas MHC-II de las células presentadoras de antígeno y esta interacción estimula a las células B a producir anticuerpos¹⁶ para combatir a los microorganismos intracelulares. Se generan principalmente isotipos IgG e IgM y se cree que es debido a que tienen mayor

facilidad que otros isotipos para reconocer antígenos de superficie en células infectadas y las matan, estas propiedades pueden ser atribuibles a la mayor longitud y flexibilidad de la región “bisagra” de estos anticuerpos.¹²

La concentración de anticuerpos IgM aumenta en la primera semana de la enfermedad aguda, alcanza un máximo a los tres meses, y puede persistir durante la enfermedad crónica, la concentración de anticuerpos IgG aumenta casi tres semanas después de iniciada la enfermedad aguda, alcanza un máximo a las seis a ocho semanas y permanece así durante la enfermedad crónica,⁴ y la concentración total de IgG₂ se incrementa con la edad y en el caso particular de la IgG₂ anti *Brucella*, su concentración aumenta en relación directa, al nivel de exposición al antígeno.²⁸

DIAGNÓSTICO

En México, el diagnóstico oficial de la brucelosis bovina se realiza mediante las pruebas serológicas de tarjeta (PT), rivanol (RIV), 2-Mercaptoetanol (2-ME) y fijación del complemento (FC);²⁶ sin embargo, durante el desarrollo de estas pruebas indirectas se pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias, un ejemplo es *Yersinia enterocolitica* serotipo 0:9, que posee una cadena O formada por N-formil-perosamina que es muy similar a la de *Brucella abortus*,² obteniéndose en consecuencia resultados falsos positivos^{2, 10, 23, 24, 26} que pueden llegar a un 15% en estudios realizados en bovinos de áreas libres de brucelosis²⁴ En este caso, para la diferenciación en hatos en fase de erradicación, se recomienda realizar la prueba de Hipersensibilidad de tipo retardado (DHT) “brucelina”, esta prueba se recomienda oficialmente en la Unión Europea para diferenciar reacción cruzada en áreas donde la vacunación se ha discontinuado. Sin embargo, esta prueba es complicada y cara.²⁴

El diagnóstico definitivo de la brucelosis se lleva a cabo con el aislamiento de *Brucella*, a partir de tejidos, líquidos corporales y leche, la confirmación de la

presencia de este microorganismo, significa que el animal es positivo, aun en ausencia de anticuerpos séricos, sin embargo, los procedimientos bacterianos no son siempre exitosos, son tardados y representan un riesgo de infección para los técnicos de laboratorio.²⁶

PROFILAXIS

La vacunación proporciona una inmunidad frente a la infección natural con cepas de campo. Los bovinos vacunados correctamente tienen menos probabilidades de infectarse.²⁵

Algunas de las características ideales de una vacuna contra brucela son:

Debe ser viva, avirulenta, ser estable y no producir reversiones virulentas *in vivo* o *in vitro*, no debe inducir anticuerpos que interfieran con el serodiagnóstico, pudiendo tener marcadores fenotípicos o genéticos específicos que permitirán diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo, o que los anticuerpos fueran dirigidos a proteínas de la bacteria que evitara reacción cruzada con otras bacterias. Además de que no debe producir enfermedad ni infección persistente en los animales inmunizados ni provocar el aborto si se administra a animales preñados, tampoco ser patógena para el humano.^{17,30,}

Para inmunizar al ganado bovino se empleaba tradicionalmente la vacuna viva atenuada cepa S19 de *B. abortus*, de fenotipo liso, de baja patogenicidad, estable, de inmunogenicidad relativamente alta y que no se propaga de animal a animal. Esta vacuna en su presentación de dosis clásica se ha elaborado en México desde 1951, pero tiene como desventaja el manifestar reacciones positivas a las pruebas diagnósticas oficiales hasta 12-18 meses posteriores a su aplicación, además de que puede inducir abortos.^{13, 31, 20}

En México, a partir de 1998 la vacuna RB51 se empezó a utilizar en los programas de control dentro de la campaña oficial,¹³ el término RB51 corresponde **R** a rugosa **B** a *brucella* y **51** se refiere a una nomenclatura propia del laboratorio que la desarrolló¹⁵ (Rough *Brucella* subculture 51).¹⁷

La vacuna RB51 es una mutación rugosa estable y viva de *B. abortus* cepa 2308 que carece de la gran parte de la cadena O del lipolisacárido (LPS),^{7, 13, 17, 20, 25, 30, 31, 35} tras la vacunación no se propaga de animales vacunados a terneros sin vacunar, la tasa de abortos y becerros nacidos débiles, tras la vacunación a vacas preñadas a los 180 días de gestación, llega a menos del 1%.¹³

Se ha establecido que la inmunidad conferida en bovinos por esta cepa vacunal es esencialmente mediada por células,^{30, 35} en un ensayo linfoproliferativo utilizando antígenos derivados de la *B. abortus* 2308 y RB51. Esta capacidad protectora puede ser debida a la activación primaria de una población de linfocitos T cooperadores encargada de antagonizar la subpoblación Th2, responsable de inducción de la respuesta inmune humoral.³⁰

Esta cepa vacunal ha demostrado inducir inmunidad frente a *B. abortus* en estudios realizados en bovinos, aparentemente sin producir interferencia en las pruebas serológicas de diagnóstico rutinario, como por ejemplo tarjeta y rivanol, ya que no se presenta respuesta a anticuerpos a la cadena O, por lo que cualquier animal que presentara una reacción positiva a estas pruebas debiera ser considerado como infectado,⁷ pero en trabajos previos con animales vacunados y revacunados con RB51, el 17% resulto positivo a prueba de tarjeta, pero negativos a prueba de rivanol durante varios meses. Durante el tiempo post-vacunal, el diagnóstico es incierto porque el programa de control en México establece que en el caso de encontrar animales positivos a prueba de tarjeta después de la vacunación o revacunación con RB51, éstos deben ser considerados como infectados.¹⁴

Para explicar la respuesta atípica, se cree que la estimulación primaria se activa con la vacunación de RB51, y después a causa de la diseminación extensiva de brucela en zonas endémicas, las vacas pudieran desarrollar una respuesta secundaria, de esta manera ocasionalmente se puede ver que los animales tienen anticuerpos y resultan positivos a pruebas oficiales, porque entran en contacto con el agente, pero el sistema inmune puede controlar la infección, ya que no resultan positivos a prueba de inmunodifusión y aislamiento bacteriano, lo que indica que no están infectadas, por lo que pruebas confirmatorias continúan siendo indispensables para diferenciar animales vacunados de animales infectados, como son la prueba de Inmunodifusión radial (IDR) y la ELISA competitiva.⁷

Tanto en bovinos infectados como en vacunados, la respuesta humoral incluye la síntesis de anticuerpos de la clase IgM e IgG, sin embargo, en la vacunación contra la brucelosis, el nivel de anticuerpos cae rápidamente, de tal manera que a los seis meses no se encuentra IgG₂ y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG₁. En contraste con los animales infectados donde hay altos niveles de IgG₁ e IgG₂, después de seis meses post-infección. Algunos estudios indican que en la infección y vacunación, se estimula la aparición de IgM e IgG frente al LPS.^{1,15, 28}

Hipótesis

El comportamiento de la respuesta serológica post-vacunal de bovinos revacunados con RB51, presenta una respuesta atípica cuando es aplicada en zonas endémicas de brucelosis.

Objetivos

Objetivo general.

- ❖ Estudiar la respuesta serológica post-vacunal atípica, en hatos revacunados con RB51, con diferente prevalencia de brucelosis.

Objetivos particulares.

- ❖ Estandarizar la ELISA indirecta usando como antígeno LPS-S de *B. abortus* y como conjugados: Anti IgG1, anti IgG2 y anti IgM.
- ❖ A través de la ELISA, realizar un seguimiento del perfil de inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgM en bovinos revacunados con RB51, para evaluar la respuesta serológica post-vacunal atípica.

Material y métodos

Animales:

Se utilizaron sueros de bovinos, obtenidos de un trabajo previo, muestreados de hatos con diferente prevalencia de brucelosis:

- 15 sueros de bovinos revacunados con RB51 proveniente de un hato estabulado en el complejo agropecuario de Tizayuca, Hidalgo (con una prevalencia de 39.2% de brucelosis), este grupo a su vez, se dividió en dos: 9 vacas seropositivas a la prueba de tarjeta y rivanol y 6 vacas seropositivas a la prueba de tarjeta y negativas a la prueba de rivanol, todas fueron revacunadas por vía subcutánea con 2.0 ml de la cepa RB51, a una concentración 3×10^9 UFC/ml (Laboratorio PRONABIVE®), siendo este el hato infectado (Tizayuca, Hidalgo).
- 12 sueros de bovinos revacunados con RB51 por vía subcutánea con 2 ml de la cepa RB51 con una concentración 3×10^9 UFC/ ml (Laboratorio PRONABIVE®), seronegativas a la prueba de tarjeta y rivanol, provenientes del Rancho 4 Milpas propiedad de la UNAM ubicado en Tepetzotlán, Estado de México. Este hato es libre de brucelosis
- 25 sueros de bovinos que no fueron vacunados, de un hato negativo localizado en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, que fue utilizado como grupo control negativo.

- 12 sueros de bovinos positivos a tarjeta y a rivanol (1:400), que fungió como grupo control positivo, proveniente del complejo agropecuario de Tizayuca, Hidalgo, en este hato, se habían registrado abortos y posteriores aislamientos de *Brucella*.

En los grupos provenientes de Tizayuca y Tepetzotlán, se realizó la revacunación con RB51 de *B. abortus* cuatro meses antes del primer muestreo, realizándose 4 muestreos mensuales, del grupo de Veracruz se contó con un solo muestreo ya que no se realizó vacunación.

Grupo	Rancho	Numero de animales	Prueba de tarjeta	Prueba de rivanol
1 A (alta prevalencia)	Tizayuca	9	+	+
1 B (alta prevalencia)	Tizayuca	6	+	----
2 (baja prevalencia)	4 milpas	12	----	----
3 (control negativo)	Martínez de la Torre	25	----	----
4 (control positivo)	Tizayuca	12	+	+

Pruebas serológicas

Prueba de tarjeta. Se les practicó a todos los sueros considerando positivos a los que presentaron cualquier tipo de aglutinación, con un antígeno comercial, 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.

Prueba de rivanol. Se les realizó la prueba como confirmatoria a los sueros de los animales que resultaron positivos a la prueba de tarjeta, utilizándose 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 ¹

Prueba de ELISA Indirecta, se les realizó a todos los sueros, utilizando conjugados anti-IgG1, anti-IgG2 y anti-IgM producidos en ovinos, conjugados con peroxidasa ² y como antígeno hapteno nativo a partir de células completas

Prueba de IDR. Se les realizó a los sueros de los animales que resultaron positivos a la prueba de tarjeta y prueba de rivanol, utilizando como antígeno hapteno nativo a partir de células completas.

Obtención del hapteno nativo (NH) a partir de células completas:

Se cultivó la cepa RB51 de *B. abortus* en agar biotriptasa-soya por 48 h, a 37°C, resuspendiéndose las células en agua destilada a razón de 30 g de peso húmedo/100 ml y se metió a un autoclave a 120°C durante 30 min. Después de un proceso de enfriamiento se retiraron los restos celulares por centrifugación a

¹Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.

²Laboratorio Bethyl. Inc. Texas USA)

12,000 x g por 30 minutos a 4°C; posteriormente, se precipitó el sobrenadante con tres volúmenes de etanol frío a 4°C durante 18 h con agitación magnética, seguido de centrifugación a 5,000 x g por 15 min a 4°C y conservándose el sobrenadante, agregándole a mismo dos volúmenes de etanol frío y se dejó precipitar a -20°C por 24 horas, por último, se centrifugo el nuevo precipitado obtenido, suspendiéndolo posteriormente en dos ml de agua, dializándose a través de un poro con un límite de exclusión de 12 a 14 kDa toda la noche a 4°C, haciéndose 2 ó 3 cambios de agua destilada y la posterior liofilización.

Protocolo para la realización de la ELISA INDIRECTA con hapteno nativo como antígeno de la cepa RB51 de *B. abortus* para detección de IgG1, IgG2, IgM.

Estandarización

Los sueros de los animales y el conjugado antes de realizar las pruebas fueron usados a diferentes concentraciones para obtener los valores más adecuados para su análisis, los sueros se diluyeron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a concentraciones de 1:50, 1:100, 1:200 y 1:300, utilizándose para la prueba final la dilución 1:200, en el caso del conjugado, los diferentes isotipos (IgG1, IgG2 e IgM), se probaron a las concentraciones 1:500, 1:1,000, 1:2,000 y 1:4,000 diluidos en PBS, siendo la mas optima la dilución 1:2,000.

Sensibilización de la placa con hapteno nativo (NH).

Se realizó en microplacas de poliestireno de fondo plano. (Costar®), usando el antígeno a una concentración de 2.5 µl/ml diluido en PBS y agregando 100 µl en cada pozo de la placa. Paso siguiente, se cubrió la microplaca con plástico auto adherente, incubándola a temperatura ambiente durante 24 horas. El antígeno no adsorbido se eliminó mediante tres lavados con 200 µl de PBS con 0.05% Tween

20 (PBS-T). Se deja secar bien la placa y se cubre con plástico autoadherible y se guarda a 4°C.

Realización de la técnica

Se adicionaron 100 µl de los sueros controles y de los sueros problema por duplicado, a una dilución 1:200 en PBS en orden de filas. Los pozos A1 y A2 se dejaron vacíos, utilizándolos como blanco, Se cubre la placa y se incuba a 37°C por una hora, posteriormente se lavaron tres veces con 200 µl de PBS-T, colocando 100 µl del conjugado en cada pozo y se incubó por una hora a 37°C y se repitieron los lavados con PBS-T.

Sustrato cromógeno.

El sustrato ABTS³ (2-2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt) 1mg se diluyó en 50 ml de solución amortiguadora de citratos 0.05 M pH 5 y 40µl de peróxido de hidrogeno al 30%, se agregaron 100 µl en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 15 min para posteriormente realizar la lectura de la densidad óptica con lector de microplacas a una longitud de onda de 492 para determinar los promedios por grupo y ser graficados.

Análisis estadístico

Se realizó la comparación de datos entre grupos en la prueba de ELISA-Indirecta por medio de un análisis de varianza con el programa Medcalc®. En los valores ($P \leq 0.05$) fueron considerados como significativos.

³ Fluka Chemie GmbH®

Inmuno Difusión Radial

Realización de la prueba de IDR.

En las placas de agarosa con NH se perforaron pozos con un sacabocados a una distancia de 4 mm entre los bordes de los pozos, se llenaron los pozos con los sueros problema, controles positivos y negativos (10-15 μ l de suero) y se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 3-5 h hasta que apareciera un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo si eran positivos.

RESULTADOS

Estudios serológicos

Prueba de IDR

Se realizó la prueba de IDR a los sueros de animales provenientes del ható con alta prevalencia, que eran positivos a la prueba de tarjeta y positivos o negativos a la prueba de rivanol, de los 14 sueros a los que se les realizó la prueba, los cinco sueros positivos a tarjeta y rivanol dieron resultado positivo a esta prueba, y los sueros positivos a tarjeta y negativos a rivanol, los nueve fueron negativos a IDR (tabla1)

Tabla. 1 Resultados de la prueba de IDR a los sueros de animales revacunados con RB51 en una zona de elevada prevalencia de brucelosis,

ANIMALES POSITIVOS A TARJETA		
	Número de animales	Positivos a IDR
Positivos a tarjeta y rivanol	5	5
Positivos a tarjeta, negativos a rivanol	9	0

Prueba de ELISA-INDIRECTA

Al hacer la comparación entre el hato de alta prevalencia y el de baja prevalencia, se puede observar como los isotipos IgG1 e IgG2 tiene valores que cuadriplican los encontrados en el hato de baja prevalencia, debido a que los animales en el hato de alta prevalencia tienen contacto constante con la cepa de campo, además de que algunos de los animales posiblemente están presentando la reacción por la verdadera infección a brucela.

En contraste, el isotipo IgM aparentemente tuvo valores parecidos en ambos hatos, pero al realizar el estudio estadístico, se observa que si hay diferencia, como lo muestra la tabla 2.

Fig. 1 Resultados de ELISA-I, empleando como segundo anticuerpo el isotipo IgG1 y como antígeno LPS-S, en muestreos mensuales de dos establos lecheros con diferente prevalencia de brucelosis.

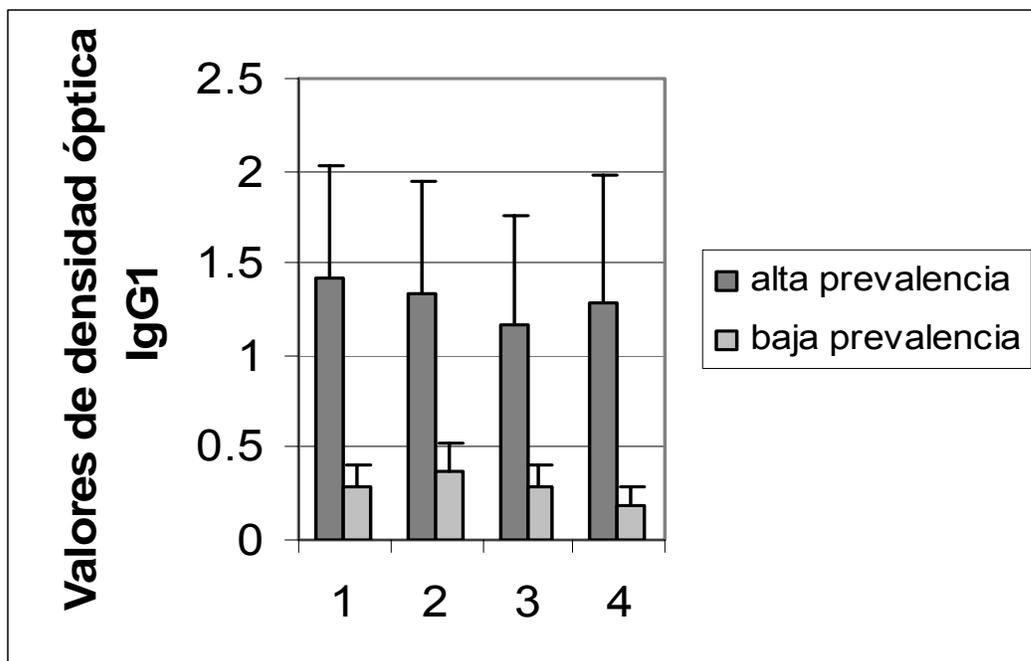


Fig. 2 Resultados de ELISA-I, empleando como segundo anticuerpo el isotipo IgG2 y como antígeno LPS-S, en muestreos mensuales de dos establos lecheros con diferente prevalencia de brucelosis.

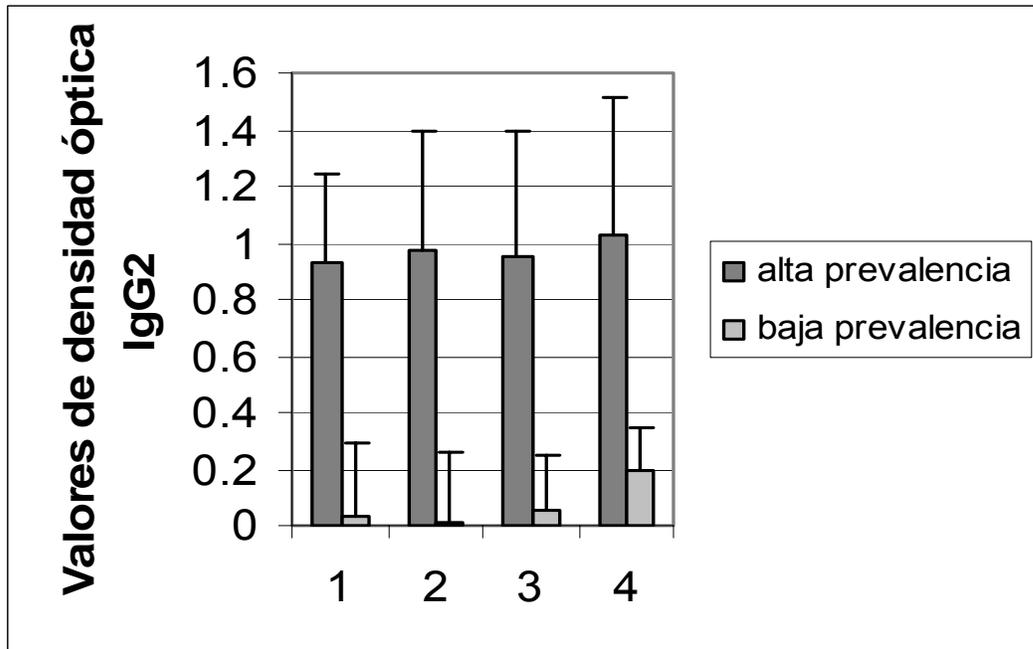


Fig. 3 Resultados de ELISA-I, empleando como segundo anticuerpo el isotipo IgM y como antígeno LPS-S, en muestreos mensuales de dos establos lecheros con diferente prevalencia de brucelosis.

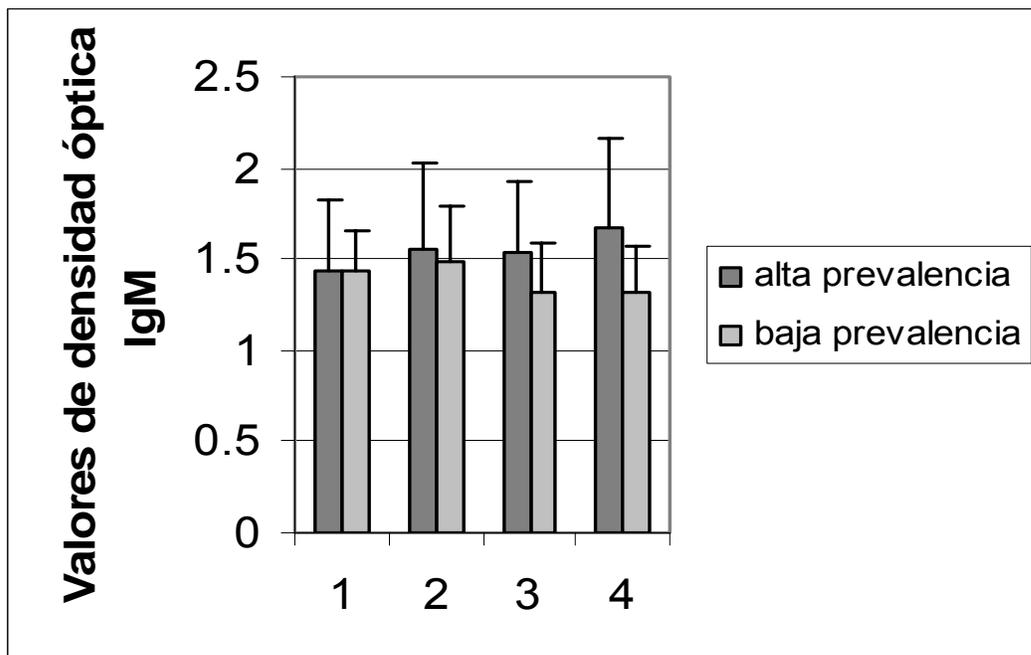


Tabla. 2 Resultados de la comparación entre los valores de las medias por la prueba de t, de los muestreos de los diferentes isotipos, entre el hato de baja prevalencia (4 milpas) y el de alta prevalencia de brucelosis (Tizayuca).

	muestreo 1 (Tizayuca)	muestreo 2 (Tizayuca)	muestreo 3 (Tizayuca)	muestreo 4 (Tizayuca)
IgG1				
muestreo 1 (4 milpas)	<u>P < 0.0001</u>			
muestreo 2 (4 milpas)		<u>P < 0.0001</u>		
muestreo 3 (4 milpas)			<u>P < 0.0001</u>	
muestreo 4 (4 milpas)				<u>P < 0.0001</u>
IgG2				
muestreo 1 (4 milpas)	<u>P < 0.0001</u>			
muestreo 2 (4 milpas)		<u>P < 0.0001</u>		
muestreo 3 (4 milpas)			<u>P < 0.0001</u>	
muestreo 4 (4 milpas)				<u>P < 0.0001</u>
IgM				
muestreo 1 (4 milpas)	<u>P < 0.0001</u>			
muestreo 2 (4 milpas)		<u>P < 0.0001</u>		
muestreo 3 (4 milpas)			<u>P < 0.0001</u>	
muestreo 4 (4 milpas)				<u>P < 0.0001</u>

Al realizarse la comparación de los resultados en los muestreos mensuales para los isotipos IgG1 e IgG2 en ELISA-I, usando como antígeno LPS-S en vacas inmunizadas con RB51 en el hato de alta prevalencia, se observa que los valores de IgG1 aún siendo más elevados en todos los grupos no muestra diferencias significativas en comparación con el isotipo IgG2, que es señalado como el más importante frente a las infecciones por brucela, a excepción del primer muestreo, por lo que no se puede saber si esta reacción es causada por la vacunación o la infección. (Figura 4 y tabla 3).

Fig. 4 Resultados de muestreos mensuales para los isotipos IgG1 e IgG2 en ELISA-I, usando como antígeno LPS-S, en vacas inmunizadas con RB51 en un hato lechero de alta prevalencia de brucelosis.

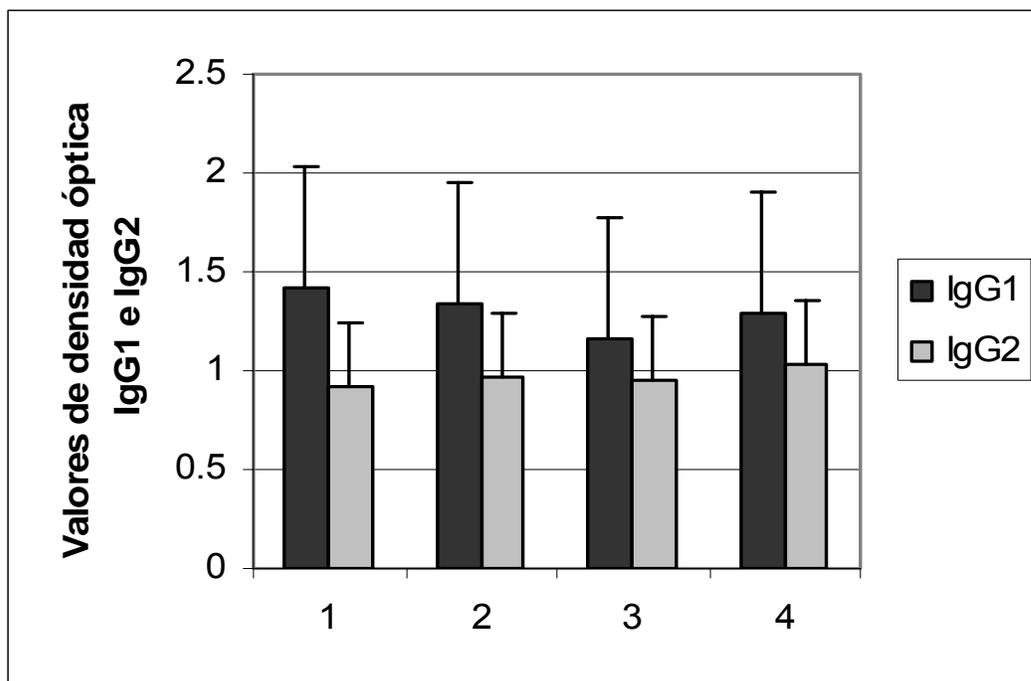


Tabla. 3 Resultados de la comparación de las medias de los isotipos IgG1 e IGg2 de los muestreos mensuales, por la prueba de t, del hato de alta prevalencia de brucelosis.

	Muestreo 1 (tizayuca)	Muestreo 2 (tizayuca)	Muestreo 3 (tizayuca)	Muestreo 4 (tizayuca)	IgG2
Muestreo 1 (tizayuca)	<u>P = 0,0118</u>				
Muestreo 2 (tizayuca)		P = 0,2105			
Muestreo 3 (tizayuca)			P = 0,0836		
Muestreo 4 (tizayuca)				P = 0,0510	
IgG1					

Cuando en el hato de alta prevalencia se separan los animales positivos a rivanol de los negativos a rivanol, y se realiza el análisis estadístico, se puede observar que hay una diferencia significativa entre dichos animales, (tabla 4), además también se observa que los sueros negativos a rivanol son mas elevados que el grupo control negativo, pero los animales positivos a rivanol, tienen una concentración de anticuerpos al doble en comparación con los negativos a rivanol.

En las figuras 5 a 7 se muestra la comparación entre los muestreos mensuales, de la ELISA-I para los isotipos IgG1, IgG2 e IgM.

Fig. 5 Resultados de ELISA-I, empleando como segundo anticuerpo el isotipo IgG1 y como antígeno LPS-S, en muestreos mensuales de dos grupos de vacas inmunizadas con RB51 y positivas a la prueba de tarjeta en una zona de elevada prevalencia de brucelosis.

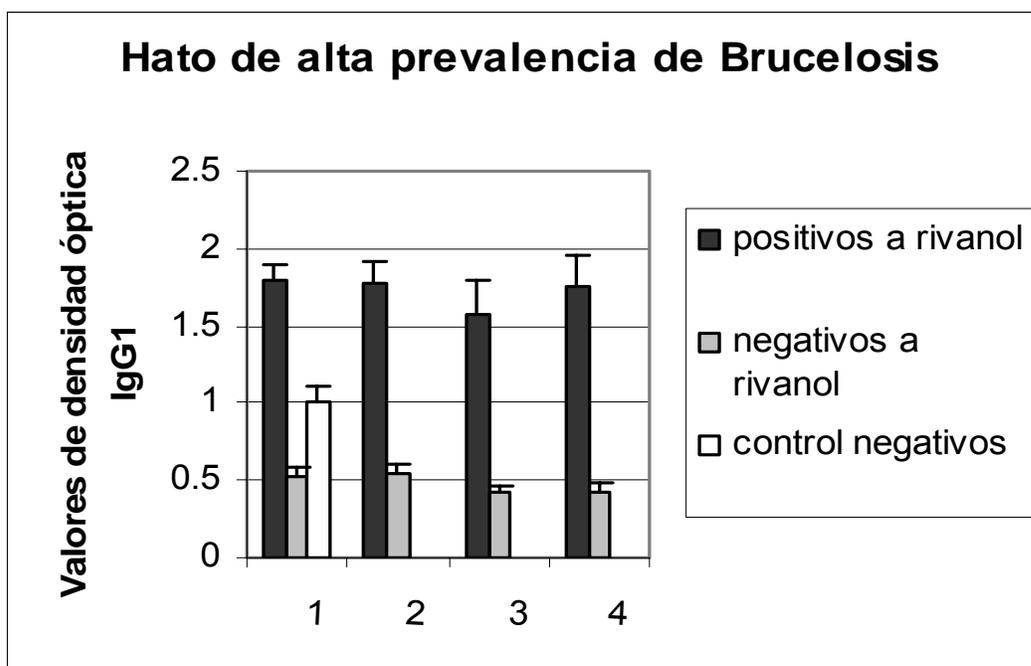


Fig. 6 Resultados de ELISA-I, empleando como segundo anticuerpo el isotipo IgG2 y como antígeno LPS-S, en muestreos mensuales de dos grupos de vacas inmunizadas con RB51 y positivas a la prueba de tarjeta en una zona de elevada prevalencia de brucelosis.

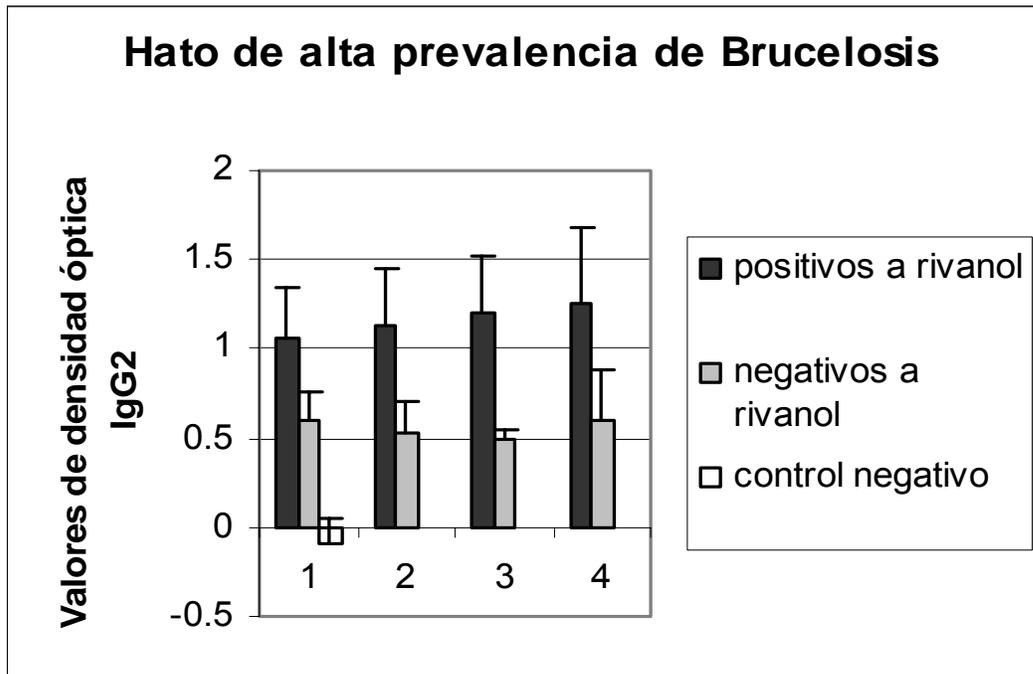


Fig. 7 Resultados de ELISA-I, empleando como segundo anticuerpo el isotipo IgM y como antígeno LPS-S, en muestreos mensuales de dos grupos de vacas inmunizadas con RB51 y positivas a la prueba de tarjeta en una zona de elevada prevalencia de brucelosis.

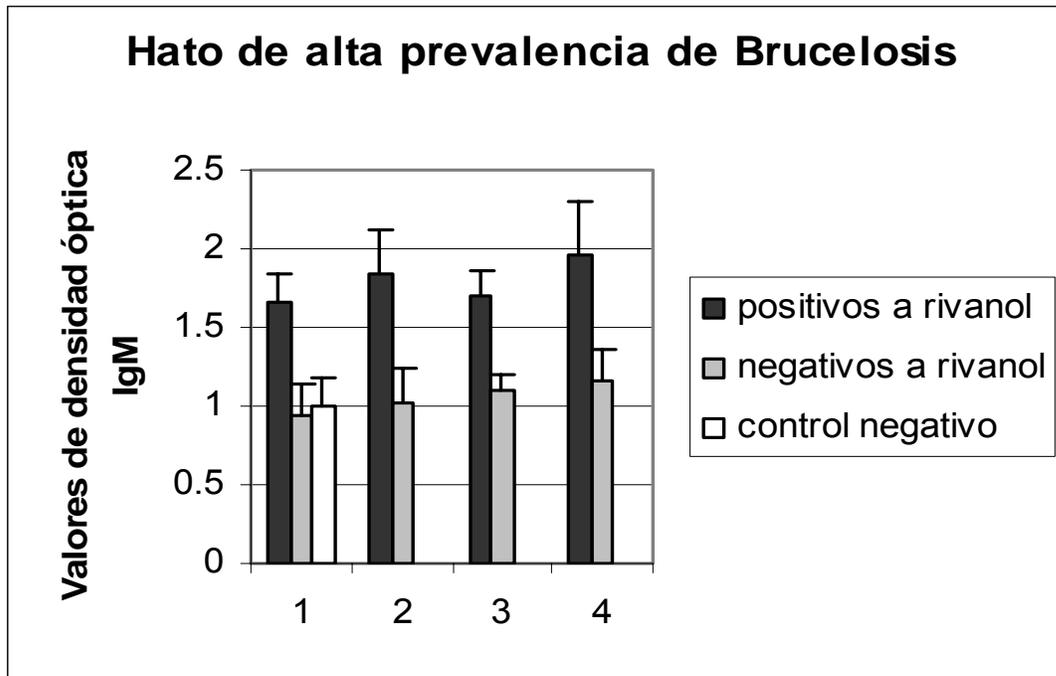


Tabla. 4 Resultados de la comparación entre los valores de las medias por la prueba de T, en los muestreos de los diferentes isotipos de sueros positivos y negativos a la prueba de rivanol, en el hato de alta prevalencia de brucelosis.

IgG1	muestreo 1 (positivo)	muestreo 2 (positivo)	muestreo 3 (positivo)	muestreo 4 (positivo)
muestreo 1 (negativo)	P < 0.0001			
muestreo 2 (negativo)		P < 0.0001		
muestreo 3 (negativo)			P < 0.0001	
muestreo 4 (negativo)				P < 0.0001

IgG2	muestreo 1 (positivo)	muestreo 2 (positivo)	muestreo 3 (positivo)	muestreo 4 (positivo)
muestreo 1 (negativo)	P < 0.0001			
muestreo 2 (negativo)		P < 0.0001		
muestreo 3 (negativo)			P < 0.0001	
muestreo 4 (negativo)				P < 0.0001

IgM	muestreo 1 (positivo)	muestreo 2 (positivo)	muestreo 3 (positivo)	muestreo 4 (positivo)
muestreo 1 (negativo)	P < 0.0001			
muestreo 2 (negativo)		P < 0.0001		
muestreo 3 (negativo)			P < 0.0001	
muestreo 4 (negativo)				P < 0.0001

DISCUSIÓN

INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)

La principal ventaja de la RB51 es que no se presentan anticuerpos post-vacunales, sin embargo, esta aseveración sólo es válida en circunstancias presentadas en países donde prácticamente la brucelosis esta erradicada y la incidencia es muy baja.^{11, 12} En México donde la brucelosis bovina tiene un estatus endémico, esta situación es diferente ya que se ha observado en zonas de mediana y elevada prevalencia que bovinos no infectados después de ser vacunados o revacunados con RB51, resultan positivos a pruebas serológicas durante varios meses post inmunización, resultando en un diagnóstico confuso.^{7, 16}

La prueba de IDR tiene una sensibilidad del 98% y un 100% de especificidad para detectar bovinos infectados.⁷ En este trabajo, se realizó la prueba de IDR tanto a sueros de animales que eran positivos a las pruebas de tarjeta y rivanol, como a sueros que sólo eran positivos a la prueba de tarjeta, resultando negativos a la prueba los sueros que solo eran positivos a tarjeta, el principio de esta reacción se basa en que para que se produzcan anticuerpos contra el hapteno nativo, se necesita una alta estimulación que es originada por la infección natural por una cepa de campo, lo que no sucede cuando la estimulación del sistema inmune de la vaca es debida a la vacunación.⁷ Estos animales sólo presentaban una respuesta transitoria, que se podría atribuir a la entrada de brucelas virulentas que fueron controladas por la respuesta inmune; otra razón es la que explican Moriyón y colaboradores (2004), cuando afirman que el LPS de las brucelas lisas presente en el antígeno de células completas que es usado para la prueba de tarjeta, siempre contiene cantidades significativas de LPS rugoso normalmente presente en la superficie de la bacteria (hasta 10%), y por lo consiguiente se presenta algún grado de interferencia en la prueba de tarjeta.²⁰

Para explicar la respuesta post-vacunal transitoria que se determina en este estudio, se sugiere que la estimulación primaria con RB51 desencadena la respuesta inmune primaria contra *B. abortus* y posteriormente debido a la extensa diseminación de las cepas de campo en las zonas endémicas las vacas desarrollan una respuesta secundaria cuando entran en contacto con las cepas de campo. La presencia de estos anticuerpos demuestra que los animales tuvieron contacto con la cepa de campo, pero la capacidad de su respuesta inmune fue capaz de controlar la infección.

Esta explicación coincide con otro estudio en México, en donde se evaluó el comportamiento de la vacuna RB51 en un establo libre de brucela, que estaba 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 durante un año de seguimiento.¹⁶

Montaña y colaboradores, (1998), observaron que animales vacunados con RB51 durante dos meses fueron negativos a PT y en el día 60 eran desafiados con la cepa 2308, daban resultados positivos a la PT hasta el día 90,¹⁸ estos resultados difieren con experimentos realizados por Samartino (2000) con 57 vacas revacunadas con RB51, no encontrando anticuerpos detectables por pruebas convencionales (PT, FC, 2-ME)²⁰ y en Venezuela, Lord y colaboradores (1998) mencionan que la vacunación con cepa RB51 no producía anticuerpos que hicieran interferencia con la pruebas de diagnóstico serológicos en hatos de alta y baja prevalencia de la brucelosis.^{19,20, 34} Estos resultados pueden ser debidos a que al ser experimentos controlados, los animales no entraron en contacto con la bacteria de campo.

En el presente trabajo, durante los cuatro meses post-revacunación, en todos los grupos el isotipo IgG1 era el que poseía los niveles mas altos, mientras que los niveles del isotipo IgG2 iban ascendiendo conforme se realizaban los muestreos.

En los animales positivos a tarjeta y rivanol, los isotipos IgG1 e IgG2 tenían valores cercanos a los del grupo control positivo siendo más elevados en comparación con los animales negativos a rivanol, además de que los niveles de IgG1 se mantuvieron constantes durante los cuatro meses del estudio. En contraste, los animales negativos a rivanol, tienen valores cercanos a los del hato en fase de erradicación. Los resultados muestran que los valores en el grupo positivo a tarjeta y rivanol pueden ser debidos a la vacunación, o por la exposición al agente infeccioso, pero este fue controlado sin producir enfermedad. Estos resultados se ven reforzados con lo reportado por Colby y Schuring ⁵, que realizaron un trabajo para medir la respuesta a la vacuna RB51 en alces, los que se consideran una fuente probable de infección para los animales domésticos, encontrando que la respuesta con anticuerpos IgG1 es la más prolongada en duración y estos autores afirman que la inmunidad contra la brucela es mediada por células y que los niveles de anticuerpos no son indicativos de inmunidad, pero sí indican exposición a la bacteria. Debido a que en dicho experimento detectaron por medio de ELISA Indirecta anticuerpos no aglutinantes de las 4 a 10 semanas postvacunación en los alces, ⁵ porque la vacuna RB51, carece de la cadena O del LPS, y no induce anticuerpos contra cepas lisas que puedan ser detectados por aglutinación u otras pruebas serológicas para brucelosis. Además de que también demostraron que en vacas inmunizadas con RB51, de las cuatro hasta las 10 semanas post-vacunación no se encontraban anticuerpos detectables en la prueba de aglutinación en tubo ³³, también trabajaron con animales vacunados con RB51 y que se inocularon después con LPS-S, observando que se formaron anticuerpos de tipo IgG1 e IgM no aglutinantes, no habiendo diferencia con un grupo control no vacunado, pero al desafiar con la bacteria completa, hay formación de anticuerpos de tipo IgG, pero no hay formación de IgM, que reacciona con las proteínas de membrana externa (OMP) de la cepa 2308 diferentes al LPS, ya que ambas cepas comparten muchas OMPs ^{7, 33} lo que coincide con los resultados encontrados en el grupo de baja prevalencia de esta

tesis, donde los muestreos en los cuatro meses fueron negativos a la prueba de tarjeta.

Leal (2003) evaluó la respuesta de anticuerpos en bovinos revacunados con RB51, usando ELISA-I, con células completas de RB51 como antígeno, los resultados obtenidos mostraron que los niveles de IgG1 fueron de mayor duración y comenzaron a descender a los 120 días postvacunales. Los niveles de IgG2 tuvieron una duración más corta, disminuyendo para el día 90, lo que coincide con lo que se observa en caso de infecciones persistentes producidas por cepas virulentas,¹⁶ aunque en el presente trabajo, por el corto tiempo de los muestreos no se pudo observar este efecto, si se pudo observar que la respuesta tanto de IgG1 como de IgG2 en el hato con alta prevalencia eran mas altos que los del hato con baja prevalencia, aún en los animales negativos a la prueba de rivanol.

Saegerman en el 2004 menciona que en la vacunación contra la brucelosis, el nivel de anticuerpos cae rápidamente, de tal manera que a los seis meses no se encuentra IgG2 y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG1, en contraste con los animales infectados donde hay altos niveles de IgG1 e IgG2,²⁸ sin embargo, en el presente estudio, los animales negativos a rivanol hasta el 8° mes después de la revacunación, tienen altos niveles de IgG1 e IgG2, aparentemente por el contacto con la bacteria de campo, aunque logran controlar la infección sin llegar a enfermar.

La clase y subclase de los anticuerpos son influenciados por el tipo de célula T involucrada en la interacción Linfocito T-B^{7, 12, 16, 27} que reaccionan con las proteínas estructurales de RB51, presentes como antígenos purificados, induciendo en el animal una respuesta favorable a la producción del isotipo IgG2, insinuando respuesta Th1, lo cual se comprueba al observar la óptima memoria ante exposición a cepa patógena,¹⁸ en la cual se sintetizan citocinas como IL-12 y el factor de necrosis tumoral que juegan un importante rol en activación de macrófagos y en la limitación de la infección por *Brucella in vivo e in vitro*⁷, y

Saldarriaga (2000) comenta que la inducción de una respuesta Th2 puede ser contraproducente para el control de la infección causada por brucela, ya que se produce IL-10, citosina que inhibe el patrón Th1 que está relacionado a la producción de INF γ o bloqueando las citocinas inducidas por la activación del macrófago.^{29, 30}

CONCLUSIONES

- La vacunación con RB51 no produce anticuerpos aglutinantes en hatos con baja incidencia de brucelosis, ya que no hay infección de campo.
- En hatos con alta incidencia de brucelosis, se da una reacción positiva a tarjeta que puede durar varios meses en animales sanos vacunados o revacunados con RB51, se sugiere que quizá sea en respuesta al contacto con una cepa de campo aunque posteriormente el bovino controla la infección.
- En México, al tener una alta incidencia de brucelosis, a los animales vacunados con RB51 positivos a la prueba de tarjeta, es necesario realizarles una prueba confirmatoria para descartar una respuesta atípica.
- La prueba de inmunodifusión Radial es una excelente prueba para diferenciar animales vacunados de animales infectados por brucela.
- Aún en animales negativos a brucela, la respuesta por el isotipo IgG es más elevada en hatos con alta prevalencia en comparación con hatos con baja prevalencia.

ANEXO

Prueba de IDR.

Preparación de las soluciones *stock*.

Solución A. (solución amortiguadora de glicina pH 7.8)

- Glicina (glicocola) 7.13 g
- Cloruro sódico 5.73 g
- H₂O destilada 450 ml

Llevar el pH a 7.8 con Na (OH) 1N (4 g en 100ml de H₂O destilada) y enrasar hasta 500 ml (matraz aforado)

Solución B (agarosa)

- Agarosa (pureza inmunoelectroforesis) 0.8 g
- Azida de sodio 50 mg
- H₂O destilada 50 ml

Calentar ligeramente el H₂O destilada, añadir la azida y la agarosa agitando continuamente y calentar a baño maría a 100°C hasta que la solución quede transparente.

Solución C (stock NH)

- 1 mg de NH en 1ml de H₂O destilada

Preparación de las placas con gel.

Para obtenerse 10 ml de gel, suficientes para tres placas, se disolvió 1 g de cloruro sódico en 5 ml de la solución A (solución amortiguadora de glicina), se le añadió 200 μ l de la solución C (NH) y se calentó la mezcla anterior en baño maría a 60°C, Se añadieron 5ml de la solución B (agarosa) previamente fundida en baño maría a 100°C y se mezcló perfectamente, con una pipeta caliente, se vertió la mezcla (solución A+C+B) en porta objetos quedando con un espesor de aproximadamente 2 mm y se dejó solidificar por 15 min, , sobre porta-objetos, ya preparadas se almacenaron en una cámara húmeda herméticamente cerradas para evitar su desecación, y se dejaron reposar por 24 h.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología Celular y Molecular España, McGraw Hill, 1999
2. Blasco JM. Brucelosis animal: la enfermedad y medidas para su control y erradicación. En "Manual de brucelosis", A. Rodríguez-Torres y A. Orduña, España: Consejería de Sanidad y Bienestar Social, 2001. pp: 31-43
3. Bowden RA, Cloeckert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G. Surface Exposure of Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide Epitopes in *Brucella* Species Studied by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Flow Cytometry. *Infect. Immu.* ; 1995; 63 (10); 3945-3952.
4. Brooks GF, Stephen AM, Batel JS. *Haemophilus, Bordetella y Brucella*. En: Microbiología Médica de Jawetz, Malnick y Adelberg, México: Ed. Manual Moderno; 1999; 306-309.
5. Colby LA, Schuring GG, Elzer PH. An Indirect ELISA to detect the serologic response of elk (*cervus elephus nelsoni*) inoculated with *Brucella abortus* strain RB51. *Journal of Wildlife Disease* 2002; 38 (4); 752-759.
6. Díaz AE, Aragón V, Marín C, Alonso B, Font M, Moreno *et al*. Comparative Analysis of *Brucella* Serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* 0:9 Polysaccharides for Serological Diagnosis of Brucellosis in Cattle, Sheep and Goats. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31; 25-30.

7. Díaz AE, Arellano BR, Herrera E, Leal MH, Suárez FG. Study of RB51 atypical post-vacunal reaction to serological tests, in endemic brucellosis areas. PANVET; Buenos Aires, 2004; 200-214.
8. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B y colaboradores. Diagnóstico de Brucelosis Animal, México, 2001.
9. Freer E, Castro AR. Brucella: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. Rev. costarric. cienc. méd. ; 2001; 22; (1-2); 73-82.
10. Freer E, Castro AR. Controversia en Salud, *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. Rev. costarric. cienc. méd. ; 2001; 22; 1-2.
11. García-Lobo MJ, Sangari GF. Erythritol Metabolism and virulence in *Brucella*. En *Brucella: Molecular and Cellular Biology* de López. Goñi I e Moriyón I, México: ED. horizon Bioscience; 2004; 231-240.
12. Golding B, Scout DE, Scharf O, Huang LY, Zaittseva, Lapham C, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. Microbes and Infection, 2001; 3: 43-48.
13. Herrera LE. Comportamiento de la vacuna rugosa RB51 (*Brucella abortus*) en hatos bovinos con diferente prevalencia de brucelosis. (tesis maestría). México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México; 2002.
14. Leal MH, Díaz EA, Pérez R, Hernández AL, Arellano BR, Alfonseca E, Suárez GF. Protection of *Brucella abortus* revaccinated cows, introduced in a herd with active brucellosis, with presence of atypical humoral response. Com. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 2005; 28; 63-70.

15. Leal HM. Evaluación de la respuesta inmune en becerras de la raza Holstein vacunadas con la cepa RB51 de *brucella abortus*. (tesis licenciatura). México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México; 1999.
16. Leal HM. 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. (tesis maestría). México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.
17. Lopetégui P. Vacuna RB51 en la erradicación de brucelosis bovina en Chile. *TecnoVet* 1997; 3 (3).
18. Montaña NI, Rueda OE, Calderón P, Ortega A, Puentes R, Gallego M *et al*. Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. *Archivo Medico Veterinario*, 1998; 30 (2).
19. Lord V, Schuring G, Cherwonogrodzky J, Marcano M, Melendez G, Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am J Vet Res*; 1998; 59 (8); 1016-1020.
20. Moriyón I, Grillo MJ, Monreal D, González D, Marín C, López GI *et al*. Rouge vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.* 2004; 35; pp: 1-38.
21. Moriyón I, López GI, Díaz, R. Bacteriología del género *Brucella*. En "Manual de brucelosis", A. Rodríguez-Torres y A. Orduña, España, Consejería de Sanidad y Bienestar Social, 2001. pp: 19-28.

22. Muñoz GG, Díaz AE, Hernández AL. Estudio serológico por la prueba de Inmunoensayo Indirecto ligado a Enzimas (ELISA) en bovinos holstein vacunados con RB51 de *Brucella abortus*. memorias XXV Congreso de buiatría.
23. Muñoz PM, Marín CM, Monreal D, González D, Garin-Bastuji B, Díaz R, *et al.* Efficacy of Several Serological Test and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results Due to *Yersinia enterocolitica* 0:9. Clin Diagn Lab Immunol; 2005; 12; (1); pp: 141–151.
24. Murria RP, Rosenthal SK, Kobayashi SG, Pfaller MA. Microbiología Medica, 4a Ed, España: Elsevier Science, 2003
25. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Medicina Veterinaria. España McGraw Hill, 2002; 1:1025-1053.
26. Renteria ETB, Organesw DSH, Licea NAF, Medina BGE, Nielsen K, Montaña GMF *et al.* evaluación de la prueba reacción de cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Técnica Pecuaria en México, 2005; 43; 117-126.
27. Rojas EO. Inmunología de memoria. 2^a ed. Distrito Federal, México. Médica Panamericana; 2001.

28. Saegerman C, De-Waele L, Gilson D, Godfroid J, Thiange P; Michel P. Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 2004; 100: 91-105.
29. Saldarriaga OM, Ossa JE, Rugeles MT. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella abortus*. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 2002. 15 (2) 180-186
30. Saldarriaga OM, Rugeles MT. Inmunología de la infección por *Brucella* spp: Fundamentos para una estrategia vacunal. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 2002. 15 (2): 188-196
31. Samartino LE, Fort M, Gregoret R, Schuring GC. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 2000, 45: 193-199.
32. Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW, Brees D. Comparison of Immune Responses and Resistance to Brucellosis in Mice Vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infect. Immu.* ; 1995; 63 (1); 24; 264-270.
33. Stevens MG, Steven CO. Antibody Response to *Brucella abortus* 2308 in Cattle Vaccinated with *B. abortus* RB51. *Infect. Immu.* 1996; 64 (3); 1030-1034.
34. Vargas FR. Situación epidemiológica de la brucelosis en Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 2003; 8 (2).

35. Vemulapalli R, He Y, Boyle SM, Sriranganathan N, Schuring. *Brucella abortus* Strain RB51 as a Vector for Heterologous Protein Expression and Induction of Specific Th1 Type Immune Responses. *Infect. immu.* ; 2000; 68(6); 3296-3296.