

01672
10
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESPUESTA SEROLOGICA DE CABRAS JOVENES INOCULADAS
CON DIFERENTES DOSIS DE LA CEPA REV-1 DE Brucella melitensis.
COMPARACION DE PRUEBAS Y HALLAZGOS AL DESAFIO
CONTROLADO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
P R E S E N T A:
ARTURO MANCERA MARTINEZ

ASESORES: DR. FRANCISCO SUAREZ GUEMES
DR. RICARDO FLORES CASTRO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUNIO DE 1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
1. Vacunación de cabras con la cepa Rev. 1 de <u>B. melitensis</u>	7
2. Vacunación de cabras con otras cepas	8
3. Pruebas de diagnóstico serológico en caprinos	8
OBJETIVOS	11
Experimento 1	11
Experimento 2	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Experimento 1	13
Experimento 2	17
RESULTADOS	19
Experimento 1	19
Experimento 2	22
DISCUSIÓN	23
APÉNDICE 1	29
CUADROS	30
FIGURAS	33
APÉNDICE 2	44
LITERATURA CITADA	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro

Página

1. Resultados expresados en porcentaje de pruebas serológicas efectuadas a cabras vacunadas con diferentes dosis de B. melitensis Rev. 1 y mantenidas en confinamiento. 30
2. Resultados expresados en porcentaje de pruebas serológicas efectuadas a cabras vacunadas con diferentes dosis de B. melitensis Rev. 1 y mantenidas en confinamiento. 31
3. Resultados expresados en porcentaje de pruebas serológicas efectuadas a cabras vacunadas con diferentes dosis de B. melitensis Rev. 1 y mantenidas en su propio hato. 32

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1.	Resultados serológicos en la prueba de tarjeta de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.	33
2.	Resultados serológicos en la prueba de doble difusión en gel de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.	34
3.	Resultados serológicos en la prueba de inmunodifusión radial de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.	35
4.	Resultados serológicos en la prueba de aglutinación en tubo de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.	36
5.	Resultados serológicos en la prueba de aglutinación con mercaptoetanol de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.	37
6.	Resultados serológicos en la prueba de fijación de complemento de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.	38
7.	Resultados serológicos en la prueba de tarjeta de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.	39
8.	Resultados serológicos en la prueba de doble difusión en gel de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.	40

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
9. Resultados serológicos en la prueba de aglutinación en tubo de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.	41
10. Resultados serológicos en la prueba de aglutinación con mercaptoetanol de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.	42
11. Resultados serológicos en la prueba de fijación de complemento de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.	43

INTRODUCCIÓN

Presentación del problema.

La brucelosis es una enfermedad que durante muchos años ha sido un problema de salud animal en nuestro país, involucrando al hombre debido a que es una zoonosis. Esta es una enfermedad infecto contagiosa de curso crónico cuyo agente causal es Brucella spp. (11, 38). En el humano, la brucelosis aguda causa dolores de cabeza, sudoración, cansancio, fiebres, dolores de espalda, brazos y piernas, pérdida de peso y de apetito. Cuando la enfermedad persiste se le llama crónica, causando dolores articulares, encefalitis, meningitis y disturbios oculares entre otros además de los síntomas de la enfermedad aguda (26, 31).

En los animales, las manifestaciones clínicas más frecuentes son aborto, aumento de volúmen de los nodos linfáticos y en algunos casos fiebre, problemas nerviosos, mastitis e infertilidad en machos; manifestaciones que van relacionadas con la afinidad del microorganismo por bazo, hígado, útero grávido, placenta y tejidos fetales, así como epidídimo y vesículas seminales (54, 61).

El microorganismo al entrar al huésped es transportado por polimorfonucleares alojándose primeramente en los nodos linfáticos y en lugar de ser destruido, éste se mantiene por tiempo indefinido destruyendo en muchos casos la célula huésped al reproducirse, presentándose la bacteremia. Posteriormente el microorganismo se va a alojar a diferentes órganos del huésped a pesar de la acción de las células de defensa, logrando de esta manera establecerse indefinidamente y produciendo las recaídas del individuo (29, 56).

Son varios los reservorios para las diferentes especies de brucelas, siendo los más frecuentes: Bovinos para Brucella abortus (B. abortus), cabras y ovejas para Brucella melitensis (B. melitensis), cerdo, liebre y reno para Brucella suis (B. suis), rata del desierto para Brucella neotomae (B. neotomae), oveja para Brucella ovis (B. ovis) y el perro para Brucella canis (B. canis) (6).

Las especies animales que más frecuentemente se consideran como infectantes del humano son la cabra, la oveja, la vaca, el búfalo de la India, el cerdo y el perro, así como otras especies nativas en diferentes partes del mundo (31).

Las principales vías de infección del humano son la ingestión, contacto, inhalación o inoculación accidental por medio de los productos alimenticios no tratados, preparados con leche cruda de animales infectados, legumbres crudas contaminadas, vísceras de canales infectadas y agua contaminada. También por contacto con materias infectadas, tales como secreciones vaginales, placentas, restos de abortos, orina y estiércol resultando frecuente en veterinarios, agricultores, personal de mataderos y fábricas de embutidos, pastores y personal de laboratorio (31).

En México, en el periodo 1980-1984 la morbilidad de la brucelosis en humanos por grupo de edad se determinó primeramente para el grupo de 45 a 64 años, con una tasa promedio de 5 casos por 100,000 habitantes, lo siguió el grupo de 15 a 44 años con una tasa promedio de 4.9 casos por 100,000 habitantes y en orden decreciente los grupos de 5 a 14, más de 64, 1 a 4 y menores de un año (13).

Sin embargo para el periodo 1982-1988 el grupo de edad con la tasa promedio más alta fue el de 15 a 44 años con 7.8 casos por cada 100,000 habitantes, siguiéndole los grupos de 45 a 64 años con 7.6 casos, más de 64 años con 5.2 casos, 5 a 14 años con 4.8 casos, 1 a 4 años con 2.4 casos y menores de un año con 1.4 casos (14).

Para el año de 1989, según datos de la Dirección General de Epidemiología, se notificaron 3385 casos de brucelosis humana, correspondiendo a los siguientes Estados de la República el mayor número de notificaciones: 866 en Guanajuato, 515 en Sonora, 419 en Coahuila, 314 en Michoacán y 159 en Nayarit (14).

Ahora bien, al estudiar las pérdidas causadas por esta enfermedad, Calcedo (9) y Campaire y Gracia (10) consideran:

a) Pérdidas directas aparentes.- Entre éstas se incluyen las crías perdidas por abortos o muerte de neonatos, las pérdidas por problemas reproductivos (infertilidad), por reemplazo, por disminución de la producción como leche, carne, etc., gastos de asistencia médico veterinaria y mortalidad.

b) Pérdidas directas no aparentes.- Aquí incluyen la depreciación de animales enfermos, retrasos de crecimiento, pérdida de peso, recuperación del peso perdido, pérdida del mercado interno y pérdida de líneas genéticas.

c) Pérdidas indirectas o consecutivas.- Entre estas consideran la afectación de la salud humana incluyendo el ausentismo, gastos de enfermedad, disminución de la capacidad, indemnizaciones y mortalidad, así como las pérdidas que repercuten a la industria y el mercado nacional e internacional.

Durante 1989 se estimó que en México, las pérdidas causadas por la brucelosis en ganado bovino lechero únicamente, fueron por la cantidad de 50,983 millones de pesos, lo cual denota la gran importancia de esta enfermedad en el país (59).

La Campaña Nacional contra la Brucelosis se instituyó en nuestro país el 8 de agosto de 1970, día en que se publicó en el Diario Oficial; dividiéndose en diferentes etapas para su realización:

1) Diagnóstico de situación mediante la determinación de prevalencia de la brucelosis. Difusión y extensión de la campaña.

2) Programas locales de control y/o erradicación con tres planes opcionales:

a) Diagnóstico de todo el hato, marcado de los animales reactivos, sacrificio de los mismos y certificación de hatos libres.

b) Diagnóstico de hatos, separación de animales positivos y vacunación de hembras jóvenes.

c) Vacunación de las hembras de tres a seis meses de edad con cepa 19 de B. abortus para bovinos y cepa Rev. 1 de B. melitensis para caprinos.

3) Vacunación masiva obligatoria de las hembras de tres a seis meses de edad, dividiendo el país en tres regiones, con diferentes fechas de inicio y terminación.

4) Erradicación. Una vez cubiertos los dos periodos de vacunación obligatoria en ganado bovino y caprino, sería necesario evaluar las tasas de infección prevalentes de la enfermedad en las diferentes

regiones. Si los resultados de esa evaluación no sobrepasaran las tasas de infección de 1-2% global y de 5% de hatos infectados, sería posible determinar con posibilidades de éxito la etapa de erradicación (37).

Se han realizado reformas a la Campaña Nacional contra la Brucelosis como lo especifica Gual (37): El 28 de abril de 1981 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el acuerdo por el cual se establece en todo el territorio nacional, con carácter obligatorio, general y permanente, la Campaña Nacional contra la Brucelosis del ganado bovino, caprino, ovino y porcino.

La población estimada para 1989 de cabezas de ganado caprino en México fué de 11,264,594, encontrándose principalmente en los Estados de San Luis Potosí con 2,366,468; Coahuila con 1,351,093; Oaxaca con 1,118,376; Puebla con 823,261; Nuevo León con 773,951; Zacatecas con 629,993 y Guerrero con 608,416 (14).

Si bien es cierto que se realiza en nuestro país el diagnóstico de esta enfermedad, el porcentaje de coberturas diagnósticas en caprinos susceptibles es muy variable como se puede observar en los siguientes años (14):

<u>Año</u>	<u>No. de cabras susceptibles</u> (miles)	<u>No. de cabras muestreadas</u> (miles)	<u>Cobertura</u> %
1982	6,652	53.5	.81
1983	6,237	47.6	.76
1984	6,174	20.7	.34
1985	6,354	51.9	.82
1986	6,516	1.0	.02
1987	5,778	35.6	.62
1988	6,563	35.2	.54

De igual manera, los porcentajes de positividad a la enfermedad en caprinos muestreados, es irregular debido a la variedad en el número de animales muestreados en los diferentes años, como se puede apreciar a continuación (14):

<u>Año</u>	<u>Cabras</u> <u>muestreadas</u> (miles)	<u>Cabras</u> <u>positivas</u> (miles)	<u>%</u>
1982	53.4	1.9	3.5
1983	47.6	2.5	5.3
1984	20.7	1.5	7.4
1985	51.9	.8	1.6
1986	1.0	.07	7.6
1987	35.6	2.3	6.4
1988	35.2	1.9	5.5

Conforme a estos datos, se tiene que los porcentajes promedio de positividad entre los años 1982 y 1988 fueron principalmente para los Estados de: San Luis Potosí con un 18.9%, Puebla con un 12.7%, Michoacán con un 11.5%, Sinaloa con un 10.1%, Zacatecas con un 9.7%, Chihuahua con un 8.5% y Guanajuato con un 7.6% (14). Ahora bien, al analizar la cobertura promedio de vacunación considerando las poblaciones promedio de cabras susceptibles y de cabras vacunadas, los Estados con porcentajes más altos fueron: Sinaloa con 6.03%, Durango con 2.96%, Guanajuato con 1.34% y Sonora y Coahuila con 1.15% (14).

Es definitivo que la brucelosis caprina causa graves pérdidas a nuestro país, ya sean por cuestiones de salud tanto humana como animal y económicas en las explotaciones de cabras que sufren esta enfermedad. Así, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos por medio de su Programa Especial de Fomento a la Ganadería para los años 1990 - 1994, establece como prioridad en los

caprinos el eliminar esta enfermedad en el 80% del territorio nacional y en el 20% restante instrumentar la campaña de vacunación, diagnóstico y control de la enfermedad, coadyuvando al incremento de la producción caprina con planes estratégicos de desarrollo del pequeño productor (58).

En nuestro país como en otros países del mundo debido a la variedad en las tasas de prevalencia de la enfermedad en las diferentes regiones, y a que no siempre se realiza la vacunación en los primeros meses de edad de los animales susceptibles, se pueden presentar casos en que los animales adultos estén propensos a sufrir la enfermedad con las correspondientes pérdidas económicas. Debido a esto, desde hace algunos años se ha estudiado el efecto de la vacunación en animales adultos, con dosis normal y dosis reducida, con cepa 19 y Rev. 1 para bovinos y caprinos respectivamente (19, 20, 24, 27, 35, 48).

Antecedentes bibliográficos.

1) Vacunación de cabras con la cepa Rev. 1 de B. melitensis.

Elberg y Faunce en 1957 fueron los primeros en publicar resultados sobre el uso de la cepa Rev. 1 de B. melitensis en caprinos, encontrando que 14 semanas después los tejidos ya no contenían células vacunales (28).

La cepa Rev. 1 es una cepa lisa atenuada de B. melitensis, clona no dependiente de la estreptomycinina aislada de células estreptomycinina dependientes, procedentes a su vez de la cepa virulenta progenitora 6056 de B. melitensis (6). Esta cepa es estable y no es reversible a la patogenicidad al realizar pases continuos (31, 44).

Como modelo experimental, García Carrillo y Trenchi (36) probaron la efectividad de varias cepas, entre ellas la Rev. 1, para prevenir la infección en cobayos al ser desafiados con una cepa patógena, determinando que la protección de la cepa Rev. 1 es apropiada. Esta cepa es una de las dos recomendadas por el Comité de Expertos en Brucelosis (FAO-OMS) para uso en ovinos y caprinos de tres a ocho meses de edad a una dosis de $1-2 \times 10^9$ gérmenes, no debiendo utilizarse esta dosis en animales adultos o gestantes. Siendo su aplicación por vía subcutánea, una sola dosis completa produce una inmunidad de al menos cuatro años y medio y quizás durante toda la vida (6, 31, 44).

A pesar de que esta cepa tiene muchas bondades, la aplicación de la dosis completa puede causar aborto en cabras gestantes y la manifestación de títulos serológicos positivos a la enfermedad durante periodos indefinidos en animales adultos (31). A manera de comparación, podemos decir que múltiples investigaciones realizadas en bovinos adultos han demostrado que la aplicación de una dosis completa de la cepa 19 de B. abortus también puede provocar abortos y títulos serológicos persistentes, aunque al aplicarse en hatos infectados su efectividad para disminuir la infección ha sido clara (2, 48, 50).

Ahora bien, en bovinos adultos la utilización de una dosis reducida de vacuna, ha demostrado una protección casi similar a la dosis normal evitando el mantenimiento prolongado de los títulos serológicos posvacunales (3, 18, 19, 33, 51), asimismo en cabras adultas y/o gestantes la aplicación de una dosis menor no provoca el aborto,

ni la excreción en cabras lactantes siendo mínima además la reacción a pruebas serológicas (1, 5, 6, 24, 31, 40).

2) Vacunación de cabras con otras cepas.

Se han probado otras cepas de Brucella spp para inmunizar caprinos, es así el caso de la 899 B que Baer et al. (1971) compararon con la cepa Rev. 1, encontrando que esta última brinda una mayor y mejor protección. (7)

También la cepa 45/20 de B. abortus con gérmenes muertos y adyuvante se ha estudiado, demostrando buenos resultados inmunizantes, aunque no mejores que los obtenidos por la cepa Rev. 1 (5, 31, 44).

La otra cepa recomendada por el Comité de Expertos en Brucelosis para utilizarse en ovinos y caprinos es la H 38; con esta cepa también se elabora un antígeno a base de gérmenes muertos con adyuvante y ha demostrado un poder inmunizante adecuado (31) aunque su uso no está establecido en nuestro país.

3) Pruebas de diagnóstico serológico en caprinos.

Es de suma importancia el desarrollo de pruebas diagnósticas eficientes ya que los problemas relacionados con el diagnóstico son varios, así Nicoletti (49) menciona algunos de ellos:

- a) Periodos de incubación.
- b) Existencia de infecciones latentes.
- c) Reacciones falsas positivas causadas por la vacunación, así como por antígenos heteroespecíficos.
- d) Reacciones falsas negativas.
- e) Procedimientos complejos.

Asimismo, enlista las principales pruebas serológicas que han sido probadas para lograr el diagnóstico fidedigno de esta enfermedad:

A. Cuantitativas.

1.- Aglutinación.

- a) Tubo lento o placa (rápida).
- b) Antiglobulina de Coombs.
- c) Hemoaglutinación.

2.- Fluorescencia indirecta.

3.- Prueba de ELISA (Enzima conjugada con inmunosorbentes) o prueba de ELA (Anticuerpo conjugado con la enzima).

B. Cualitativas y cuantitativas.

1.- Aglutinación.

- a) Inactivación por calor.
- b) Antígeno acidificado, tamponado, rosa de bengala, tarjeta.
- c) Mercaptoetanol.
- d) Rivanol.

2.- Fijación de complemento, método macro y micro.

3.- Precipitación.

- a) Difusión en gel.

4.- Radioinmunoensayo.

5.- Hemoaglutinación indirecta (HI).

Waghela et al. (64) compararon las pruebas de rosa de bengala, aglutinación en tubo, doble difusión en gel y fijación de complemento, encontrando que la prueba de rosa de bengala fue la más sensible y la de doble difusión en gel la más específica, pudiendo esta última llegar a sustituir a la prueba de fijación de complemento.

La prueba de aglutinación en tubo se utiliza mucho en los caprinos no vacunados, aumentando su eficacia al usar un 5% de NaCl en lugar de 0.85% en la solución dilutora del antígeno para reducir el fenómeno de zona (15). Un resultado de 50 unidades internacionales (UI) por mililitro puede considerarse como sospechoso, debiendo confirmarse con un segundo muestreo cuatro a seis semanas después, mientras que un título igual o superior a 100 UI/ml debe considerarse como positivo (31).

Para Suárez y Flores (61) y Sánchez-Mejorada (57) las pruebas serológicas de rutina (especialmente placa y aglutinación en tubo) en caprinos presentan inseguridad, considerando a la fijación de complemento la prueba más confiable en esta especie animal. Esta prueba también es recomendada por el Comité de Expertos en Brucelosis, ya que se considera que los animales vacunados con la cepa Rev. 1 entre tres y ocho meses de edad se vuelven negativos serológicamente a los seis meses después de haberse aplicado la vacuna; la dilución del suero considerada como positiva varía entre 1/2 y 1/40, según la sensibilidad de la técnica de prueba (31).

Las pruebas de mercaptoetanol y rivanol parecen tener una especificidad similar, siendo la segunda relativamente más compleja en cuanto a su realización. Ahora bien, estas pruebas parecen tener una especificidad muy similar a la que se obtiene con la prueba de fijación de complemento (31).

Por otra parte, Schurig (60) encontró que las cabras vacunadas con la cepa Rev. 1 de B. melitensis con dosis 1.2×10^9 ó 1.2×10^5 no presentan anticuerpos detectables por la prueba de inmunodifusión radial utilizando la cepa B 115 de B. melitensis para la elaboración del antígeno. Este hecho sugiere la posibilidad de diferenciar cabras vacunadas de cabras infectadas por medio de esta prueba, siempre y cuando estas últimas produzcan anticuerpos detectables por el antígeno utilizado. Esta suposición está basada en algunas investigaciones previas que han demostrado que pruebas serológicas específicas especialmente rivanol, doble difusión y fijación de complemento, pueden diferenciar anticuerpos posvacunales de anticuerpos por infección en bovinos adultos (20, 41, 48, 50, 51) y específicamente Jones et al., (39) y Rodríguez (55) encontraron que la prueba de inmunodifusión radial, utilizando un antígeno polisacárido (poli B) de la cepa B 115, ha demostrado ser muy sensible y más específica que la fijación de complemento en bovinos vacunados en la edad adulta con la cepa 19 de B. abortus.

Considerando las ventajas que ha proporcionado la utilización de las vacunas en dosis menores a la normal, para la prevención y control de la enfermedad, en este trabajo se busca comparar los resultados obtenidos por pruebas serológicas rutinarias y complementarias, al aplicar diferentes dosis de la cepa Rev-1 de B. melitensis a cabras jóvenes, planteando la hipótesis de que las dosis utilizadas manifestarán diferentes resultados entre sí, los cuales serán evaluados por medio de las pruebas aplicadas.

OBJETIVOS

Experimento 1

- a) Comparar la respuesta serológica de cabras jóvenes mantenidas en confinamiento, al aplicarles la cepa Rev-1 de B. melitensis en tres diferentes dosis:
- 1) 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)(Dosis normal),
 - 2) 1×10^8 UFC (Dosis reducida) y
 - 3) 5×10^8 UFC (Dosis reducida)
- por medio de las pruebas de tarjeta (T), aglutinación en tubo (AT), aglutinación con mercaptoetanol (ME), fijación de complemento (FC), doble difusión en gel (DD) e inmunodifusión radial (IDR).
- b) Conocer la posible protección contra la infección en los tres grupos antes descritos, al ser desafiados 180 días después de haber recibido la cepa Rev-1, con una dosis de 4×10^8 UFC de la cepa 16M de B. melitensis.

OBJETIVOS

Experimento 2

- a) Comparar la respuesta serológica de cabras jóvenes mantenidas en situaciones de campo, al aplicarles la cepa Rev-1 de B. melitensis en tres diferentes dosis:
- 1) 1×10^9 UFC (Dosis normal),
 - 2) 1×10^8 UFC (Dosis reducida) y
 - 3) 5×10^3 UFC (Dosis reducida)
- por medio de las pruebas de T, AT, ME, FC y DD.
- b) Conocer la posible protección contra la infección en los dos grupos que recibieron las dosis reducidas, al ser desafiados 60 días después de haber recibido la cepa Rev-1, con una dosis de 4×10^5 UFC de la cepa 16M de B. melitensis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1

Animales de experimentación.

Se utilizaron 40 caprinos hembras entre cuatro y seis meses de edad, no vacunados contra brucelosis y negativos a las pruebas serológicas de T, aglutinación en placa (P), AT y ME. Los animales se mantuvieron con base en una dieta seca de mantenimiento y agua a libre acceso.

Cepas vacunales y de desafío.

La cepa Rev-1 que se utilizó fue a partir de una vacuna comercial de B. melitensis*, obteniendo las dosis reducidas aplicadas por dilución de la vacuna en solución salina fisiológica estéril (SSF) , dependiendo de las UFC que se obtuvieron en su análisis previo. La aplicación de la dosis normal se hizo siguiendo las recomendaciones del laboratorio productor. Antes y después de la aplicación, se confirmó la concentración del inóculo siguiendo el método de Miles y Misra según lo describen Alton et al.(43).

El desafío se realizó con la cepa 16 M de B. melitensis, en cultivo puro a una concentración de 4×10^6 UFC. Previamente, a esta cepa se le dio un pase en cobayo para después inocularla en cuatro cabras hembras adultas no vacunadas contra brucelosis y sin títulos serológicos, con la finalidad de verificar la virulencia de la cepa y la efectividad de la dosis de desafío, habiendo recuperado la cepa de los nodos linfáticos de tres de las cuatro cabras utilizadas. Posteriormente se mantuvo congelada a -60 C con leche descremada hasta su uso, momento en que se sembró en agar tripticosa soya + 10% de suero a 37 C durante 48 hrs. para obtener el cultivo bacteriano, al cual se le realizó una lectura turbidimétrica en un aparato Spectronic 20 (***) ajustado a una longitud de onda de 420 nanómetros para obtener la concentración aproximada de la cosecha y realizar posteriormente las diluciones necesarias con SSF estéril hasta obtener la dilución adecuada. La concentración del inóculo de desafío se verificó también antes y después de su aplicación por medio del método de Miles y Misra según lo describen Alton et al.(43).

(*) PRONABIVE (México).

(**) Bausch and Lomb.

Antígenos.

Los antígenos utilizados para las pruebas de T, AT, ME y FC fueron elaborados a partir de la cepa 1119-3 de B. abortus y donados por el Dr. G.M. Brown del National Veterinary Services Laboratories (N.V.S.L.) U.S.D.A., Ames, Iowa, U.S.A.

El antígeno poli-B que se utilizó en las pruebas de DD e IDR se obtuvo a partir de la cepa Rev. 1 de B. melitensis. La técnica que se utilizó para su obtención fue la descrita por Díaz et al. (22) con una concentración final del antígeno de 80.3 microgramos (mcg) de poli-B por mililitro (ml) de antígeno para la DD y de 107.2 mcg de poli-B por ml de gel de agarosa para la IDR. Estas concentraciones se determinaron haciendo pruebas previas con diferentes diluciones de los antígenos ante sueros testigos positivos y negativos.

Pruebas serológicas y técnicas de aislamiento del microorganismo.

Las técnicas para realizar las pruebas serológicas, preparación de medios de cultivo y siembra para intentar el aislamiento de la brucela, así como la diferenciación de las cepas que se aislaron fueron las recomendadas por Alton et al. (6), Ciprián et al. (15) y por United States Department of Agriculture (62).

Criterio para la serología.

El criterio de interpretación para las pruebas serológicas en este experimento se basó en lo recomendado por Alton et al. (6), considerando positividad para las pruebas de T, DD e IDR al encontrarse aglutinación o precipitación aparente según la prueba. Positividad en la prueba de ME al manifestarse aglutinación en cualquier dilución, positividad en la prueba de AT a la manifestación de aglutinación en diluciones mayores de 1:50 y positividad en la prueba de FC a los sueros con reacción en diluciones mayores de 1:4.

Material de laboratorio y equipo.

El material y equipo de laboratorio que se utilizó, fue el de uso común en un laboratorio de bacteriología siendo en este caso, el del proyecto Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes del INIFAP-SARH.

Instalaciones.

Los animales después de vacunarse se mantuvieron separados por lotes en corrales con piso de cemento hasta dos semanas antes del desafío (165 días). Posteriormente, los animales se trasladaron a unidades de aislamiento donde se desafiaron y se mantuvieron hasta el final del experimento. Las unidades de aislamiento fueron con las que cuenta el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) perteneciente a la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) en el kilómetro 15.5 de la carretera México-Toluca. Estas instalaciones fueron acondicionadas con los aditamentos de seguridad necesarios para evitar la fuga del germen al realizar el desafío de los animales y la contaminación de los investigadores que requirieron entrar a las instalaciones (Ver APÉNDICE 2).

Diseño experimental.

Los 40 caprinos se distribuyeron de la siguiente manera:

Grupo 1: Diez cabras inoculadas con la dosis completa (1×10^9).

Grupo 2: Diez cabras inoculadas con una dosis reducida (1×10^6).

Grupo 3: Diez cabras inoculadas con una dosis reducida (5×10^3).

Grupo 4: Diez cabras sin inocular, siendo este el grupo testigo:

Los animales se mantuvieron separados por grupos después de la inoculación. Posteriormente, todos los animales de los diferentes grupos fueron desafiados (180 días después) por vía conjuntival con un volumen de .12 ml (.06 ml en cada ojo).

Se tomaron muestras de suero de todos los animales el día de la vacunación y posteriormente los días 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 (desafío), asimismo los días 18 y 40 después del desafío (198 y 220 respectivamente posvacunación). A todos los sueros se les practicaron las pruebas de T, AT, ME y FC según las técnicas antes descritas. Para las pruebas de DD e IDR se seleccionaron los sueros de los animales sangrados los días 0, 15, 30, 60 y 120 así como el del día 40 posdesafío (220 posvacunación).

Con la finalidad de confirmar o negar la infección de los animales por el desafío, todos ellos fueron sacrificados entre el día 220 y 227

posvacunación, colectándose muestras de bazo, glándula mamaria y los pares de nodos linfáticos submaxilares, parotídeos, preescapulares, prefemorales y supramamarios, los cuales se sembraron en dos ocasiones. La primera después del sacrificio en agar brucela con 10% de suero estéril, procediendo después a la congelación de las muestras de órganos. La segunda 30 días después en agar brucela con 10% de suero + inhibidores de contaminantes (Medio de Kuzdas-Morse) (42). Las técnicas de sembrado, preparación de medios y diferenciación de colonias fueron las descritas con anterioridad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 2

Animales de experimentación.

Se utilizaron 32 caprinos hembras entre cuatro y seis meses de edad, no vacunados contra brucelosis y negativos a las pruebas serológicas de T, P, AT y ME. Los animales se mantuvieron en pastoreo dentro de su hato original.

Cepas

La cepa Rev-1 que se utilizó fue a partir de una vacuna comercial (la misma que en el experimento 1) de B. melitensis, realizando las diluciones de la vacuna para las dosis reducidas y la verificación de la concentración del inóculo de la misma forma que en el experimento anterior. Para el desaffo se utilizaron la misma cepa y la misma dosis que en el experimento 1.

Antígenos

Los antígenos que se utilizaron en este experimento fueron los mismos que los ya descritos en el experimento 1, a excepción del antígeno para la prueba de IDR, ya que esta prueba no se realizó en este experimento.

Pruebas serológicas y técnicas de aislamiento

Las técnicas utilizadas en este experimento para realizar las pruebas serológicas, preparación de medios de cultivo, siembra y diferenciación de las posibles cepas aisladas fueron similares a las descritas con anterioridad en el experimento 1.

Criterio para la serología

Se utilizó el mismo criterio de interpretación, de las pruebas serológicas realizadas, que en el experimento 1.

Material de laboratorio y equipo

Se utilizó el mismo que el mencionado en el experimento 1.

Instalaciones

Los animales que se sometieron al desaffo, después de permanecer 30 días en su propio hato (Apaseo El Alto, Gto.), se introdujeron a las mismas unidades de aislamiento que se utilizaron en el experimento 1.

Diseño experimental

Los 32 caprinos se distribuyeron de la siguiente manera:

- Grupo 1: Siete cabras inoculadas con la dosis completa (1×10^9).
- Grupo 2: Once cabras inoculadas con una dosis reducida (1×10^8).
- Grupo 3: Diez cabras inoculadas con una dosis reducida (5×10^7).
- Grupo 4: Cuatro cabras sin inocular, siendo este el grupo testigo.

Los animales se mantuvieron en su propio hato después de la vacunación hasta el día 50, día en que se tomaron al azar tres animales del grupo 2, tres animales del grupo 3 y cuatro animales del grupo 4 para ser desafiados el día 60 en las unidades de aislamiento con la cepa, dosis y vía mencionadas en el experimento anterior.

Después de la vacunación se tomaron muestras de suero de todos los animales los días 0, 15 y 30; a los animales incluidos en el desafío, se les sangró también el día 60 y 84 posvacunación. A todos los sueros se les practicaron las pruebas de T, AT, ME, FC y DD siguiendo las técnicas antes descritas.

De la misma manera que en el experimento 1, para confirmar o negar la infección de los animales por el desafío, estos fueron sacrificados el día 84 posvacunación, colectando las mismas muestras y realizando las mismas siembras que en el experimento anterior.

RESULTADOS

Experimento 1

Debido a causas ajenas al experimento se sufrió la pérdida de los sueros del día 120, faltando por realizarse la prueba de IDR, por lo que no se pudo obtener resultados para esta prueba en ese día.

La prueba de T (cuadros 1 y 2)(gráfica 1) manifestó para la dosis normal un 100% de sueros positivos en el día 15, disminuyendo paulatinamente hasta el día 150 y volviéndose negativos en su totalidad para el día 180 posvacunación, día en que se realizó el desafío y el cual produjo un aumento -de hasta el 50%- en los sueros positivos para el día 220. El grupo 2 (1×10^6) presentó un porcentaje bajo e intermitente de sueros positivos entre la vacunación y el día 120, en cambio el grupo 3 (5×10^3) manifestó sueros positivos únicamente para el día 15 (20%) y para el día 220 (33%) correspondiendo dichas respuestas a la vacunación y al desafío respectivamente. Los animales testigo (grupo 4) presentaron para esta prueba un 40% de sueros positivos para el día 90 únicamente, no coincidiendo estos resultados con el comportamiento general de este grupo durante todo el tiempo de duración del experimento y en las demás pruebas realizadas, manteniéndose siempre con resultados negativos.

En los cuadros 1 y 2 y gráfica 2 se muestran los resultados obtenidos para la DD. La dosis normal (grupo 1) obtuvo un 100% de sueros positivos en el día 15, disminuyendo hasta el 20% en el día 60 y desapareciendo el porcentaje positivo entre los días 60 y 120, ya que las muestras del día 90 no se probaron en DD; esta misma dosis manifestó un 50% de sueros positivos en el día 220 (40 días posdesafío). La dosis 1×10^6 solo demostró un 17% de sueros positivos en el día 15 posvacunación en esta prueba. Por otra parte, la dosis 5×10^3 demostró un 40% de sueros positivos para el día 15, 20% para el día 30 y la desaparición de los porcentajes positivos entre el día 30 y 60 posvacunación, manteniéndose así durante el resto del experimento.

Los resultados para la prueba IDR se muestran en los cuadros 1 y 2 y gráfica 3, en donde se observa que el grupo 1 (dosis normal) es el único (1×10^6 y 5×10^3 negativos) que demostró sueros positivos

entre el día 15 y 60, considerando que todos se vuelven negativos entre los días 60 y 120 (al igual que en la prueba DD). Desafortunadamente, la pérdida de los sueros del día 120 nos impide conocer el estado serológico de los animales para este día.

El porcentaje de sueros positivos de los diferentes grupos con la prueba AT se muestran en los cuadros 1 y 2 y gráfica 4. En ellos se observa que el grupo 1 manifestó un porcentaje alto (100%) de sueros positivos en el día 15 para decrecer posteriormente a porcentajes bajos y mantenerse así hasta el día 180. El grupo 2 no presentó sueros positivos para esta prueba durante todo el experimento. El grupo 3 sólo obtuvo un 20% de sueros positivos en el día 15 después de la vacunación.

En la prueba ME el grupo 1 presentó un porcentaje alto de sueros positivos en los días 15 y 30 (100 y 80% respectivamente), decreciendo al 20% en el día 45 y manteniéndose en este nivel hasta el día 120. Los grupos 2 y 3 no presentaron sueros positivos durante todo el experimento (cuadros 1 y 2)(gráfica 5).

Los porcentajes de sueros positivos obtenidos en la prueba FC se muestran en los cuadros 1 y 2 y gráfica 6. El grupo vacunado con la dosis normal alcanza el 100% de sueros positivos para el día 15, reduciendo en porcentaje rápidamente y manifestando un 0% en el día 60, pero volviendo a presentar un 25% durante los muestreos de los días 90 y 120. El grupo vacunado con la dosis 1×10^5 sólo manifestó sueros positivos (25%) en el día 220 (40 posdesafío), mientras que el grupo vacunado con la dosis 5×10^3 obtuvo un 20% de sueros positivos en el día 15 y se mantiene negativo hasta el día 40 posdesafío (33%). Para esta prueba, el grupo testigo demostró un 20% de sueros positivos en el día 220 como respuesta al desafío.

Debido a diversos factores, se perdieron 18 animales antes de realizar el desafío, por lo que el número de animales sacrificados al final, fue menor que el del comienzo del experimento.

A partir de las siembras realizadas en dos ocasiones del bazo, glándula mamaria y nodos linfáticos muestreados, la primera en

medio de cultivo con suero y la segunda en medio de cultivo con suero y antibióticos, no se logró el aislamiento de B. melitensis ya fuera de la cepa de desafío (16 M) o de la cepa vacunal (Rev. 1) de ninguno de los animales sacrificados.

RESULTADOS

Experimento 2

Los resultados obtenidos en la prueba de T se muestran en el cuadro 3 y gráfica 7. El grupo vacunado con la dosis normal (grupo 1) obtuvo un 100 y 86% de sueros positivos en los días 15 y 30 respectivamente. En cambio el grupo vacunado con la dosis 1×10^5 (grupo 2) sólo obtuvo un 18 y 27% de sueros positivos en los mismos días. Esta prueba no detectó sueros positivos para el grupo vacunado con la dosis 5×10^3 (grupo 3) ni para el grupo testigo (grupo 4), el cual a su vez fue negativo para todas las demás pruebas en todos los sangrados.

En la prueba DD, la dosis normal manifestó un 100% de sueros positivos en el día 15 disminuyendo hasta un 14% en el día 30, contrariamente las dosis reducidas manifestaron un incremento de sueros positivos, la dosis 1×10^6 presentó 18 y 73% y la dosis 5×10^3 un 10 y 60% para los días 15 y 30 posvacunación respectivamente (cuadro 3 y gráfica 8). Los porcentajes de sueros positivos obtenidos en los diferentes grupos para la prueba AT se muestran en el cuadro 3 y gráfica 9. En estos se observa que a los 15 y 30 días, el grupo 1 obtuvo 100 y 71%, el grupo 2 obtuvo sólo un 9% en el día 15 y el grupo 3 no obtuvo ningún porcentaje positivo.

En el cuadro 3 y gráfica 10 se observan los resultados obtenidos para la prueba ME: la dosis 5×10^3 fue negativa, la dosis 1×10^6 obtuvo 18% de sueros positivos en el día 30 únicamente y la dosis 1×10^9 manifestó 86 y 100% para los días 15 y 30 posvacunación.

Los resultados obtenidos en la prueba FC (cuadro 3 y gráfica 11) para el día 15 fueron: Grupo 1- 86%, grupo 2- 18%, grupo 3- 0% y para el día 30 fueron: Grupo 1- 100%, grupos 2 y 3- 0%.

Los animales sometidos al desafío de los grupos 2, 3 y 4 (1×10^6 , 5×10^3 y testigo respectivamente) no mostraron porcentajes positivos en ninguna prueba serológica en los sangrados correspondientes al desafío (día 60) y al sacrificio (día 84).

Al igual que en el experimento 1 se realizó la siembra en dos ocasiones de los órganos y nodos linfáticos de los animales desafiados, en medios de cultivo sin antibióticos y con antibióticos, sin lograr obtener algún aislamiento de Brucella spp.

DISCUSIÓN

En el experimento 1 las pruebas de T, AT, ME y FC -en la dosis normal- mantuvieron porcentajes positivos entre los cuatro y seis meses posvacunación, no manifestándose una respuesta similar para las dosis reducidas, las cuales fueron de poca duración y de poca intensidad. Específicamente, en la prueba de T los títulos desaparecen el día 180 en la dosis normal, sin embargo en la dosis 1×10^5 se presenta un porcentaje de sueros positivos variable hasta el día 120, siendo diferentes ambas a la dosis 5×10^3 la cual desaparece para el día 30. En los trabajos realizados por Jones et al. (40) los porcentajes de reactores en la dosis completa para la prueba de T se mantienen aún para el 14^o mes aunque muy bajos, no siendo así para la dosis reducida (3.5×10^4) cuyos títulos a T desaparecen al 2^o mes. Debido a que la dosis reducida utilizada por Jones et al. es intermedia entre las utilizadas en este trabajo, se considera que la relación entre ambos trabajos es bastante cercana. Asimismo existe concordancia con los trabajos de Varela-Díaz et al. (63) los que encuentran que las pruebas de aglutinación y tarjeta reaccionan ante las inmunoglobulinas G y M y en especial la prueba de T es positiva con títulos aglutinantes altos.

La prueba de AT manifestó un porcentaje alto de sueros positivos dentro de los primeros 30 días posvacunación, manteniendo porcentajes bajos hasta el día 180 para el grupo de dosis normal. Sin embargo la dosis 1×10^5 no manifestó porcentajes positivos para esta prueba y la dosis 5×10^3 alcanzó únicamente un 20% de sueros positivos para el día 15. Estos resultados confirman los hallazgos de Varela-Díaz et al. (63), en los que la prueba de AT reacciona ante IgG e IgM del suero de animales vacunados con la dosis normal y los de Jones et al. (40) en cuanto al mantenimiento de porcentajes bajos por un largo tiempo al utilizar la dosis normal, lo cual confirma la relativa utilidad de esta prueba. Sin embargo difieren de los de Díaz (21) quien encontró que con las dosis reducidas 1×10^5 y 5×10^3 los porcentajes de sueros positivos se mantienen hasta los 220 y 150 días posvacunación respectivamente, resultados que son diferentes -a su vez- de los hallazgos de Alton (1) el cual encontró una respuesta de marcada

menor intensidad en animales adultos con una dosis de 3.2×10^4 comparada con la de animales jóvenes que recibieron una dosis de 5.7×10^4 .

La prueba de ME en este trabajo sólo manifestó títulos en la dosis 1×10^9 , obteniéndose un porcentaje alto de sueros positivos hasta el día 30, disminuyendo hasta un 20% aproximadamente para el día 45 y manteniéndose así hasta el día 120. Estos resultados son muy similares a los encontrados en la prueba de AT en cuanto al porcentaje positivo en los primeros 45 días posvacunación, pero difiriendo en cuanto a la duración de los mismos. Jones et al. (40), Varela-Díaz et al. (63) y Alton (1) encontraron una rápida desaparición de los títulos positivos a ME, aunque los dos primeros grupos de investigadores encontraron dos cabras que retuvieron títulos positivos durante toda la duración de su experimento por producir IgG, lo cual no sucedió con todos los demás animales los cuales se volvieron negativos a los dos meses aproximadamente. En el presente trabajo a partir del día 45, la misma cabra presentó un título positivo decreciente (con respecto a las diluciones de la prueba) hasta el día 120, por lo que consideramos que este puede ser un caso similar al encontrado por los autores antes mencionados por lo que se coincide con ellos en la dificultad de diferenciar respuestas vacunales o de infección en base a la producción de IgG ó IgM por medio de esta prueba. Es conveniente mencionar que actualmente la PRONABIVE en México produce antígeno para la prueba de rivanol, por lo que sería conveniente considerar este antígeno en experimentos que busquen la detección de IgG.

Diversas investigaciones han demostrado la alta especificidad y la alta correlación entre infección y títulos positivos en la prueba de fijación de complemento (6, 8, 31). Algunos autores (40) mencionan que los títulos posvacunales para esta prueba al utilizar la dosis normal, pueden presentar una duración variable, debido quizás, a la técnica de prueba utilizada aunque disminuyendo a niveles mínimos a los 4 meses y especificando que esta prueba reacciona con IgG (63). Sin embargo Alton y Elberg (4) y Casas Olascoaga (12) refieren que los títulos

se tornan negativos en la mayoría de los animales a los seis meses y en casi todos los animales al año. En este trabajo los porcentajes de sueros positivos en la dosis normal decrecen a niveles bajos para el día 45, manteniéndose hasta el día 120 a causa de un animal, el cual también presentó persistencia de títulos en la prueba de ME. Para la dosis 1×10^5 no se presentó ningún porcentaje positivo y para la dosis 5×10^3 sólo un 20% para el día 15, difiriendo de los resultados de Díaz (21) donde la persistencia fue de 120 y 180 días para las dosis 5×10^3 y 1×10^5 respectivamente aunque en animales adultos. No obstante, existe concordancia con resultados en bovinos (12) y en caprinos (40) en que los títulos posvacunales de la dosis reducida casi desaparecen para el segundo mes, aunque la intensidad de la respuesta fue menor en este trabajo.

Las pruebas de precipitación, concretamente las de doble difusión e inmunodifusión radial, han sido utilizadas por una gran cantidad de investigadores en diferentes aspectos de la infección por Brucella spp.; se ha utilizado en la infección por B. canis en perros (47), la infección por B. ovis en ovinos (45, 46), la detección de anticuerpos posvacunales producidos por la vacuna Rev. 1 en ovinos (16) y en bovinos para diferenciar animales vacunados de infectados por la prueba de doble difusión (41) o inmunodifusión radial (8, 17, 22, 39). Esta última área de estudio ha cobrado gran interés por lo que se han ampliado las investigaciones de esta técnica hacia la búsqueda de nuevas cepas que contengan el antígeno específico poli-B (17, 25, 52) o bien probar dicho antígeno con animales vacunados con diferentes dosis (17, 39, 52). Los trabajos de Ontiveros y Tenorio (52), determinaron que el poli-B obtenido a partir de la cepa Rev. 1 de B. melitensis fue similar en resultados, al compararlo con la prueba de fijación de complemento en animales vacunados e infectados. Posteriormente Cortés et al. (17), compararon las cepas 16 M, Rev. 1 y B-115 de B. melitensis en cuanto a rendimiento para la obtención de poli-B y efectividad de dichos antígenos en la prueba de inmunodifusión radial. Los resultados obtenidos, recomendaron la

utilización de las cepas lisas 16 M y Rev. 1 por un mayor rendimiento y una similitud de resultados con la cepa B-115 al probarse con animales vacunados con diferentes dosis de la cepa 19 de B. abortus y con animales sospechosos de la infección o negativos.

En este trabajo se utilizaron las pruebas DD e IDR con el antígeno poli-B de la cepa Rev. 1, ambas pruebas detectaron porcentajes positivos en los animales vacunados con la dosis normal hasta el día 60, ningún porcentaje positivo en las dosis 1×10^5 y 5×10^3 por la prueba de IDR y un bajo porcentaje de sueros positivos con la desaparición de títulos para los días 30 y 60 en las dosis 1×10^5 y 5×10^3 respectivamente con la prueba DD. Estos resultados concuerdan con estudios previos (21, 23) en cuanto al alto porcentaje de sueros positivos, mostrado por la DD en la dosis normal dentro de los primeros 60 días posvacunación y en cuanto a la baja respuesta en las dosis 1×10^5 y 5×10^3 . Aunque la prueba de IDR detectó inicialmente un alto porcentaje de sueros positivos en la dosis normal, fue incapaz de demostrar la presencia de anticuerpos contra el poli-B en las dosis reducidas como ha sido informado por otros autores en trabajos con bovinos (8, 39) y como lo hizo en este trabajo la prueba DD.

Schurig (60) encontró que cabras vacunadas con la dosis normal o bien con una dosis reducida (1.25×10^5) de la Rev. 1 de B. melitensis nunca, durante 193 días, presentaron resultados positivos a la prueba de IDR con un antígeno elaborado a partir de la cepa B-115, resultados que son diferentes a los encontrados en este trabajo, lo cual sugiere la elaboración de otras investigaciones sobre este tema.

El hecho de que no se recuperara la cepa virulenta de ninguno de los animales en el grupo testigo nos impide hacer una comparación significativa de pruebas diagnósticas.

Los resultados obtenidos en las pruebas serológicas para el segundo experimento nos muestran una respuesta mayor con la dosis normal a los 15 días posvacunación, al compararla con las dos dosis reducidas utilizadas. Estos resultados -al igual que en el experimento 1- nos confirman que la dosis normal produce una respuesta humoral mayor que

las dosis reducidas también en animales que permanecieron en su rebaño al libre pastoreo .

En ambos experimentos la dosis que retuvo durante mayor tiempo los porcentajes positivos más altos fue la de 1×10^9 ó normal, coincidiendo con trabajos realizados previamente tanto en bovinos (19, 20, 48, 50, 51) como en caprinos (1, 23, 27, 31, 40).

El no haber logrado el aislamiento de la cepa de desaffo de ninguno de los animales testigo utilizados en este trabajo, nos lleva a elaborar algunas consideraciones al respecto. 1) Las brucelas son gérmenes fastidiosos para crecer in vitro (30) por lo que se requieren ciertos factores atmosféricos y de cultivo (6), provocando que su recuperación a partir de tejidos presente ciertas dificultades (1, 5), incrementándose estos factores por la posibilidad de que las brucelas -por ser gérmenes intracelulares- se encontraran en un número reducido o secuestradas en tejidos no muestreados. 2) Que el desaffo se hubiera realizado en forma incorrecta o con una viabilidad celular muy baja o bien al sistema de siembra empleado, ya que la patogenicidad de la cepa había sido probada previamente. Se considera que esto no sucedió en este trabajo debido al conocimiento de que un desaffo realizado con la misma cepa, con la misma dosis, en el mismo día, con la misma técnica y por los mismos investigadores, logró infectar al 33% de los animales testigos en un trabajo realizado con cabras adultas simultáneamente a este trabajo, descartando asimismo alguna falla en el intento de aislamiento de la cepa de desaffo (21). 3) Quizás debido a la posible resistencia a la infección por causa de la raza o linaje de los animales y que como informa el Comité de Expertos en brucelosis (32), este factor puede llegar a causar repuestas serológicas muy variadas al utilizar la vacuna Rev. 1 de B. melitensis en cabritas y corderos. O bien, porque los animales jóvenes sean más resistentes que los adultos (34), o como lo especifica el Comité de Expertos en brucelosis (31) al informar que los cabritos pueden adquirir la infección antes o después de nacer y curar espontáneamente, la mayoría de las veces, antes de llegar a la edad de

la reproducción. 4) Posiblemente la dosis de desaffo no haya sido la más conveniente, ya que en otras investigaciones (1, 5) diferentes dosis de desaffo permitieron diferente número de aislamientos. Alton (1) encontró que al vacunar cabras con 10^6 , 10^7 y 10^8 sólo aisló el germen de desaffo en tres de nueve animales, nueve de diez animales y diez de diez animales respectivamente. En especial se observó una variación de aislamientos al desafiar las cabras testigo con 10^4 , 10^5 y 10^6 sin aislar alguna cepa de diez animales con la primera dosis, cinco aislamientos de diez animales con la segunda dosis y ocho aislamientos de diez animales para la dosis 10^6 . Asimismo, Alton et al. (5) al vacunar cabras jóvenes con la dosis normal (7×10^8) y cabras adultas con una dosis reducida (3.5×10^4) y desafiando con diferentes dosis, encontraron que a partir del grupo desafiado con 10^6 obtuvieron cero aislamientos de nueve animales para ambas dosis, en el grupo desafiado con 10^7 obtuvieron tres aislamientos de diez animales para ambas dosis y al utilizar un desaffo con 10^8 obtuvieron dos aislamientos de diez animales con la dosis normal y tres aislamientos de diez animales con la dosis reducida y nuevamente la variación se observa de forma más aparente en los grupos testigo que tuvieron dosis de desaffo menores, así en la dosis 10^4 no obtuvieron aislamientos de diez animales, en la dosis 10^5 obtuvieron dos aislamientos de diez animales y en la dosis 10^6 obtuvieron seis aislamientos de diez animales.

Los resultados obtenidos en este trabajo, demostraron que las dosis reducidas utilizadas produjeron títulos serológicos bajos y de poca duración, en comparación con los obtenidos por la dosis normal. Además en esta última dosis, las pruebas de tarjeta, aglutinación en tubo, aglutinación con mercaptoetanol y fijación de complemento mantuvieron títulos positivos -aunque bajos- hasta los días 120 ó 150, no sucediendo así para las pruebas de doble difusión en gel e inmunodifusión radial cuyos títulos desaparecieron para el día 90 después de la aplicación de la cepa Rev-1. Aunque se realizó en dos ocasiones la siembra de tejidos de los animales de los diferentes grupos, no se logró el aislamiento de la cepa de desaffo.

A P É N D I C E 1

CUADRO 1. Resultados expresados en porcentaje de positividad a las pruebas serológicas efectuadas a cabras jóvenes vacunadas con diferentes dosis de B.melitensis Rev-1 y mantenidas en confinamiento.

TRATAMIENTOS	1×10^9					1×10^5					5×10^3					Testigo				
DÍAS	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
T	0	100	80	80	40	0	17	0	17	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
DD	0	100	80	*	20	0	17	0	*	0	0	40	20	*	0	0	0	0	*	0
IDR	0	100	60	*	20	0	0	0	*	0	0	0	0	*	0	0	0	0	*	0
AT	0	100	80	20	20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
ME	0	100	80	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC	0	100	60	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0

*No se realizó.

T.- Tarjeta; DD.- Doble difusión en gel; IDR.- Inmunodifusión radial; AT.- Aglutinación en tubo; ME.- Aglutinación con mercaptoetanol; FC.- Fijación de Complemento.

CUADRO-2. Resultados expresados en porcentaje de positividad a las pruebas serológicas efectuadas a cabras jóvenes vacunadas con diferentes dosis de B.melitensis Rev-1 y mantenidas en confinamiento.

TRATAMIENTOS	1×10^9						1×10^5						5×10^3						Testigo					
DÍAS	90	120	150	180 ^a	198	220	90	120	150	180 ^a	198	220	90	120	150	180 ^a	198	220	90	120	150	180 ^a	198	220
T	50	25	25	0	0	50	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	40	0	0	0	0	0
DD	*	0	*	*	*	50	*	0	*	*	*	0	*	0	*	*	*	0	*	0	*	*	*	0
IDR	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*	0
AT	25	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ME	25	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC	25	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	20

* No se realizó

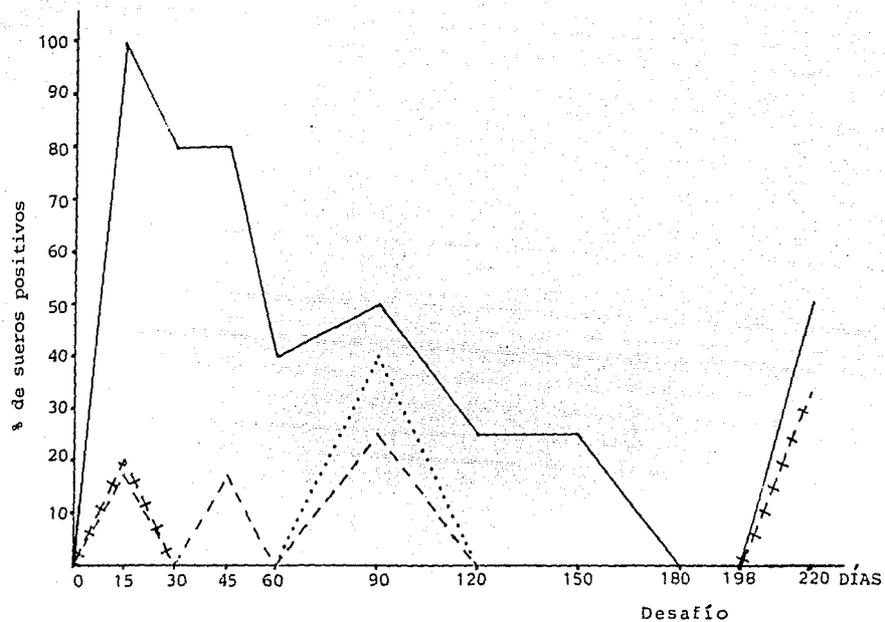
^aDesafío.

T.- Tarjeta; DD.- Doble difusión en gel; IDR.- Inmunodifusión radial; AT.- Aglutinación en tubo; ME.- Aglutinación con mercaptoetanol; FC.- Fijación de Complemento.

CUADRO 3. Resultados expresados en porcentaje de positividad a las pruebas serológicas efectuadas a cabras jóvenes vacunadas con diferentes dosis de B.melitensis Rev-1 y mantenidas en su propio hato.

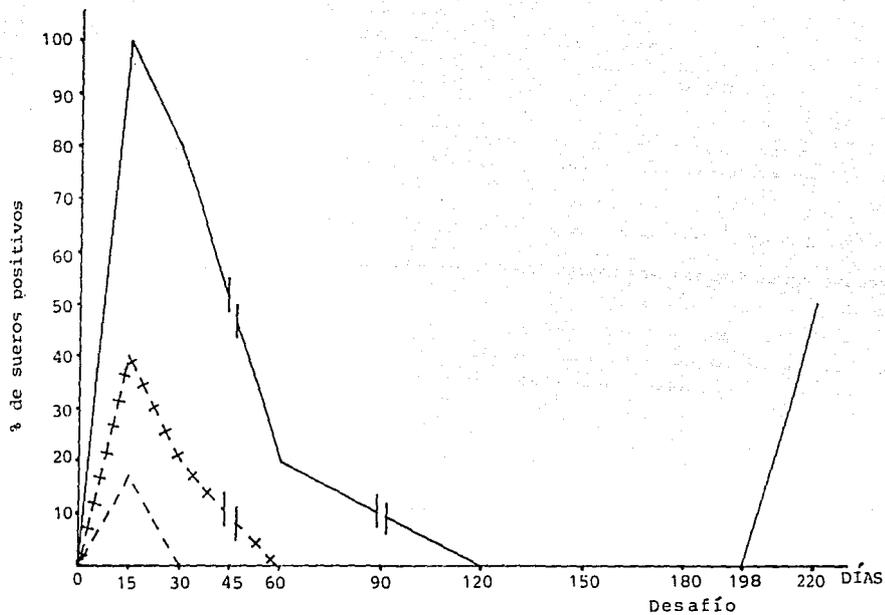
TRATAMIENTOS	<u>1 x 10⁹</u>			<u>1 x 10⁵</u>			<u>5 x 10³</u>			<u>Testigo</u>		
DÍAS	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30
T	0	100	86	0	18	27	0	0	0	0	0	0
DD	0	100	14	0	18	73	0	10	60	0	0	0
AT	0	100	71	0	9	0	0	0	0	0	0	0
ME	0	86	100	0	0	18	0	0	0	0	0	0
FC	0	86	100	0	18	0	0	0	0	0	0	0

T.- Tarjeta; DD.- Doble difusión en gel; IDR.- Inmunodifusión radial; AT.- Aglutinación en tubo; ME.-Aglutinación con mercaptoetanol; FC.- Fijación de Complemento.



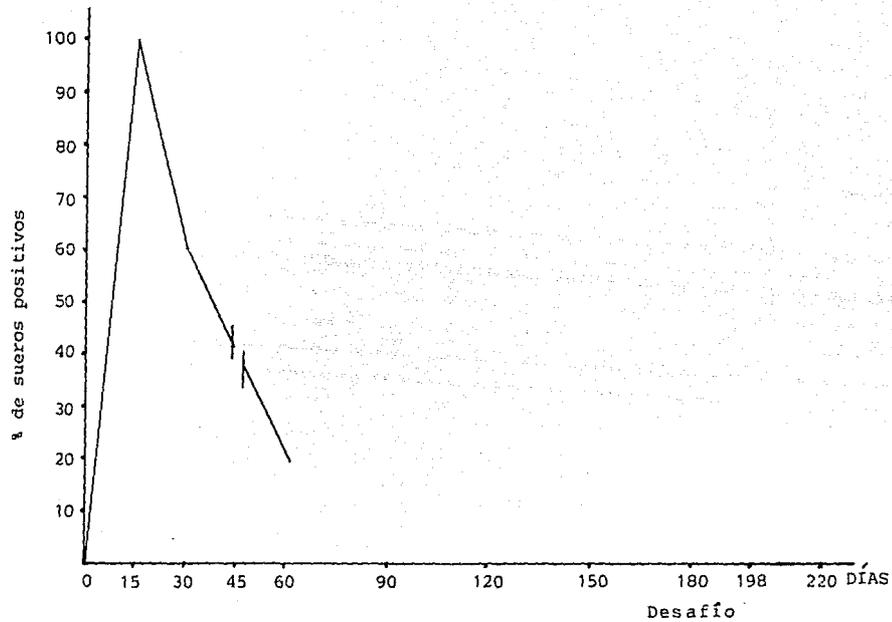
Gráfica 1. Resultados serológicos en la prueba de tarjeta de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.

——— 1x10⁹ ++++ 5x10³
 - - - - 1x10⁵ Testigo



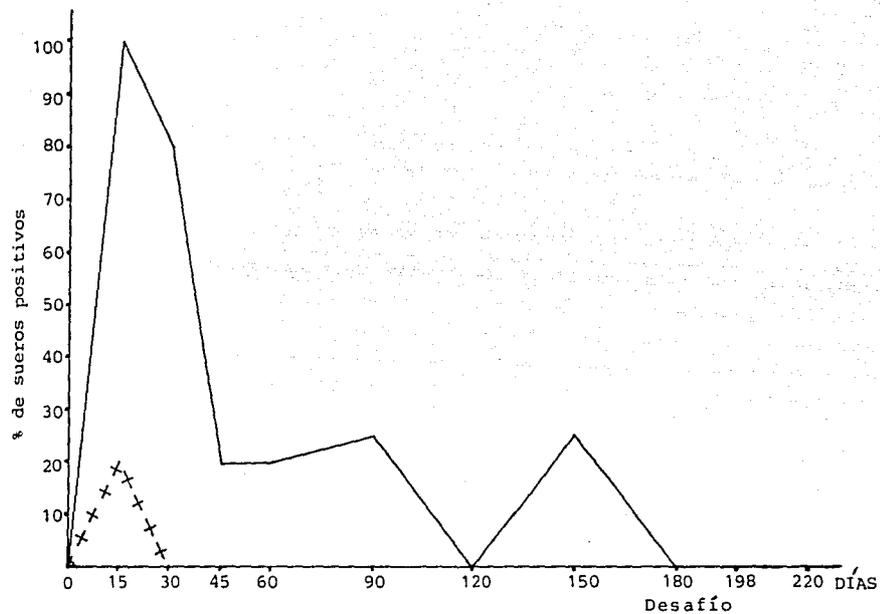
Gráfica 2. Resultados serológicos en la prueba de doble difusión en gel de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.

———— 1×10^9 + + + 5×10^3
 - - - - 1×10^5 Testigo



Gráfica 3. Resultados serológicos en la prueba de inmunodifusión radial de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.

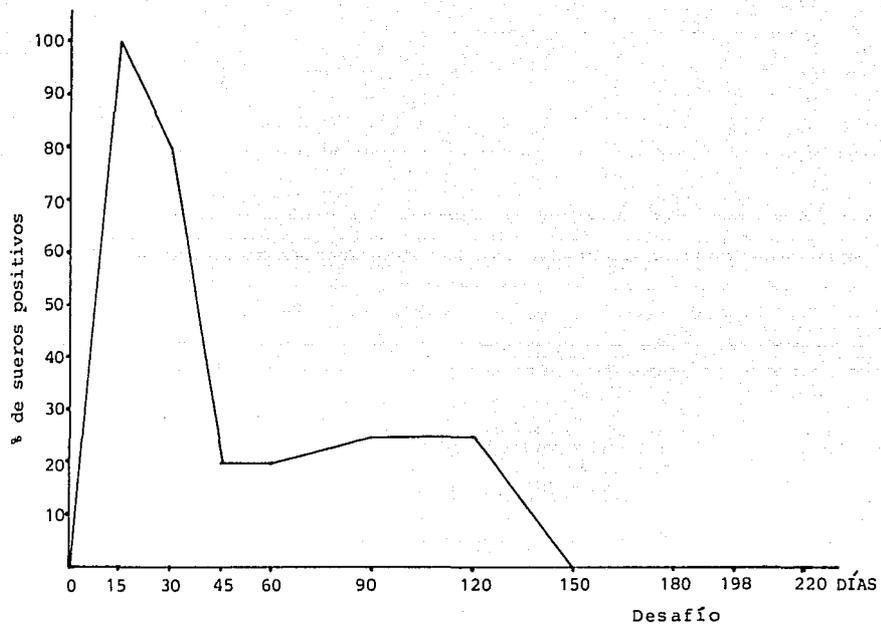
—	1×10^9	+++	5×10^3
- - -	1×10^5	Testigo



Gráfica. 4. Resultados serológicos en la prueba de aglutinación en tubo de los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.

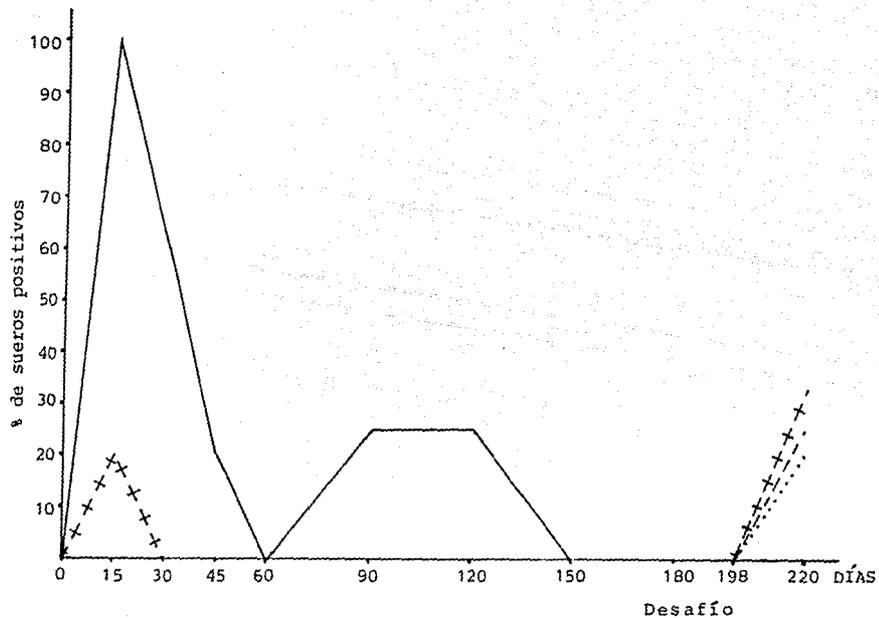
— 1x10⁹
 - - - 1x10⁵

+ + + 5x10³
 Testigo



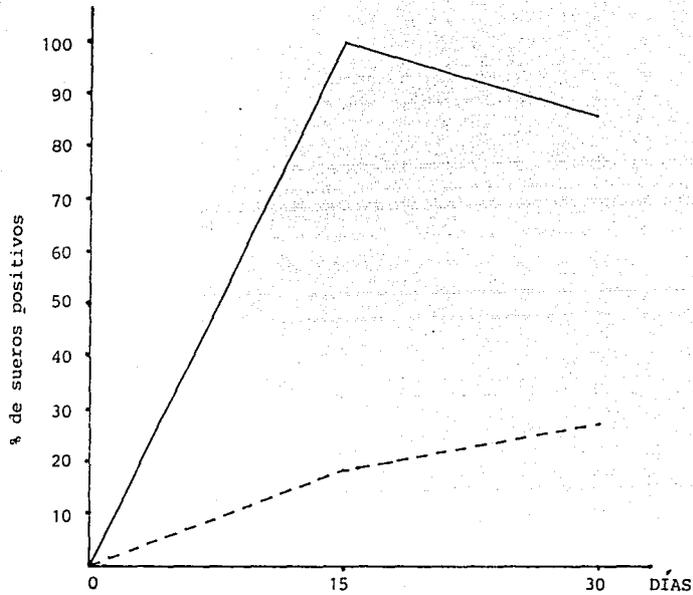
Gráfica 5. Resultados serológicos en la prueba de aglutinación con mercaptoetanol en los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.

————— 1×10^9 + + + 5×10^3
 - - - - - 1×10^5 Testigo



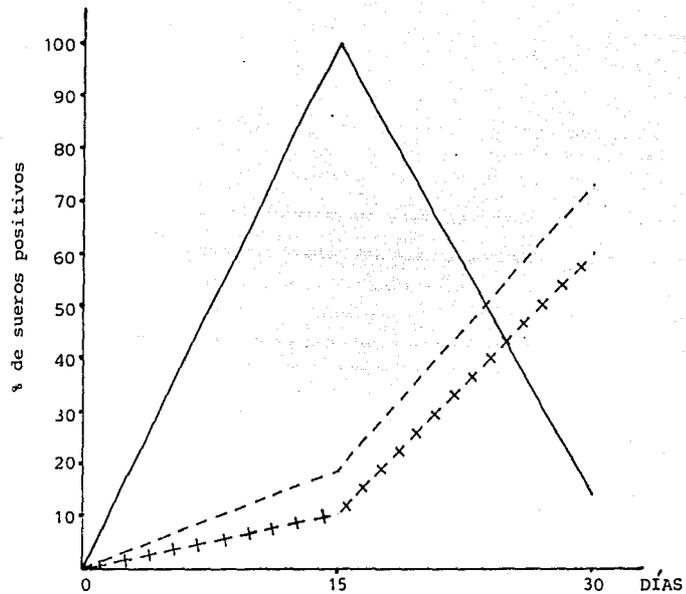
Gráfica 6. Resultados serológicos en la prueba de fijación de complemento en los diferentes grupos de animales mantenidos en confinamiento.

————— 1×10^9 + + + 5×10^3
 - - - - - 1×10^5 Testigo



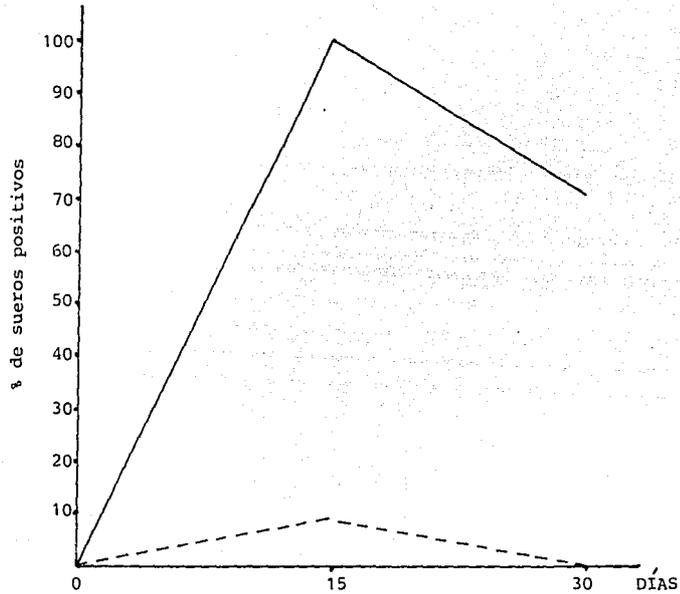
Gráfica 7. Resultados serológicos en la prueba de tarjeta de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.

—————	1×10^9	+++	5×10^3
- - - - -	1×10^5	Testigo



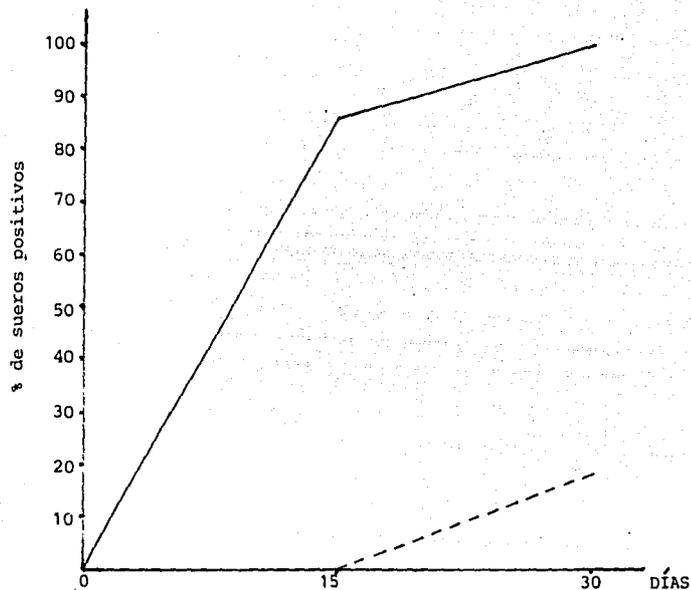
Gráfica 8. Resultados serológicos en la prueba de doble difusión en gel de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.

————— 1×10^9
 - - - - - 1×10^5
 + + + 5×10^3
 Testigo



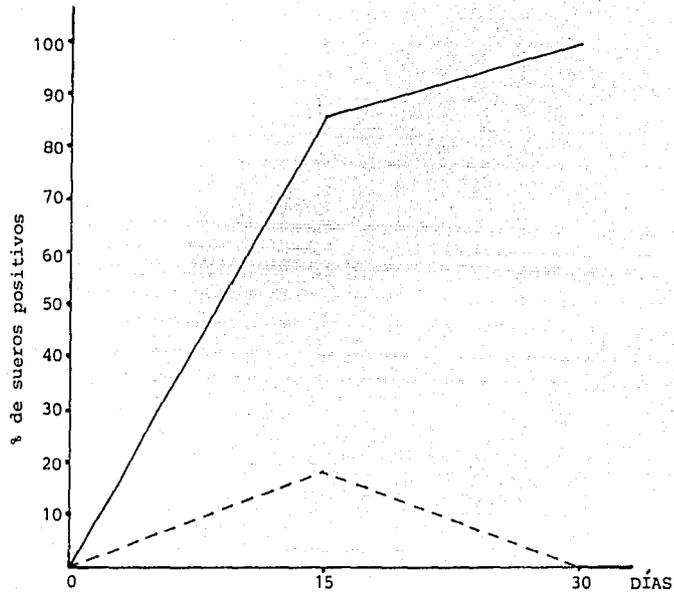
Gráfica 9. Resultados serológicos en la prueba de aglutinación en tubo de los diferentes grupos de animales en su propio hato.

—	1x10 ⁹	+++	5x10 ³
- - -	1x10 ⁵	Testigo



Gráfica 10. Resultados serológicos en la prueba de aglutinación con mercaptoetanol de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.

————— 1×10^9 + + + 5×10^3
 - - - - - 1×10^5 Testigo



Gráfica 11. Resultados serológicos en la prueba de fijación de complemento de los diferentes grupos de animales mantenidos en su propio hato.

——— $1 \times 10^9 / 5$ + + + 5×10^3
 - - - 1×10^3 Testigo

A P É N D I C E 2

DESCRIPCIÓN DE LAS UNIDADES DE AISLAMIENTO Y APLICACIÓN DE LAS NORMAS

DE SEGURIDAD REQUERIDAS PARA EL PROYECTO DE DESAFÍO DE

CAPRINOS CON Brucella melitensis.

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
1.- Descripción de las instalaciones	47
2.- Circulación de aire	51
3.- Eliminación de desechos y desinfección	51
4.- Personal	52
5.- Equipo auxiliar utilizado dentro de las instalaciones	53

El llevar a cabo un desafío para probar algún biológico desarrollado, requiere de un cuidado extremo, especialmente en casos como el presente en que se utilizaron microorganismos que pueden infectar al humano. Esta parte del trabajo, se refiere a la descripción de las labores de adaptación y aplicación de las medidas sanitarias necesarias en las unidades de aislamiento que albergarían a los caprinos vacunados y posteriormente desafiados, así como las actividades del personal que se ocupó del mantenimiento de los animales.

1.- Descripción de las instalaciones.

La distribución dentro de las instalaciones se muestra en el plano No. 1, estas cuentan con diez corraletas las cuales tienen una extensión de 4 X 4 mts. y se encuentran totalmente separadas una de otra con acceso del personal por dos diferentes sitios, uno de ellos es una puerta que comunica con el pasillo exterior y el otro comunica al pasillo interior por medio de una doble puerta, ambas metálicas, pero la segunda con vidrio para observación. Entre estas dos últimas puertas existe un espacio de 1.3 X 1.3 mts. aproximadamente en el cual se encuentra un lavabo, una toma de agua y una lámpara germicida; el piso es de cemento y las paredes de ladrillos.

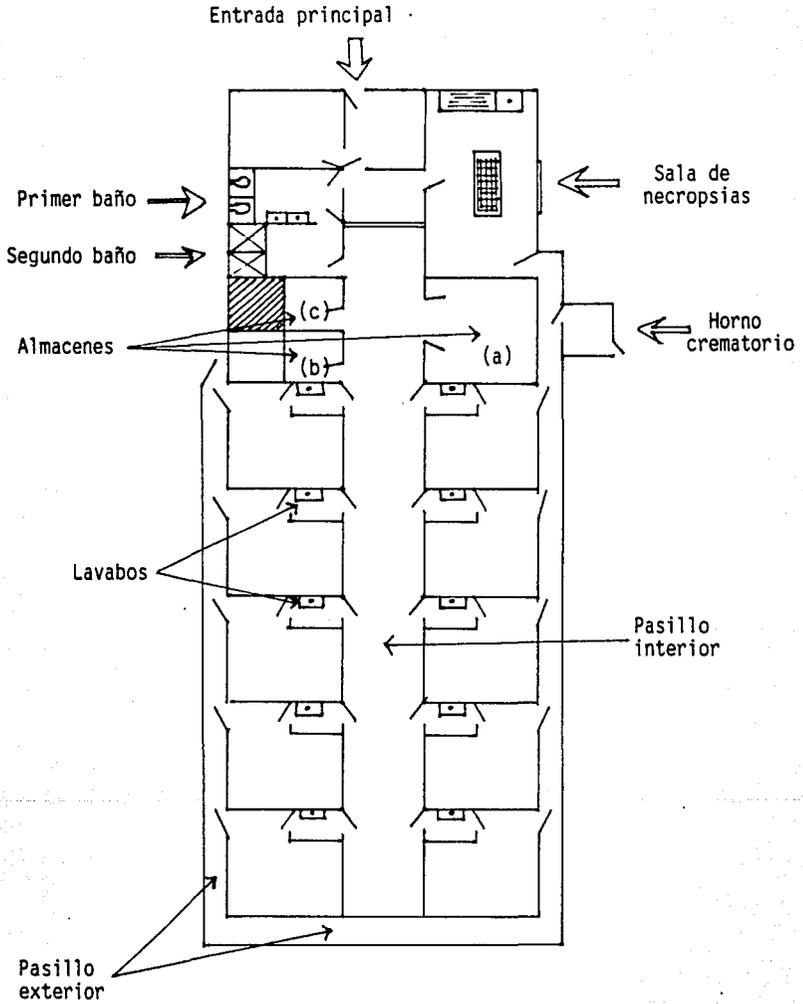
Alrededor de los cuartos existe un pasillo denominado exterior, el cual se comunica en un extremo con el exterior de las instalaciones a través de una puerta y en el otro con el horno crematorio y con una de las entradas a la sala de necropsias.

En el centro y a todo lo largo -partiendo las instalaciones en dos partes- existe un pasillo denominado interior, el cual está cerrado en uno de sus extremos y comunica con la puerta principal por el otro, en este se instalaron tapetes sanitarios a la entrada de cada corraleta para desinfección del calzado del personal.

El horno crematorio cuenta con un quemador de diesel y se comunica con las instalaciones por el pasillo exterior a través de una puerta por la que se eliminaron los desechos sólidos de las instalaciones por incineración.



Plano 1
Unidades de aislamiento del INIFAP



Las instalaciones cuentan con una sala de necropsias en la cual se tiene una mesa de trabajo y un lavabo, estando cubierta en su totalidad con azulejo para facilitar su lavado; esta sala tiene tres entradas, una por la puerta principal, otra por la parte externa de las instalaciones y la tercera que comunica al pasillo exterior.

Dentro de las instalaciones también se tienen tres almacenes, el más grande (a) se destinó al alimento y los dos restantes (b y c) al equipo y material de uso diario. Junto a estos almacenes se tienen dos baños, en el primero se encuentran los retretes y lavabos y en el segundo las regaderas para el personal.

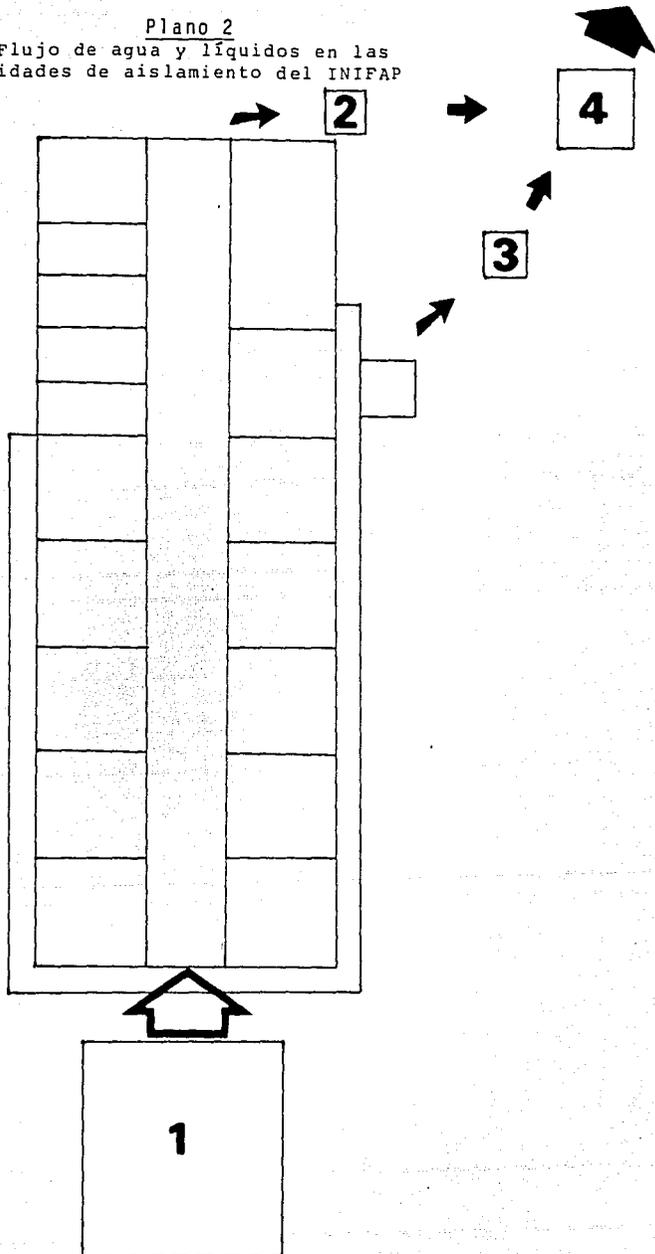
La entrada principal consta de tres puertas, la primera al exterior, la segunda que comunica al primer baño y a la sala de necropsias y la tercera que comunica directamente al pasillo interior.

En las instalaciones se tienen cuatro cisternas, dos de cemento y dos de fibra de vidrio (plano 2). La primera (1) suministra el agua que se utiliza en las instalaciones, las dos de fibra de vidrio retienen todos los líquidos que se eliminan de éstas (2 y 3), permitiendo que en la cuarta cisterna (4) se realice la desinfección de estos líquidos antes de ser eliminados.

Cabe mencionar que se requirió de tiempo y dinero para poder acondicionar estas instalaciones, habiendo realizado también:

- Instalación de cristales.
- Sellado con silicón de todos los vidrios tanto externos como internos.
- Instalación de accesorios faltantes, tales como contactos, lámparas, muebles de baño, chapas, etc.
- Compra e instalación de cisternas receptoras de líquidos de desecho a base de fibra de vidrio.
- Inclusión de dos extintores.
- Adaptación de cespols en cada corraleta para evitar el paso de estiércol y materiales sólidos al desagüe.
- Reconstrucción del horno crematorio con ladrillo aislante y arreglo del quemador.

Plano 2
Flujo de agua y líquidos en las
unidades de aislamiento del INIFAP



2.- Circulación de aire.

La circulación de aire de las instalaciones se realiza por medio de un extractor y un inyector, habiéndose estudiado y adaptado este sistema por una compañía especializada, lo cual garantizó su correcto funcionamiento y efectividad.

a) Extracción de aire.

Dentro de cada corraleta y en la sala de necropsias existe una salida de aire, éstas se juntan y desembocan a un filtro de malla que retiene basuras, luego a un filtro de bolsa que retiene partículas grandes y a un filtro absoluto, el cual retiene partículas pequeñas y las bacterias que se encuentren en el aire, posteriormente se envía el aire al exterior. Cada uno de los filtros antes mencionados, puede ser reemplazado periódicamente para garantizar la efectividad del sistema.

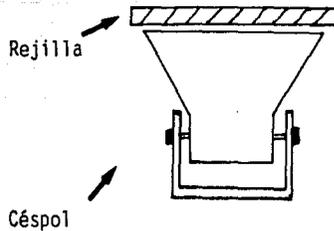
b) Inyección de aire.

El aire se introduce a las unidades por medio de un inyector y se transporta por ductos, los cuales tienen diferentes salidas a los pasillos interior y exterior. Asimismo se adaptaron rejillas a las puertas que tienen acceso al pasillo interior para permitir un mejor flujo de aire. Con el propósito de evitar la inyección de aire frío en las épocas invernales, se instaló un sistema de calentamiento a base de resistencias para que el medio ambiente se conserve templado.

Es importante mencionar que ambos sistemas se complementan y para garantizar que el aire de las instalaciones no escapara por presión positiva, al sistema se le determinó una mayor presión negativa.

3.- Eliminación de desechos y desinfección.

La eliminación de líquidos tales como agua, orina, etc. se realizó por las tuberías de las instalaciones hacia las cisternas de fibra de vidrio y luego a la cisterna de desinfección. En la coladera de cada corraleta se instaló una rejilla de solera y un céspol de fibra de vidrio los cuales impidieron que el material sólido, como alimento, cama, estiércol y otros obstruyeran los ductos del desagüe. La cisterna de desinfección permitió el tratamiento de estos líquidos antes de ser eliminados.



Vista lateral de
rejilla y céspol

La eliminación de estiércol y material sólido, se hizo por medio de bolsas grandes y gruesas de plástico, evitando así el escurrimiento o diseminación de este material fuera de los cuartos, llevándose al horno crematorio donde fue incinerado.

Los cuartos fueron encalados antes y después de realizar el trabajo, previa limpieza con agua y jabón.

Las tuberías de eliminación de líquidos así como todos los aditamentos, herramientas, comederos, bebederos, etc. fueron desinfectados con sosa cáustica al 3% (53). El sistema de ventilación y techos de las instalaciones se desinfectaron con gas tóxico, producido por la unión de permanganato de potasio y formaldehído (53).

Los overoles, toallas y gorros que se utilizaron dentro de las instalaciones, eran sacados en bolsas de papel selladas para ser esterilizados por autoclave (15 libras de presión durante 45 minutos) y posteriormente lavados para ser reutilizados.

Todos los animales requeridos en el trabajo fueron incinerados después del sacrificio.

4.- Personal.

No se permitió la entrada de ninguna persona que no estuviera relacionada con el desarrollo del experimento (sólo investigadores);

éstos, se bañaban tanto al entrar como al salir de las instalaciones para evitar la entrada de gérmenes extraños o la salida de la cepa de desaffo.

Durante toda la duración del experimento, se mantuvo un botiquín para primeros auxilios en el interior de las instalaciones, así como soluciones desinfectantes para la piel y neutralizadoras de los desinfectantes utilizados en el equipo para los casos de contacto directo con la piel del personal.

El trabajo desarrollado diariamente por los investigadores consistió en realizar la limpieza de las corraletas, dar alimento y agua a los animales y verificar el buen estado de salud de los mismos; así como también realizar los sangrados y actividades incluídas en el proyecto de investigación.

5.- Equipo auxiliar utilizado dentro de las instalaciones.

- Carretillas, palas, bieldos, escobas y cepillos.
- Bolsas de papel y plástico gruesas.
- Toallas de baño y jabones.
- Soluciones desinfectantes y antagónicas de las mismas.
- Botiquín de primeros auxilios.
- Botiquín veterinario.
- Indumentaria de seguridad: Overoles, botas, guantes, gorros, cubrebocas desechables, lentes protectores y caretas plásticas transparentes.
- Tres recipientes grandes de fibra de vidrio.

Los tres recipientes se colocaron en el segundo baño, permaneciendo uno con solución desinfectante para sumergir el equipo de seguridad de plástico y los otros dos para escurrir dicho equipo después de enjuagarse con agua corriente.

LITERATURA CITADA

- 1.- Alton, G.G.: Vaccination of goats with reduced doses of Rev. 1 Brucella melitensis vaccine. Res. vet. Sci., 11: 54-59 (1970).
- 2.- Alton, G.G.: Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. Aust. vet. J., 54: 551-557 (1978).
- 3.- Alton, G.G., Corner, L.A. and Plackett, P: Vaccination of pregnant cows with low doses of Brucella abortus strain 19 vaccine. Aust. vet. J., 56: 369-372 (1980).
- 4.- Alton, G.G. and Elberg, S.S: Rev. 1 Brucella melitensis vaccine. A review of ten years of study. Vet. Bull., 37: 793-800 (1967).
- 5.- Alton, G.G., Jones, L.M., García-Carrillo, C. and Trenchi, A.: Brucella melitensis Rev. 1 and Brucella abortus 45/20 vaccines in goats: Immunity. Am. J. vet. Res., 33: 1747-1751 (1972).
- 6.- Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E.: Las Técnicas de Laboratorios en la Brucelosis. 2a. ed. FAO-OMS. Ginebra (1976).
- 7.- Baer, G.M., Flores, C.R., Cortés, N.A. y Morales, S.H: Comparación de la efectividad de dos vacunas atenuadas contra la brucelosis caprina. Téc. Pec. Méx., 17: 30-37 (1971).
8. Berman, D.T. and Jones, L.M.: Radial immunodiffusion-- A confirmatory test for bovine brucellosis. Proceedings 83rd. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc. San Diego, California, 1979. 118-127. California (1979).
- 9.- Calcedo, V.O.: Aspecto económico de la brucelosis. 1er. Simposium Nacional de Brucelosis, Segovia, 1968. España (1968). Referido por Ciprián, C.A.: Repercusión económica de la brucelosis en México. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. México, D.F., 1978. 76-83. México (1978).
- 10.- Campaire, C. y Gracia, C.: El problema de la brucelosis bovina. 1er. Simposium Nacional de Brucelosis. Segovia, 1968. España (1968). Referido por Ciprián, C.A.: Repercusión económica de la brucelosis en México. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. México, D.F., 1978. 76-83. México (1978).
- 11.- Carter, G.R: Brucellosis. In: Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Edited by: Carter, G.R. 255-263. Michigan State University Press. Michigan, 1982.

- 12.-Casas-Olascoaga, R.: Diagnóstico serológico de la brucelosis. Boletín Zoonosis, XVIII: 107-141 (1976).
- 13.-Casillas, F.M.A.: Impacto de la brucelosis en la salud pública en México. Memorias del II Foro Nacional sobre Brucelosis. México, D.F., 1988. México (1988).
- 14.-Casillas, F.M.A. y Garza, R.J.: Datos no publicados y recopilados durante varios años por ambos investigadores de las siguientes fuentes: Dirección General de Epidemiología, S.S.A.; Dirección de Estadística e Información Pecuaria, S.A.R.H.; Dirección General de Fomento y Protección Pecuaria, S.A.R.H.; Informe semanal de casos nuevos (Epi-1-79), D.G.E., S.S.A. y Boletín Mensual de Epidemiología, S.S.A. (1990).
- 15.-Ciprián, C.A., Mancera, M.A. Flores, C.R. y Ramírez, P.C.: Serodiagnóstico en Brucelosis. En: Manual de Inmunología. Editado por Morilla, G.A. y Bautista, G.R. 193-227. Editorial Diana. México, 1986.
- 16.-Cortés, M.L.M., Díaz, A.E., Cuéllar, O.A. y Vázquez, N.J.: Empleo del polisacárido-B, en la diferenciación temprana de ovejas vacunadas con Rev. 1. Resúmenes de la XI Reunión ALPA. La Habana, Cuba, 1988. Cuba (1988).
- 17.-Cortés, M.L.M., Díaz, A.E., Vázquez, N.J. y Ontiveros, C.L.: Comparación de tres cepas de Brucella melitensis para la obtención de antígeno polisacárido-B, utilizado en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Téc. Pec. Méx., 25: 155-162 (1987).
- 18.-Crawford, R.P., Heck, F.C. and Williams, J.D.: Experiences with Brucella abortus strain 19 vaccine in adult texas cattle. J. Am. vet. med. Ass., 173: 1457-1461 (1978).
- 19.-Davies, G., Cocks, E. and Hebert, N.: Brucella abortus (strain 19) vaccine: (a) Determination of the minimum protective dose in cattle; (b) The effect of vaccinating calves previously inoculated with anti-Brucella abortus serum. J. biol. Standardization, 8: 165-175 (1980).

- 20.-Deyoe, B.L., Dorsey, T.A., Meredith, K.B. and Garrett, L. Effect: of reduced dosages of Brucella abortus strain 19 in cattle vaccinated as yearlings. Proceedings 83rd. Annu. Meet., US Anim. Health Assoc. San Diego, California, 1979. 92-104. California (1979).
- 21.-Díaz, A.E.: Inmunidad conferida por la vacunación y revacunación con rev 1 en dosis reducida en cabras adultas y evaluación de pruebas serodiagnósticas. Tesis de maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
- 22.-Díaz, R., Garatea, P., Jones, L.M. and Moriyon, P.: Radial immunodiffusion test with a Brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. J. Clin. Microbiol., 10: 37-41 (1979).
- 23.-Díaz, A.E., Mancera, M.A., Cortés, M.L.M., Vázquez, N.J. y Suárez, G.F.: Uso del polisacárido-B en la diferenciación de anticuerpos vacunales de rev-1 en caprinos. Resúmenes de la XI Reunión ALPA, La Habana, Cuba, 1988. Cuba (1988).
- 24.-Díaz, A.E., Prado, A.F., Ontiveros, C.L. y Batalla, C.D.: Evaluación serológica de anticuerpos posvacunales en cabras adultas, vacunadas con una dosis reducida (5×10^{-6}) de rev.1 en una zona enzoótica de brucelosis. Téc. Pec. Méx., 47: 137-141 (1984).
- 25.-Díaz, R., Toyos, J., Salvo, M.D. and Pardo, M.L.: A simple method for the extraction of polysaccharide B from Brucella cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. Ann. Rech. Vét., 12: 35-39 (1981).
- 26.-Elberg, S.S: A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. VPH/ 81.31 Rev. 1. WHO (1981).
- 27.-Elberg, S.S: Rev. 1 Brucella melitensis vaccine. Part II 1968-1980 Vet. Bull., 51: 67-73 (1981).
- 28.-Elberg, S.S. and Faunce, W.K.: J. Bacteriol., 73: 211-217 (1957). Referido por Alton, G.G. and Elberg, S.S.: Rev. 1 Brucella

- melitensis vaccine. A review of ten years of study. Vet. Bull., 37: 793-800 (1967).
- 29.-Escárzaga, E.: Brucelosis: Algunos aspectos de la infección en humanos. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. México, D.F., 1978. 47-59. México (1978).
- 30.-Escobar, G.A.: Atlas de Bacteriología. Galo Editores. México, 1987.
- 31.-FAO-OMS. Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Quinto Informe. OMS. Serie de informes técnicos No. 464. Ginebra (1970).
- 32.-FAO-OMS. Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Sexto Informe. OMS. Serie de informes técnicos No. 740. Ginebra (1986).
- 33.-Fensterbank, R. and Plommet, M.: Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. IV. Comparison between two methods of vaccination. Ann. Rech. Vet., 10: 131-139 (1979).
- 34.-Flores, C.R. and Baer, G.M.: Brucellosis (B. melitensis) Zoonotic Implications. In: CRC- Handbook series in zoonoses. Edited by: Steele, H., CRC Press, Florida, 1979.
- 35.-Flores, C.R., Higuera, J.A., Mancera, M.A., Villa, A. y Ruíz, R.: Estudios sobre la vacunación de vacas adultas con cepa 19 de Brucella abortus, en dosis reducidas. Memorias de la Reunión Anual, Area Médica, del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH. México, D.F., 1979. 11. México (1979).
- 36.-García-Carrillo, C. y Trenchi, A.: Estudio comparativo de la inmunidad conferida a cobayos por varios tipos de vacunas antibrucélicas. Rev. Med. vet., 55: 3-12 (1974).
- 37.-Gual, N.L.F.: Programas oficiales para el control de la brucelosis en México. Memorias del II Foro Nacional sobre Brucelosis. México, D.F., 1988. México (1988).
- 38.-Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A: Manual de Microbiología Médica. El Manual Moderno. México, 1979.
- 39.-Jones, L.M., Berman, D.T., Moreno, E., Deyoe, B.L., Gilsdorf, M.J., Huber, J.D. and Nicoletti, P.: Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol., 12: 753-760 (1980).

- 40.-Jones, L.M., García-Carrillo, C. and Alton, G.G.: Brucella melitensis rev.1 and Brucella abortus 45/20 vaccines in goats: Serologic tests. Am. J. vet. Res., 34: 199-202 (1973).
- 41.-Juárez, P.V.M: Empleo de antígenos solubles de Brucella melitensis y Brucella abortus para diferenciar bovinos infectados de vacunados, utilizando la prueba de inmunodifusión doble. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1982.
- 42.-Kuzdas, C.D. and Morse, E.V.: A selective medium for the isolation of brucellae from contaminated materials. J. Bacteriol., 66: 502-504 (1953).
- 43.-Miles, A.A. and Misra, S.S.: J. Hyg. (Lond.) 38: 732 (1938). Referidos por Alton, G.G., Jones, L.M. y Pietz, D.E.: Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. 2a. ed. FAO-OMS. Ginebra (1976).
- 44.-Morgan, W.J.B.: Brucellosis. In: Section E. Diseases of dairy cattle. Reviews of the progress of Dairy Science. J. Dairy Res., 37: 303-360 (1970).
- 45.-Myers, D.M.: Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by Brucella ovis. Appl. Microbiol., 26: 855-857 (1973).
- 46.-Myers, D.M. and Siniuk, A.A: Preliminary report on the development of a diffusion-in-gel method for the diagnosis of ram epididymitis. Appl. Microbiol., 19: 335-337 (1970).
- 47.-Myers, D.M., Varela-Díaz, V.M. and Coltorti, E.A.: Comparative sensitivity of gel-diffusion and tube agglutination tests for the detection of Brucella canis antibodies in experimentally infected dogs. Appl. Microbiol., 28: 1-4 (1974).
- 48.-Nicoletti, P: A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dairy herds in Florida. Proceedings 80th. Annu. Meet., US Anim. Health Assoc. Miami Beach, Florida, 1976. 91-106. Florida (1976).
- 49.-Nicoletti, P.: Diagnóstico de brucelosis: Algunos problemas y nuevos descubrimientos. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. México, D.F., 1978. 67-69. México (1978).

- 50.-Nicoletti, P., Jones, L.M. and Berman, D.T: Adult vaccination with standard and reduced doses of Brucella abortus strain 19 vaccine in a dairy herd infected with brucellosis. J. Am. vet. med. Ass., 173: 1445-1449 (1978).
- 51.-Nicoletti, P., Jones, L.M. and Berman, D.T.; Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Brucella abortus strain 19 vaccine in adult cattle. J. Am. vet. med. Ass., 173: 1450-1456 (1978).
- 52.-Ontiveros, C.L. y Tenorio, G.V.: Avances en la utilización de la prueba de inmunodifusión radial con un antígeno polisacárido B de Brucella melitensis cepa rev.1 para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F., 1984. 177. México (1984).
- 53.-Principios de desinfección. Dirección Nacional de Epizootiología. Instituto Nacional de Medicina Veterinaria. La Habana, Cuba. S/F.
- 54.-Rodríguez, H.G.: Epizootiología de la brucelosis. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. México, D.F., 1978. 10-39. México (1978).
- 55.-Rodríguez, L.S.V.: Estudios sobre un antígeno polisacárido de Brucella y aspectos epizootiológicos de brucelosis en el chigüire (Hydrochoerus hydrochaeris). Tesis de Maestría. FES- Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Edo. de México, 1981.
- 56.-Ruíz-Castañeda, M.: Brucelosis. Un Problema Universal. La Prensa Médica Mexicana. México, 1954.
- 57.-Sánchez-Mejorada, P.H.: Brucella melitensis. Memorias del II Foro Nacional sobre Brucelosis. México, D.F., 1988. México (1988).
- 58.-Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Programa especial de fomento a la ganadería 1990-1994. México (1990).
- 59.-Síntesis Ejecutiva. Programa de transición hacia la autosuficiencia lechera. México (1989).
- 60.-Schurig, G.G: The immune response of goats vaccinated with low and high doses of Brucella melitensis rev. 1. Vet. Immunol. Immunopathol., 3: 311-324 (1982).

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

- 61.-Suárez, G.F. y Flores, C.R.: Brucelosis en diferentes especies animales. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. México, D.F., 1978. 40-46. México (1978).
- 62.-United States Department of Agriculture. National Animal Diseases Laboratory. Diagnostic Reagents Division, Ames, Iowa. Diagnostic Reagents Manual No. 65 (1965).
- 63.-Varela-Díaz, V.M., Jones, L.M. and Pérez-Esandi, M.V.: Brucella melitensis rev.1 and Brucella abortus 45/20 vaccines in goats: Pattern of immunoglobulin production after vaccination and challenge. Am. J. vet. Res., 34: 203-207 (1973).
- 64.-Waghela, S., Wandera, J.G. and Wagner, G.G.: Comparison of four serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. Res. vet. Sci., 28: 168-171 (1980).