

PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA VACUNA RB51 DE *Brucella abortus* EN CABRAS EXPUESTAS A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Brucella melitensis*.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:
MEDICINA PREVENTIVA**

PRESENTADA POR:

M.V.Z. ALICIA SOBERÓN MOBARAK

DIRECTORES DE TESIS:

**M.V.Z. M. EN C. Ph. D. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
M.V.Z. M. EN C. Ph. D. EFRÉN DÍAZ APARICIO**

COASESOR:

M.V.Z. ANDRÉS DUCOING WATTY

MÉXICO, D.F.

1997.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Esta tesis será el recordatorio de una época muy triste en mi vida y quiero dedicársela con todo el amor posible a mi Madre quien ya no pudo esperarme para compartir juntas este momento. Donde quiera que te encuentres, sé que estarás muy orgullosa junto con mi papá, ya que tú, mejor que nadie conoces el esfuerzo realizado para lograr terminar esta pequeña obra. Es muy grande el vacío que dejaste. Te extraño mucho.

A mis adorados hermanos (Chucho, Evelyn y Paco) a los que quiero y admiro, y que espero nunca nos separemos y menos en estos momentos difíciles (incluyendo a Nieves y Pedro). A la Negrita, por su compañía. A toda mi familia (tíos, primos, sobrinos) ; a mi otra familia (Rolex, Profe y agregados). A Eli, por el aguante (con dedicatoria especial).

Dentro de la tristeza está la alegría de saber que tengo, además de una maravillosa familia, verdaderos amigos y más de los que pensaba. A todos ustedes, quienes me han brindado tanto amor, tanta solidaridad y tanto apoyo, nunca tendré palabras (ni espacio ahora) para agradecerles y expresarles mis sentimientos y en especial a Abel, Adriana, Ana, Andrés, Gaby, Erick, Hilario, Javier, Regina, Arturito, Pollo, Lorenzo, Paula y compañía. A Elisa y los etólogos. A Arturo Olguín y Miguelón. A los microbiólogos (Paco Suárez, Efrén, Daniel, Rigo, Ana Laura, Jesús, Laura Hdez., Edgar, Alfredo, Elvia, Beatriz, Héctor, Luis, Juan Manuel y a todo el equipo).

A todos los que laboran en el Depto. de Medicina Preventiva y que ayudaron a mi formación.

También dedico esta tesis con gran cariño y respeto a mis maestros y queridísimos amigos: Dr. Jorge Cárdenas y Dr. Raúl Vargas por las agradables pláticas, consejos y ayuda que siempre me han brindado en todo momento.

Y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo.....

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

**A mis asesores: Dr. Francisco Suárez G., Dr. Efrén Díaz A. y Dr. Andrés Ducoing W.
Por el tiempo, la paciencia y entusiasmo depositados en esta tesis.**

Al Departamento de Microbiología de la FMVZ,

**Al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria
(CENID),**

**Al Centro de Enseñanza, Prácticas, Investigación y Extensión en Rumiantes
(CEPIER),**

Al Departamento de Medicina Preventiva de la FMVZ,

Al Departamento de Reproducción de la FMVZ,

A la División de Estudios de Posgrado de la FMVZ,

**Por el apoyo y facilidades brindadas para la realización de este trabajo.
GRACIAS**

A los miembros del Jurado:

**Dr. Raúl Vargas G.
Dra. Ahidé López M.
Dr. C. Julio Jaramillo
Dr. Francisco Suárez G.
Dr. Arturo Olguín y B.**

Por enriquecer este trabajo.

RESUMEN

SOBERÓN MOBARAK ALICIA. Protección conferida por la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en cabras expuestas a la infección experimental por *Brucella melitensis*. (Asesorado por: MVZ. M. en C. Ph. D. Francisco Suárez Güemes, MVZ. M. en C. Ph. D. Efrén Díaz Aparicio y MVZ. Andrés Ducoing Watty).

La brucelosis caprina causada por *Brucella melitensis* es una de las zoonosis más importantes por los casos humanos que genera y por las pérdidas económicas que causa a la ganadería nacional. La vacuna actualmente utilizada es la Rev-1 que dentro de sus principales inconvenientes incluye el de producir anticuerpos que interfieren en las pruebas serodiagnósticas comunes. Se empezaron a buscar otro tipo de inmunógenos y surgió la cepa mutante RB51 de *B. abortus* la cual carece de la cadena "O" del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa y que ha sido ampliamente probada en ganado bovino pero su eficacia ha sido poco estudiada en caprinos. El objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad protectora de la vacuna RB51 en cabras desafiadas experimentalmente con una cepa de campo virulenta de *Brucella melitensis*. Se utilizaron 25 cabras adultas, libres de brucela y nunca vacunadas, 10 de ellas gestantes. Se dividieron aleatoriamente en dos grupos, el Grupo I (7 gestantes y 8 vacías) fue vacunado con 4×10^7 unidades formadoras de colonias (u f c) de la cepa RB51 de *B. abortus* por vía subcutánea y Grupo II o no vacunado (3 gestantes y 7 vacías) con solución salina estéril. Todas las cabras se infectaron experimentalmente en dos ocasiones (al día 53 y al día 118 posvacunación) con una cepa de campo de *Brucella melitensis* biovariedad 1 (9×10^5 u f c por vía conjuntival). Se colectaron muestras sanguíneas para análisis serológicos con la prueba de ELISA indirecta con antígeno rugoso y prueba de tarjeta al 3% con antígeno liso. A los 168 días posvacunación las cabras fueron sacrificadas humanitariamente y se colectaron muestras de linfonodos (submandibular, preescapular y retromamario), bazo, útero y glándula mamaria para cultivo bacteriológico. Las colonias sospechosas de *Brucella* se sometieron a pruebas bioquímicas y de fagotipificación. Los resultados indican que la cepa de desafío se recuperó en el 60% de los animales del grupo control y en 6.6% del grupo vacunado ($p < 0.01$) y la cepa vacunal no se recuperó en ninguno de ellos. La cepa de desafío estuvo presente en los linfonodos submandibulares del 100% de los animales con aislamiento positivo, en bazo en el 33.3% y en el resto de los órganos analizados en el 16.6%. Ninguna de las cabras gestantes abortó. En la prueba de tarjeta al 3% con antígeno liso la seroconversión apareció hasta el día 7 después del segundo desafío en el 48% de los animales y no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en los porcentajes de seropositividad entre los grupos. En el ELISA indirecto con antígeno rugoso se observó que el promedio de densidades ópticas obtenido fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en el grupo vacunado que en el control. Los resultados de este trabajo indican que el 93% de las cabras vacunadas no se infectaron con la cepa de desafío, la vacuna no ocasionó aborto y no indujo la formación de anticuerpos evidenciables a través de la prueba de tarjeta y los anticuerpos producidos se detectaron por la prueba de ELISA indirecta con antígeno de captura rugoso. Estas características hacen que la vacuna RB51 contra la brucelosis caprina muestre ventajas sobre la Rev-1, señalándola como una posible alternativa de vacunación contra esta enfermedad aunque se considera necesario realizar más estudios dirigidos a evaluar la duración de la inmunidad conferida por esta vacuna.

Palabras clave: Brucelosis caprina, RB51, Rev-1

ÍNDICE

Resumen	
CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Antecedentes históricos.....	1
1.2 Situación de la brucelosis humana en México.....	2
1.3 Situación de la brucelosis caprina en México.....	3
1.4 Medidas de control y prevención a nivel nacional.....	5
1.5 Vacunación.....	6
1.5.1 Vacuna cepa Rev 1.....	6
1.5.2 Desarrollo de nuevas vacunas.....	6
1.5.3 Vacuna cepa RB51.....	9
2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Animales.....	13
2.2 Vacunación.....	14
2.3 Obtención de muestras sanguíneas.....	14
2.4 Desafío.....	14
2.5 Necropsia y obtención de muestras.....	15
2.6 Estudio bacteriológico.....	15
2.6.1 Procesamiento de órganos.....	16
2.7 Estudio serológico.....	17
2.7.1 Prueba de tarjeta al 3%.....	17
2.7.2 Prueba de ELISA indirecta.....	17
2.7.2.1 Estandarización de ELISA.....	17
2.7.2.2 Antígeno: preparación y pegado.....	17
2.7.2.3 Sueros.....	18
2.7.2.4 Conjugado.....	18
2.7.2.5 Sustrato y lectura de ELISA.....	18
2.8 Análisis estadístico.....	19
3. RESULTADOS	
3.1 Estudio bacteriológico.....	20
3.2 Lesiones macroscópicas.....	20
3.3 Abortos.....	21
3.4 Estudios serológicos.....	21
3.4.1 Prueba de tarjeta al 3%.....	21
3.4.2 Prueba de ELISA indirecta.....	22
4. DISCUSIÓN.....	23
5. CONCLUSIONES.....	36
6. LITERATURA CITADA.....	37
7. CUADROS Y FIGURAS.....	46

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos.- La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial del grupo de las zoonosis que afecta a la mayoría de los animales domésticos, particularmente ganado caprino, bovino, porcino y ovino y que en determinadas circunstancias el humano puede actuar como huésped accidental (FAO/OMS, 1986; Acha y Szyfres, 1986; García, 1987). No solamente por su significación desde el punto de vista médico sino por las graves pérdidas económicas que resiente la industria ganadera, esta infección constituye un problema de carácter general, cuya gravedad ha ido en aumento debido a la poca importancia que se le da en muchos países (López, 1991).

Se cree que esta enfermedad era ya conocida desde los tiempos de Hipócrates, 400 años antes de Cristo, pero las primeras descripciones claras del padecimiento fueron hechas por Cleghorn en 1751. Posteriormente durante la guerra de Crimea (1854-1856) se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas en los soldados las cuales eran cada vez más frecuentes en los países mediterráneos, principalmente en la isla de Malta. El agente causal fue aislado por David Bruce en 1886 a partir del bazo de personas muertas por esa infección y lo llamó *Micrococcus melitensis*. Sin embargo, tuvieron que transcurrir casi veinte años para que Zammit en 1905 determinara que las cabras eran la fuente de infección para los humanos a través del consumo de sus productos lácteos que se expendían sin paturizar ni hervir en la isla de Malta (Ruiz, 1986).

Dentro de los antecedentes históricos de la brucelosis humana en México el Doctor Castañeda (1986), en su obra menciona que en 1912, el Dr. Reséndiz en la ciudad de Querétaro relacionó la aparición de una enfermedad caracterizada por fiebre prolongada y remitente en varios pacientes que atendía con la importación de cabras murcianas al país en 1910. No fue sino hasta 1921 cuando Pláceres aisló al agente y confirmó la existencia de la enfermedad en México (Ruíz, 1986).

1.2 Situación de la brucelosis humana en México.- La brucelosis humana ha sido encontrada en la mayoría de los estados de la República Mexicana y en un estudio seroepidemiológico realizado por López *et al.* (1992) se reveló que la prevalencia global de brucelosis humana en México fue de 3.52% . Los datos de notificación oficial publicados en la Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la brucelosis en el hombre (NOM-022-SSA2-1994) indican que la morbilidad en México registró una tasa promedio de 6.9 casos por 100,000 habitantes en el periodo comprendido de 1988 a 1993, registrándose alrededor de 6,000 casos por año. Según el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, (1997), entre los años de 1994 a 1996 se notificaron 8714 casos de brucelosis humana y los estados de la República Mexicana más afectados por orden de importancia fueron: Guanajuato, Durango, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Michoacán, Puebla, Tamaulipas, México, Sonora, Jalisco y Veracruz.

En cuanto a la mortalidad en humanos por brucelosis, el promedio de defunciones registrado entre los años de 1991 a 1994 fue de 31. Se estimó que los casos anuales de brucelosis ocasionan gastos cercanos a \$1,000,000.00 de pesos sólo por concepto de diagnóstico y tratamiento inicial, sin cuantificar el costo social, laboral y las muertes que ocasiona (NOM-022-SSA2-1994). Estos datos se consideran subestimados en un 30% debido a la escasa notificación de la enfermedad principalmente en las zonas rurales en donde hay carencia de servicios médicos (Báez, 1995; Salman,1995).

1.3 Situación de la brucelosis caprina en México.- La brucelosis caprina causada por *Brucella melitensis* es considerada la más relevante en el país por el gran número de casos humanos que ocasiona, ya que además de ser la más patógena e invasiva para el humano, el ganado caprino se encuentra diseminado en todo el territorio nacional principalmente en forma de rebaños que se desplazan en áreas extensas en busca de alimento o como parte integral de actividades de “traspatio”(López, 1991). Si bien la *B. melitensis* afecta principalmente a caprinos y en grado variable a ovinos, es también fácilmente transmitida al ganado bovino que tiene contacto con esta especie. La importancia de la brucelosis en las cabras radica en las mermas económicas que ocasiona a través de la pérdida de cabritos y disminución en la producción láctea (Sánchez, 1988) ya que en 1994 y de acuerdo a los datos proporcionados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural y publicados en la NOM-022-SSA2-1994, se estimaron pérdidas anuales de cuatro millones de pesos sólo por concepto de abortos. Sin embargo, el mayor impacto resulta de

la enfermedad en el hombre por el alto costo en el tratamiento, la pérdida de horas de trabajo, costos de hospitalización y diagnóstico entre otros ya que afecta primordialmente a la población económicamente activa (López, 1991).

A pesar de lo anterior, a la brucelosis caprina no se le ha dado la atención que realmente merece y casi toda la atención ha sido dirigida hacia la enfermedad en el ganado bovino. Existe poca información actualizada sobre la situación de la enfermedad en el ganado caprino en México. Según los datos de la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CONETB), en 1994 se estimaron las siguientes tasas de prevalencia de brucelosis caprina en los estados de la República Mexicana :

Baja California Norte y Sur Sonora, Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Colima, Hidalgo, México, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo.	0.7 - 5.5 %
Chihuahua, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Guerrero, Michoacán, Morelos y Tlaxcala.	5.5 - 10.5 %
Durango y San Luis Potosí.	10.5 - 20.3 %
Oaxaca.	20.3 - 30.1 %
Veracruz y Puebla	30.1 - 40.0 %

Fuente: CONETB. 1991

De acuerdo a las cifras obtenidas en el Censo realizado en 1991 por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) el número

estimado de cabezas de ganado caprino fue aproximadamente de 6 millones y la cobertura de vacunación y diagnóstico de brucelosis alcanzó escasamente el 1.9% del total (Díaz, 1994). De acuerdo al Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA, 1995), en 1994 se estimó una cobertura del 4% y para 1995 ésta aumentó al 11.3 %

1.4 Medidas de control y prevención de la brucelosis caprina a nivel nacional.-En el año de 1970 se instituyó oficialmente la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal en México y fue publicada en el Diario Oficial de la Federación hasta el 28 de abril de 1981 en acuerdo por el cual se establece en todo el territorio nacional con carácter obligatorio general y permanente (Consejo Técnico Consultivo de Sanidad Animal, 1994). En septiembre de 1993 se instituye la Comisión Nacional para la erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CONETB) que junto con la Dirección General de Salud Animal y las Delegaciones de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (en la actualidad Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural) tienen como función la aplicación de las disposiciones contenidas en la entonces Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-011-ZOO-1994 (actualmente NOM-041-ZOO-1995) denominada Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. La NOM tiene por objeto establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas para el control de la brucelosis en el ganado bovino, caprino, ovino y porcino, en todo el territorio nacional.

1.5 Vacunación.- Al ser México un país que no cuenta con las características necesarias para establecer un programa de erradicación como serían: baja prevalencia de la enfermedad, infraestructura e instalaciones adecuadas y recursos económicos ilimitados, las principales estrategias en las que se basa la Campaña nacional están dirigidas hacia el control y prevención a través de la vacunación masiva de los animales y la aplicación de pruebas diagnósticas para la identificación de reactores y su virtual eliminación (FAO/OMS, 1986; NOM-041-ZOO-1995).

1.5.1 Vacuna Rev 1.- En la actualidad la única vacuna disponible para el control de la brucelosis en caprinos es la preparada con la cepa viva atenuada Rev 1. El origen de esta cepa se remonta al año de 1953 cuando Elberg y sus colaboradores en la Universidad de Berkeley, California empezaron a trabajar con una cepa dependiente de la estreptomina que a su vez provenía de la cepa 6056 de *Brucella melitensis* biovariedad 1 y decidieron revertirla hasta lograr escasa virulencia y por clonación obtuvieron una cepa para experimentos futuros en ovinos y caprinos y la llamaron Rev 1 ("Reversion one"). En 1958 fue probada por primera vez en Córdoba, España y oficialmente 15 años más tarde en ese mismo país (Crespo, 1994). La cepa Rev 1 es de baja virulencia para caprinos y ovinos, no revierte a patógena por pases continuos (Alton *et al.*, 1967) y confiere protección duradera hasta por 4.5 años (Alton, 1968). Sin embargo, al igual que la cepa 19 de *Brucella abortus* utilizada para la inmunización de ganado bovino, la cepa Rev 1 tiene ciertas características indeseables en su uso. La aplicación de la dosis completa de 1×10^9 unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por vía subcutánea (s.c.) en cabras gestantes

puede ocasionar serios problemas de abortos (Alton y Elberg, 1967 ; Elberg, 1981), puede persistir en nódulos linfáticos y eliminarse por leche durante 2 ó más lactaciones (Alton, 1985) y además es virulenta para humanos (Blasco *et al.*, 1993). Aunque existe la alternativa de reducir el número de abortos en cabras gestantes al aplicar la dosis reducida (1×10^5 u.f.c.) por vía s.c. (Alton, 1970), algunas investigaciones han revelado que el momento de la vacunación durante la gestación influye en la mayor o menor presentación de abortos. En un estudio realizado por Díaz, *et al.*, (1990) se vacunaron más de 5,000 cabras en su segundo y último tercio de la gestación con la dosis reducida por vía s.c. y los propietarios de los animales no notificaron abortos. Por otro lado, Jiménez de Bagüés, *et al.*, (1989) mencionan que la vacunación en borregas con dosis reducida por vía s.c. en las primeras etapas de la gestación produjo un elevado número de abortos a diferencia de aquellas que fueron vacunadas con la misma dosis y vía en el último mes, las cuales manifestaron un muy bajo porcentaje de abortos.

Probablemente y a nivel práctico la principal desventaja de la vacuna Rev 1 es la de inducir la producción de anticuerpos persistentes durante periodos indefinidos en animales adultos (Alton, 1970), los cuales interfieren en la correcta interpretación de las pruebas serodiagnósticas comúnmente utilizadas y a su vez dificultan el buen desarrollo de las campañas para el control de la brucelosis. Algunos autores mencionan que al aplicar la dosis completa por vía s.c. los títulos de anticuerpos posvacunales presentan una duración variable aunque disminuyen a niveles mínimos a los 4 meses posvacunación (Mancera *et al.*, 1992). En cambio otros como Alton y Elberg

(1967); Casas Olascoaga (1976), refieren que los títulos se vuelven negativos a partir de los 6 meses en la mayoría de los animales y en el resto de ellos al año. Con la dosis reducida los anticuerpos vacunales ya no son detectables con las pruebas serodiagnósticas usuales entre los 3 y 7 meses posteriores a la vacunación (Alton, 1970 ; Díaz *et al.*, 1984) pero aún así, sigue existiendo el problema de persistencia de anticuerpos posvacunales con la consiguiente dificultad de interpretación de las pruebas.

1.5.2 Desarrollo de nuevas vacunas.- Desde hace varios años diferentes grupos de investigadores iniciaron la búsqueda de nuevas vacunas que superaran las desventajas de las utilizadas en la actualidad. Varios de estos trabajos están enfocados hacia el desarrollo de cepas rugosas mutantes con las características ideales de una vacuna, es decir: altamente atenuada, no producir infección persistente ni aborto, no eliminarse a través de la leche, carne y secreciones, tener capacidad inmunogénica efectiva y duradera, no revertir a virulenta, ser apatógena para el humano y no producir anticuerpos que interfieran en la interpretación de las pruebas serodiagnósticas de uso común (Schurig, 1994). Entre estas cepas mutantes destacan las desarrolladas a través de mutagénesis por transposición a partir de *B. abortus* cepa 19 (Tn5 Lac Z [m3]) y cepa 2308 (Tn5 Lac Z [m 106]) (Smith and Heffron, 1987) y la cepa RB51 de *B. abortus* obtenida por pases repetidos en medios adicionados con antibióticos (Schurig et al., 1991). En fechas más recientes y todavía en una etapa inicial de experimentación se están desarrollando otras como la cepa $\Delta purE$ 201 de *B. melitensis* que se obtuvo por supresión del operon *purEK* cuya carencia impide a *B. melitensis* multiplicarse en monocitos humanos y

permite su rápida eliminación del bazo de ratones infectados lo que la convierte en candidata para la vacunación contra la brucelosis en humanos y caprinos (Olsen *et al.*, 1997).

1.5.3 Vacuna cepa RB51.- Debido a las desventajas de la cepa Rev 1, desde hace varios años un grupo de investigadores encabezados por el Dr. Schurig iniciaron una serie de estudios encaminados a producir una vacuna derivada de una cepa mutante que no ocasionara o al menos redujera los efectos adversos antes mencionados. De aquí surgió la cepa rugosa RB51 cuya principal característica es que carece de la cadena "O" del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (Schurig *et al.*, 1991). El LPS cubre casi la totalidad de la membrana externa de las *Brucellas* en fase lisa (Díaz, 1993) y el antígeno "O" es un homopolímero de perosamina que forma parte del LPS (Bundle *et al.*, 1987) y al parecer es el antígeno inmunodominante ya que la mayor proporción de la respuesta de anticuerpos de los animales infectados o inmunizados con especies de *Brucella* en fase lisa va dirigida contra este antígeno (Díaz *et al.*, 1981 ; Schurig *et al.*, 1991). La cepa RB51 se obtuvo por pases repetidos de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* en soya tripticasa adicionada con 1.5% de agar y diferentes concentraciones de rifampicina o penicilina. La metodología utilizada se describe como sigue: después de 3 pases de *B. abortus* 2308 en el medio adicionado con 50, 200 y 400 µg/ml de rifampicina respectivamente, crecieron colonias con morfología rugosa lo que se constató por el consumo de cristal violeta y autoaglutinación en acriflavina. Una de estas colonias identificada como RB fue sometida a varios pases en diversas concentraciones de rifampicina (125 µg/ml) y penicilina (20 µg/ml)

hasta obtener la cepa RB19 la cual carecía de la habilidad para reaccionar con un anticuerpo monoclonal específico (BRU38) para la perosamina de la cadena “O” del LPS de las especies lisas de *Brucella*. La cepa así obtenida se sometió a más pases en medio TSBA sin suplementar para estabilizar la mutación hasta llegar finalmente a la cepa RB51 (Schurig, et al., 1991).

A continuación se presentan las características bioquímicas de la cepa RB51, de su cepa de origen (*B. abortus* 2308) y otras cepas de *B. abortus*:

Prueba bioquímica	RB51 (rugosa)	2308 (lisa)	19 (lisa)	45/20 (rugosa)
Ureasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	+	-	-
Crecimiento con 0.5% de eritritol	+	+	-	+
Susceptibilidad a rifampicina	-	+	+	+

Tomado de: Schurig, et al., (1991)

Los estudios de Schurig, *et al.*, (1991) y Stevens, *et al.*, (1995) demostraron que en ratones infectados por vía intraperitoneal con 1×10^8 u.f.c. de RB51, ésta ya no se logró aislar del bazo al término de 4 semanas después de la infección. Estudios realizados en vacas inoculadas con una dosis de 1×10^8 - 1×10^9 u.f.c. de RB51 y desafiadas con la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* al quinto mes de gestación no manifestaron aborto (Cheville *et al.*,

1993) . Palmer, *et al.* (1995) mencionan que la inoculación de 1×10^9 u.f.c. por vía s.c. de RB51 no ocasionó lesiones severas a nivel de placenta ni aborto en 350 vacas gestantes. Jiménez de Bagüés, *et al.* (1994) indican que la cepa RB51 protegió a ratones contra la infección con cepas virulentas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis*. En otro estudio hecho por Roop, *et al.*, (1991) inocularon *in utero* a 6 fetos de cabras gestantes en el último tercio, con tres diferentes dosis de RB51 y ninguna presentó aborto. La cepa RB51 ha demostrado ser muy estable tanto *in vitro* como *in vivo* y no revierte al fenotipo liso (Roop *et al.*, 1991 ; Schurig *et al.*, 1991). Por su característica de carecer de la cadena "O" del LPS de la membrana externa, la cepa mutante RB51 no produce anticuerpos que reaccionen en las pruebas serodiagnósticas de uso común (aglutinación en tubo, aglutinación con mercaptoetanol, prueba de tarjeta, fijación de complemento) en las cuales se utiliza como antígeno a la cadena "O" (Enright *et al.*, 1990 ; Roop *et al.*, 1991 ; Cheville *et al.*, 1992 ; Cheville *et al.*, 1993) . Este hecho significa que cualquier reacción positiva a estas pruebas de uso comun permite diferenciar a los animales infectados en forma natural de aquellos vacunados con RB51.

En la actualidad, la vacuna RB51 ha sido probada en ganado bovino y por sus características ha demostrado ser una buena alternativa de vacunación. Sin embargo, su eficacia en el ganado caprino aún no ha sido establecida en forma suficiente lo que se refleja en el escaso número de estudios e investigaciones realizados en esta especie.

Es necesario valorar otro tipo de biológicos como la vacuna RB51 que ofrece ventajas de uso sobre la cepa Rev 1 utilizada para la vacunación del ganado caprino en la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal en México, ya que puede ocasionar problemas de aborto y dificulta la diferenciación de los caprinos infectados naturalmente de aquellos vacunados al aplicar las pruebas serodiagnósticas utilizadas en la Campaña.

Los principales objetivos de este estudio fueron los de evaluar la capacidad protectora de la vacuna RB51 de *B. abortus* en cabras desafiadas experimentalmente con una cepa virulenta de *B. melitensis*, así como demostrar que los anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna no son detectables con la prueba serodiagnóstica tamiz oficial para caprinos establecida por la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal en México (prueba de tarjeta al 3%).

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales. Se utilizaron 25 cabras adultas mestizas, 10 de ellas gestantes y todas procedentes de un rebaño libre de brucela , nunca vacunadas y evaluadas previamente con las pruebas serológicas de fijación de complemento (Alton *et al.*,1988) y la prueba de tarjeta usando antígeno de rosa de Bengala a una concentración celular del 3%^a (Díaz, 1993). El diagnóstico de gestación se realizó con un aparato de ultrasonido de imagen^b a los 66 días de la monta. Desde la vacunación hasta poco antes del traslado para el desafío, las cabras fueron alojadas en un corral situado en el Centro de Enseñanza, Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER) situado en el Km 28.9 de la carretera federal México-Cuernavaca, Topilejo, México, D.F. y que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El desafío se llevó a cabo en las unidades de aislamiento del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria (CENID), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (SAGAR-INIFAP) localizado en el Km 15.5 de la carretera federal México-Toluca México, D.F. en donde fueron mantenidas hasta el momento de su sacrificio. La alimentación de los animales durante todo el experimento consistió de heno de avena y una mezcla de sorgo, soya y maíz molidos, administrados dos veces al día y agua a libre acceso.

^a PRONABIVE.MEXICO.

^b Tokio Keiki LS1000

2.2 Vacunación. Las cabras se dividieron aleatoriamente en dos grupos: Grupo I, formado por 15 animales (7 gestantes con 80 ± 8 días de gestación) inyectados por vía subcutánea en la región axilar con la vacuna RB51 de *Brucella abortus*^c y a una dosis de 4×10^{10} unidades formadoras de colonias (u.f.c.) (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994) administrada en 20 ml de solución salina fisiológica estéril aplicando 10 ml de cada lado; Grupo II con 10 animales (3 gestantes) inyectados por la misma vía, dosis y zona con solución salina fisiológica estéril. Ambos grupos se alojaron juntos durante todo el experimento.

2.3 Toma de muestras sanguíneas. Se obtuvieron 10 ml de sangre de cada animal por venopunción yugular en tubo y aguja vacutainer sin anticoagulante^d en los días 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 128, 150 y 165 a partir del día de la vacunación. La sangre se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos y del suero se obtuvieron alícuotas en tubos *ependorf* que se mantuvieron en congelación para los diferentes análisis serológicos.

2.4 Desafío. El primer desafío se realizó al día 53 después de la vacunación (PV) en las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología que constan de 9 corrales de piso de cemento, separados y totalmente cerrados con sistema de ventilación y flujo de aire positivo hacia un pasillo limpio y flujo de aire negativo hacia un pasillo "sucio", además cuenta con almacén de alimentos, sala de necropsias con salida hacia un horno crematorio, vestidor y regaderas.

^c Donada por Laboratorios Litton de México

^d Becton & Dickinson.

Se utilizó una cepa de campo de *Brucella melitensis* biovariedad 1 (fase lisa, virulenta) aislada de cabras infectadas en forma natural provenientes de Torreón, Coahuila, México. El conteo se realizó por el método de Miles y Misra (Alton *et al.*, 1988) y todas las cabras recibieron una dosis de 9×10^5 u.f.c. en 20 μ l de solución salina estéril instilada con micropipeta^g en el saco conjuntival del ojo derecho. Al día 118 PV y 65 días después del primer desafío (D1) se realizó un segundo desafío (D2) con la misma cepa, dosis y bajo las mismas condiciones que el primero y al día 168 PV (50 días después del D2) se procedió al sacrificio humanitario de todos los animales.

2.5 Necropsia y obtención de muestras. Se realizó la necropsia a todos los animales para su inspección externa e interna. Se colectaron muestras de los siguientes órganos para estudios bacteriológicos: linfonódulos (submandibular, preescapular y retromamario), útero, glándula mamaria, y bazo. Las muestras fueron guardadas por separado en bolsas dobles de polietileno, identificadas y congeladas hasta su utilización.

2.6 Estudio bacteriológico. La preparación, siembra e incubación de las muestras de los órganos para aislamiento se llevó a cabo en el laboratorio de Bioseguridad del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual cuenta con un gabinete de seguridad BL2^f con flujo de aire laminar y lámparas de luz ultravioleta.

^g Gilson Pipetman.

^f Labgard Class II Tipo A/B3 NuAire Inc. Plymouth, Minnesota, USA.

2.6.1 Procesamiento de órganos: *a)* se limpiaron los órganos con tijeras y pinzas para eliminar grasa y tejido sobrante; *b)* cada muestra se introdujo en alcohol al 70% y se flameó con un mechero para eliminar los posibles contaminantes; *c)* se cortaron en fragmentos pequeños y se colocaron en bolsas dobles de polietileno estériles; *d)* se añadieron 10 ml de solución salina estéril a cada bolsa; *e)* se colocaron en un macerador de tejidos^g y se completó la maceración con un rodillo de madera; *f)* se tomó con hisopo estéril una muestra de líquido de cada bolsa y se distribuyó uniformemente en las cajas para cultivo con medio de Farrell, sembrando dos cajas por órgano. El medio de Farrell contiene: agar brucella^h adicionado con un suplemento selectivo de antibióticosⁱ compuesto por 2 500 U.I. de sulfato de polimixina B, 12 500 U.I. de bacitracina, 50 mg de ciclohexamida, 2.5 mg de ácido nalidixico, 50 000 U.I. de nistatina y 10 mg de vancomicina; *g)* las cajas sembradas se colocaron en incubadora^j a 37 C durante 10 días. La mitad de las cajas se incubaron con 5-10% CO₂ y la otra mitad sin CO₂; *h)* la revisión de las cajas se inició a las 48 hrs y se resembraron en medio de Farrell las colonias sospechosas. Los cultivos que no desarrollaron crecimiento después de 10 días se desecharon; *i)* se hicieron frotis y tinción de Gram de las resiembras; *j)* los frotis que mostraron características del género *Brucella* (cocobacilos pequeños, Gram negativos) fueron sometidos a las pruebas bioquímicas recomendadas (Alton *et al.*,1988) como son: requerimiento de CO₂, producción de H₂S, utilización de TSI y Citrato y producción de Ureasa; también se realizó la identificación de la

^g Stomacher 400, England.

^h Difco Laboratories.

ⁱ OXOID Laboratories, England.

^j NuAire MU 3700.

cepa con aglutinación por antisueros A y M^k, crecimiento en presencia de colorantes (tionina, fucsina, safranina), prueba de acriflavina para determinación de fase lisa o rugosa y sensibilidad a lisis por fagos Tb^l, Wb^l, R/C^l, Fi^m, BK^m (Corbel, 1984).

2.7 Estudio serológico.

2.7.1 Se realizó la prueba de tarjeta con antígeno liso de *Brucella abortus* al 3% (Díaz, 1993) a todos los sueros obtenidos posvacunación (PV) y posdesafíos (PD1 y PD2).

2.7.2 La presencia de anticuerpos contra la cepa rugosa vacunal de RB51 fue evaluada mediante inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA) utilizando como antígeno de captura una cepa en fase rugosa avirulenta mutante por transposición de *Brucella abortus* S2308 : : Tn5ⁿ.

2.7.2.1 Estandarización de la prueba de ELISA.

2.7.2.2 Antígeno: Preparación y pegado a la microplaca.- El antígeno se preparó a una concentración celular del 4% en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2 (PBS), se estableció la dilución óptima del antígeno que fue de 1:100 en PBS y se colocaron 100 µl de esta dilución en cada pocillo de las microplacas de poliestirenoⁿ. Se cubrió cada microplaca con papel autoadherible y se incubaron toda la noche a 37C. Al siguiente día se lavaron 3 veces con PBS-Tween (PBS+0.05% de Tween 20) en un lavador de

^k National Veterinary Services.

^l Donados por Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, Francia

^m Donados por Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK.

ⁿ Donada por L.A. Garry Adams, Texas A&M University.

ⁿ Nunc-Immunoplate Maxisorp F96.

microplacas^o y como bloqueador se utilizó una solución de albúmina al 1% diluida en 100 ml de PBS pH 7.2 de la cual se colocaron 100µl en cada pocillo y se incubaron a 37C toda la noche y se volvieron a lavar 3 veces con PBS-Tween. Las microplacas se cubrieron con papel autoadherible y se almacenaron en refrigeración a 4 C hasta la realización de la prueba.

2.7.2.3 Sueros.- Se determinó la dilución óptima de los sueros problema en 1:200 con PBS pH 7.2; se utilizó un suero control positivo y uno control negativo y todos se prepararon por duplicado. Se colocaron 100µl de suero en cada pocillo y las microplacas se cubrieron y se incubaron a 37C durante 60 minutos y posteriormente se lavaron con PBS-Tween.

2.7.2.4 Conjugado.- Se utilizó Anti-IgG de cabra obtenida en conejo conjugada con peroxidasa^p en una dilución de 1:2000 en PBS y se colocaron 100µl por pozo. Las microplacas se cubrieron con papel autoadherente y se incubaron a 37C durante 60 minutos y se lavaron 3 veces con 100µl de PBS-Tween.

2.7.2.5 Sustrato y lectura de ELISA.- Se preparó una solución con 5.48 g de 2,2'-Azino-di-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)^p en 50 ml de citrato de sodio 0.05 M pH 4 que se mantuvo almacenada a 4C y a la cual se adicionaron 19 µl de H₂O₂ al 1.2% al momento de su utilización. A las microplacas ya lavadas se les adicionaron 100µl de sustrato preparado, se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se determinó la densidad óptica (D.O.) con el lector de microplacas^q a una longitud de onda de 405 nm.

^o Bio-Rad Immunowash 1250

^p Sigma Chemical Co.

^q Bio-Rad 3550.

Se calculó la media de las lecturas de las dos repeticiones, se obtuvo el promedio y la desviación estándar por día de muestreo y los valores se graficaron por grupo vacunado y no vacunado.

2.8 *Análisis estadístico.*

Con los valores promedio de D.O. obtenidos en la prueba de ELISA se realizó un análisis estadístico descriptivo y análisis de varianza para un modelo factorial (vacunación y tiempo posvacunación) en el paquete Sistema de Análisis Estadístico "SAS", versión 6.04 (1990) .

Para establecer diferencias de los porcentajes obtenidos en: aislamiento de cepa de desafío, aislamiento por órganos y seropositividad a la prueba de tarjeta al 3% entre el grupo vacunado y grupo control, se aplicó un análisis para tablas de contingencia (probabilidad exacta de Fisher) (Siegel, 1982).

3.- RESULTADOS

3.1 Estudio bacteriológico. Como resultado del cultivo, identificación y fagotipificación (**Cuadros 1 y 2**) de las colonias sospechosas obtenidas en los órganos analizados, la cepa de desafío *Brucella melitensis* biovariedad 1 se aisló en 7 de los 25 animales expuestos (28%). La cepa vacunal de *Brucella abortus* RB51 no se recuperó en ninguno de los animales (0%). En la **Figura 1** se puede apreciar que en el grupo vacunado solamente se aisló la cepa de desafío en una sola cabra representando el 6.6% y en el grupo control se aisló en 6, lo que corresponde al 60% ($p < 0.01$).

En cuanto al porcentaje de aislamiento a partir de los diferentes órganos y como se muestra en la **Figura 2**, la cepa de desafío estuvo presente en los linfonódulos submandibulares (SM) del 100% de los animales con aislamiento positivo; en bazo (B) en el 33.3% y en útero (UT), linfonódulos preescapulares (PE), retromamarios (RM) y glándula mamaria (GM) en el 16.6%. En la cabra con aislamiento positivo del grupo vacunado, la cepa se aisló en el SM ($p < 0.01$) y UT ($p > 0.05$) y en las 6 del grupo control se aisló en SM (6), PE (1), RM (1), GM (1), y B (2) ($p > 0.05$) y en una de las cabras del grupo control se aisló en 4 de los 6 órganos analizados.

3.2 Lesiones macroscópicas. No se observaron lesiones externas en los sitios de vacunación (región axilar) y a la necropsia no se observaron cambios ni alteraciones macroscópicas en los órganos internos, principalmente del sistema reticuloendotelial.

3.3 Abortos. De las 10 cabras gestantes, 9 parieron crías normales y a término, a excepción de una cabra perteneciente al grupo vacunado que abortó gemelos muertos aproximadamente a los 137 días de gestación (65 días PV y 11 días PD1). Los productos abortados resultaron negativos al aislamiento de *Brucella* después del análisis bacteriológico de contenido abomasal, bazo, hígado y pulmones.

3.4 Estudios serológicos.

3.4.1 Resultados de la prueba de tarjeta al 3% con antígeno liso: No se presentó seroconversión en el 100% de los animales correspondientes a los días 0, 7, 15, 30 y 45 posteriores a la vacunación (PV). El 100% de los sueros de los animales de los días 7, 15, 30 y 37 después del primer desafío (PD1) también resultaron negativos. Sin embargo, el 48% del total de los sueros probados después del segundo desafío (PD2) (días 7, 15, 30 y 45) resultaron positivos a la prueba (**Figura 3**). Al analizar estos resultados por grupos (**Figura 4**) se observó que en el grupo vacunado la seropositividad inició en el 6.6% de los animales al día 7; en el 13.3% en los días 15 y 30 respectivamente y en el 40% al día 45 PD2. En el grupo control, el 40% de los animales fueron positivos al día 7; 40% al día 15 y 60% al día 30 y 45 PD2. No hubo diferencia significativa ($p>0.05$) en los porcentajes de seropositividad PD2 entre el grupo vacunado y el grupo control.

3.4.2 Resultados de la prueba de ELISA indirecta con antígeno rugoso: en la **Figura 5** se ilustra el promedio de las densidades ópticas (D.O.) de los sueros de los animales del grupo vacunado y grupo control obtenidas en el lector de microplacas. El grupo que recibió la vacuna RB51 presentó el promedio de D.O. más alto en comparación con el grupo no vacunado ($p < 0.01$). Esta diferencia significativa se mantuvo del día 7 al 128 PV (día 10 PD2). Al día 149 PV (día 31 PD2) ya no hubo diferencia entre ambos grupos ($p > 0.05$), sin embargo, al día 165 PV (día 47 PD2) la diferencia volvió a ser significativa ($p < 0.01$). En la misma gráfica se observa que el promedio de D.O. del grupo vacunado alcanza su punto máximo en el día 15 PV y comienza a disminuir a partir del día 30 al 45 PV, notándose un ligero ascenso al día 60 PV (7 D1) el cual se mantiene hasta el día 91 PV (38 PD1). A partir del día 91 PV hay un descenso brusco que llega a su nivel mínimo el día 149 PV (31 PD2) y de aquí se presenta una elevación hasta el día 165 PV (47 PD2) que corresponde al último día de muestreo.

4. DISCUSIÓN

Las principales estrategias utilizadas por la Campaña para la prevención y control de la brucelosis animal en México y en otros países con alta prevalencia incluyen la vacunación y el diagnóstico serológico (FAO/OMS, 1986; NOM-041-ZOO-1995). La cepa Rev 1 de *B. melitensis*, probada por primera vez en 1958 en Córdoba, España para la inmunización de ovinos y caprinos (Crespo, 1994), sigue siendo hasta la fecha la vacuna de elección . A pesar de su efectividad, esta vacuna tiene ciertas desventajas en su uso (abortos, infecciones persistentes, anticuerpos vacunales de larga duración) (Alton y Elberg 1967; Elberg *et al.*, 1981; Alton, 1985; Jiménez de Bagüés, 1989; Blasco, 1993) lo cual ha motivado a varios investigadores a desarrollar otros inmunógenos que mantengan las buenas cualidades de la Rev 1 pero superen sus desventajas. Uno de los productos de estas investigaciones es la vacuna RB51 de *B. abortus* desarrollada por Schurig, *et al.*, 1991, y que ha sido mayormente probada en ganado vacuno (Buhrman, 1989; Cheville *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1995) pero escasamente en caprinos (Roop *et al.*, 1986 Roop *et al.*, 1991).

Analizando los resultados del presente trabajo y comparándolos con los obtenidos en otros estudios al vacunar con la cepa Rev 1, se observó que el porcentaje de protección conferido por la vacuna RB51 al grupo de cabras desafiadas experimentalmente con 9×10^5 de una cepa virulenta de *B. melitensis* fue del 93.4% el cual supera al mencionado por Baer, *et al.*, (1971) quienes encontraron un porcentaje de protección del 67% en 36 cabras vacunadas con

Rev 1 y desafiadas con 4×10^5 u.f.c. de *B. melitensis* (cepa virulenta H38). Puede apreciarse que el porcentaje de protección logrado en este trabajo con la cepa RB51 es muy cercano al 100%, lo cual concuerda con lo obtenido por Alton, *et al.*, (1972) y Mancera, *et al.*, (1992) con la Rev 1.

Los resultados también permiten deducir que la vacuna RB51 de *B. abortus* en las cabras produjo inmunidad contra una especie heteróloga como *B. melitensis*, lo cual fue demostrado anteriormente en el modelo murino por Jiménez de Bagüés, *et al.*, (1992), quienes determinaron que al vacunarlos con la cepa RB51 les confirió protección contra *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis*. Sin embargo, en otro trabajo posterior (Jiménez de Bagüés, *et al.*, 1994) se observó que esta misma vacuna no protegió a un grupo de borregos desafiados experimentalmente con *B. ovis*. Los autores mencionan que la efectividad de la vacuna contra *B. ovis* en los borregos pudo verse limitada tal vez porque los determinantes antigénicos críticos para la inmunidad protectora mediada por células no son compartidos entre *B. ovis* y *B. abortus*.

Por otro lado, es necesario mencionar que en el presente estudio la dosis vacunal de cepa RB51 por animal se inoculó en un volumen 20 ml de solución salina estéril por animal, cantidad que resulta muy elevada. La razón de esto fue que la concentración celular por dosis (0.8×10^{10} u.f.c.) de esta vacuna que pertenecía a un lote experimental contenía menor cantidad de bacterias, por lo que fue necesario utilizar 5 frascos de liofilizado por animal que fueron reconstituidos en 20 ml de solución salina para que la suspensión obtenida tuviera la concentración celular (4×10^{10} u.f.c.) y la solubilidad adecuadas para su aplicación. Debido al gran volumen se decidió inyectar 10 ml del lado

derecho y 10 del lado izquierdo para no lesionar la zona de inoculación. Ninguno de los animales manifestó fiebre ni molestias en los días posteriores a la vacunación y no se observaron signos locales de inflamación.

En este trabajo se utilizó el medio selectivo de Farrell para el cultivo de las muestras ya que en otras investigaciones ha demostrado ser muy eficaz para el crecimiento de *Brucella* (Robertson *et al.*, 1977). En este caso el medio resultó muy efectivo ya que hubo escaso crecimiento de microorganismos contaminantes lo que no dificultó el crecimiento de las colonias de *Brucella* y facilitó su aislamiento.

La mayor proporción de aislamientos de la cepa de desafío se logró en linfonódulos mandibulares (100%), seguido por bazo (33%), así como el resto de los linfonódulos, útero y glándula mamaria (16%) lo cual coincide con Alton, *et al.*, (1988) quienes mencionan que los órganos en donde más frecuentemente se aíslan las brucelas son los órganos linfoides seguidos por el útero y ubre. Esto puede explicarse porque el sitio de inoculación drena hacia los linfonódulos de esa zona y de acuerdo a lo indicado por Crespo, (1994), los linfonódulos más próximos al sitio de inoculación se infectan con mayor frecuencia. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los de Villegas, (1997), quien también determinó que el mayor porcentaje de aislamientos por tipo de linfonódulo en cabras desafiadas con *B. melitensis*, se logró en los submandibulares.

Con respecto al porcentaje de aislamiento de la cepa de desafío por órganos entre el grupo vacunado y control, hubo evidencia estadística

($p < 0.01$) de que el efecto de la vacunación limitó el establecimiento de la cepa de desafío sólo a linfonódulos submandibulares, sin embargo no existió evidencia estadística ($p > 0.05$) de que la vacuna disminuyera la probabilidad de que la cepa de desafío se estableciera en otros órganos, además de los linfonódulos submandibulares.

No se logró aislar la cepa vacunal a partir de los órganos de los animales vacunados y sacrificados a los 168 días posvacunación. Esto sugiere que la cepa fue eliminada probablemente durante las primeras semanas después de la inoculación. Estos hallazgos fueron semejantes a las observaciones hechas por Schurig, *et al.*, (1991) y Stevens *et al.*, (1994) en bazo de ratones infectados con cepa RB51 la cual fue eliminada entre las 3-4 semanas posinfección. Cheville *et al.*, (1992) inocularon 24 becerras y vaquillas con la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* y determinaron que las becerras eliminaron la cepa muy rápidamente (menos de 2 semanas) por lo que consideraron que era poco tiempo de permanencia para inducir una respuesta inmune duradera a diferencia de las vaquillas en las que la cepa perduró más tiempo (2-3 semanas). Estos investigadores sugirieron que si este tiempo de 2 a 3 semanas fuera suficiente para producir inmunidad, la cepa podría tener características ideales como vacuna. En el presente estudio se observó que el tiempo de permanencia de la cepa vacunal fue suficiente para conferir protección al 93.4% de las cabras desafiadas con *B. melitensis* por lo menos hasta el momento del sacrificio (durante 7-11 semanas aproximadamente).

La menor persistencia de la cepa rugosa RB51 en cabras comparada con la de las cepas lisas de mayor virulencia como *B. abortus* 2308 o en este caso

B. melitensis se debe a la ausencia de la cadena "O" del LPS (Price *et al.*, 1990) que al parecer confiere a las *Brucellas* la capacidad de evasión al proceso de digestión de los macrófagos, protegiéndolas de los lisosomas o inhibiendo factores bactericidas de los polimorfonucleares sin que aún se conozca el mecanismo exacto (Soto *et al.*, 1991). Cheville *et al.*, (1992), observaron que en los bovinos existen marcadas diferencias en cuanto a la magnitud de las lesiones causadas a nivel de linfonódulos y bazo por cepas virulentas cuando se comparan con cepas mutantes. Estos autores explican que las primeras causaron una marcada depleción de las células linfoides en la zona de células T dependientes de los órganos linfoides lo cual provoca una inmunodeficiencia temporal que puede prolongar la persistencia de las cepas virulentas en esos órganos. La causa directa de esta depleción aún se desconoce pero se ha relacionado con altas concentraciones de brucelas y macrófagos en los órganos linfoides (Winter, 1990).

Aunque en este trabajo no fue posible probar la eficiencia protectora de la vacuna RB51 contra el aborto por efecto de la infección experimental con *B. melitensis* como originalmente se había planteado, se demostró que la vacuna no indujo el aborto en las cabras gestantes que fueron vacunadas aproximadamente a los 75-80 días de gestación. Estos resultados contrastan con lo observado en el trabajo de Jiménez de Bagüés *et al.*, (1989) quienes vacunaron a borregas gestantes con dosis reducida de Rev 1 por vía subcutánea en fases tempranas de la gestación y se produjo un elevado número de abortos. En la presente investigación, todas las cabras parieron en el tiempo normal a crías vivas a excepción de una que abortó gemelos muertos aproximadamente a

los 137 días de gestación (65 días posvacunación). Los resultados de los análisis bacteriológicos realizados en los fetos fueron negativos al aislamiento de *Brucella*. De hecho, la condición física de la cabra no era satisfactoria desde el inicio del experimento mostrando emaciación progresiva y anorexia. Durante la necropsia se observaron lesiones sugerentes de paratuberculosis con linfonódulos mesentéricos aumentados de volumen, engrosamiento de la mucosa del ileon y ausencia de grasa corporal lo cual, aunado al hecho de no haber aislado *Brucella* en los fetos sugiere que el aborto no estuvo relacionado con la vacunación. Aunque estadísticamente el número de cabras gestantes (10) fue pequeño para inferir que la vacuna no causa aborto, existen otros estudios al respecto que apoyan estos resultados como el de Roop *et al.*, (1991) quienes inocularon por vía intramuscular diferentes dosis de RB51 a fetos de cabras en el último tercio de gestación y en ninguna se presentó aborto ni partos prematuros. Aunque el número de cabras (3) y fetos (6) utilizados por estos investigadores fue reducido, fue representativo el hecho de que la cepa, a pesar de haber sido inoculada directamente a los fetos en el interior del útero no causó lesiones que condujeran a la muerte y al aborto de los mismos. En otro trabajo más extenso realizado por Palmer, *et al.*, (1995) concluyeron que la cepa RB51 a una dosis de 1×10^9 por vía subcutánea no indujo el aborto en 350 vacas gestantes y la inoculación por vía intravenosa causó una ligera placentitis.

Entre los trabajos más completos enfocados hacia el poder protector de la vacuna cepa RB51 contra el aborto causado por la infección experimental con cepas virulentas, está el de Cheville, *et al.*, (1993) en el que se vacunaron a

24 vaquillas con diferentes cepas de *B. abortus* (cepa 19, RB51 y mutantes por supresión) y que fueron desafiadas con la cepa virulenta de *B. abortus* 2308 por vía intraconjuntival al quinto mes de gestación. Ninguna de las vacas vacunadas presentó aborto ni se aisló la cepa de desafío a comparación del grupo control no vacunado en donde hubo 60% de abortos y el resto de los animales parieron becerros débiles a los 8.5 meses de gestación. La imposibilidad de evaluar en este trabajo la capacidad protectora de la vacuna cepa RB51 contra el aborto ocasionado por la infección experimental con la cepa virulenta de *B. melitensis* en cabras, se debió a que el primer desafío hecho a los 53 días posvacunación (aproximadamente a los 127 días de gestación), no fue efectivo ya que hubo ausencia de respuesta inmune en todos los animales medida a través de la prueba de tarjeta al 3% durante 37 días posteriores a dicho desafío, momento en el cual ya habían iniciado los partos. La falla en el desafío se atribuye a un error cometido durante el transporte o aplicación del inóculo ya que después de la preparación y ajuste de la concentración celular del inóculo se dividió en dos partes y una de ellas se llevó a las unidades de aislamiento para aplicarla a los animales y a la otra se le realizó el conteo de colonias del cual resultó el número adecuado (9×10^5 u.f.c.)

Los resultados obtenidos con la prueba de tarjeta al 3% con antígeno liso, mostraron que todos los sueros posvacunales fueron negativos hasta antes del segundo desafío (118 días posvacunación). Esto confirma lo establecido por Schurig, *et al.*, (1991) quienes a través de varios estudios concluyeron que los ratones, cabras y ganado vacuno inmunizados con cepa RB51 producían anticuerpos dirigidos contra proteínas de la membrana externa de *B. abortus*

pero no contra la cadena "O" del LPS, por lo menos durante 7 semanas después de la inoculación. En la presente investigación pudo observarse que no se detectaron anticuerpos contra la cadena "O" durante 18 semanas posvacunación. Se han identificado varias proteínas inmunogénicas de la membrana externa de la cepa RB51. En 1993, Stevens *et al.*, midieron las respuestas celulares proliferativas hacia 22 fracciones protéicas (106 a 18 kDa) de *B. abortus* cepa 2308 y de RB51 en el bazo de ratones infectados con las cepas 2308, 19 y RB51. De sus observaciones los investigadores concluyeron que los animales infectados desarrollaron respuestas celulares proliferativas similares principalmente hacia las fracciones protéicas de 27 a 18 kDa de la cepa 2308 con la única excepción de que la respuesta hacia la RB51 fue de más corta duración. En otro estudio (Stevens *et al.*, 1995), se midió la respuesta celular en los linfonódulos cervicales a proteínas de la membrana externa de la cepa RB51 y la 2308 de *B. abortus* en vacas vacunadas con RB51 y vacas infectadas con cepa 2308. Los resultados indicaron que la cepa RB51 y la 2308 contienen proteínas inmunodominantes de peso molecular similar (32, 27, 18, <18 kDa) que inducían la respuesta celular. Posteriormente, Olsen *et al.*, (1997) a raíz de sus estudios en cabras sugirieron que las proteínas de la membrana externa de peso molecular de 18 kDa o menores eran importantes para la estimulación de respuestas proliferativas de linfocitos y que estas proteínas estaban presentes tanto en *B. abortus* como en *B. melitensis*. En los trabajos mencionados anteriormente se denota la importancia de la respuesta celular a la cual se le considera como el principal mecanismo de defensa contra las infecciones por microorganismos intracelulares como *Brucella*, aunque no

debe restarse importancia al posible papel que juegan los anticuerpos en esta protección. En un estudio hecho por Jiménez de Bagüés *et al* (1993) en ratones, se determinó que la cepa RB51 produjo niveles significativos de protección contra *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis*, pero se observó que la cepa RB51 indujo formación de linfocitos T que protegieron contra *B. abortus* y *B. melitensis* pero no contra *B. ovis* y que los anticuerpos aportaron protección contra *B. ovis* y *B. melitensis* pero no contra *B. abortus*. Esto sugiere que la inmunidad puede deberse a la acción combinada de anticuerpos y respuestas inmunes mediadas por células y que podrían existir otros factores que influyen en las respuestas, ya que existen evidencias de que los anticuerpos por si solos tienen capacidad de proteger contra la infección por *Brucella*, dependiendo del número de bacterias y la afinidad de los anticuerpos (Winter, 1990).

En este trabajo la seroconversión hacia los antígenos lisos posterior al desafío se presentó en mayor proporción en las cabras del grupo control y aunque no se estableció diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos se puede pensar que la capacidad inmunogénica de las cabras vacunadas permitió el control más adecuado de la cepa de desafío, limitando su persistencia en estos animales. La no reactividad del suero en la prueba de aglutinación en tarjeta con antígeno liso antes del desafío y la seroconversión manifestada después del mismo, tanto por cabras vacunadas como no vacunadas, apoyan lo observado por otros investigadores quienes establecen que la detección de anticuerpos que reaccionan en las pruebas serológicas que utilizan antígeno liso de *B. abortus* en animales vacunados con RB51 puede indicar una infección de campo por *B. abortus* y en este caso por *B. melitensis*

(Cheville, 1993; Schurig, 1994) Esta característica constituye la principal ventaja de la vacuna RB51 sobre la Rev 1 ya que permite distinguir animales vacunados de infectados al aplicar las pruebas serodiagnósticas de uso común, lo cual hasta la fecha ha representado un serio problema para el mejor desarrollo de las campañas de prevención y control contra la brucelosis animal en México y otros países.

Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA indirecta con antígeno rugoso, sugieren que la vacuna RB51 produce elevación en el título de anticuerpos séricos que si bien no pueden relacionarse ampliamente con protección, indican que hubo respuesta humoral al usar este inmunógeno. El motivo de utilizar un antígeno de captura rugoso en la prueba de ELISA indirecta fue para detectar la respuesta inmune humoral a la vacunación con RB51, lo cual no sería posible con antígenos lisos. En general, ELISA se considera una prueba muy sensible y específica para el diagnóstico de brucelosis en bovinos y ha demostrado su eficacia en diversos trabajos (Nielsen *et al.*, 1988). En caprinos, el diagnóstico de la brucelosis por este método sólo se hace a nivel experimental ya sea con ELISA indirecto (Diaz, 1993) o con ELISA competitivo (Alfonseca *et al.*, 1995) y según estos autores tienen una sensibilidad cercana al 100%. Sin embargo, no existen pruebas diagnósticas establecidas para determinar la respuesta inmune humoral a vacunas experimentales en caprinos.

De acuerdo a las observaciones hechas en este estudio, el perfil serológico obtenido de los sueros de las cabras vacunadas con RB51 y sometidos a la prueba de ELISA indirecto con antígeno de captura rugoso y en

la que se utilizó como conjugado Anti-IgG caprina –por lo que se infiere que las inmunoglobulinas detectadas son del tipo G– mostró que las IgG alcanzaron sus niveles máximos entre los 15-30 días posteriores a la vacunación, coincidiendo con lo observado en el trabajo de Roop *et al.*, (1991) en cabras inoculadas *in útero* con cepa RB51. Otra característica observada en el perfil serológico logrado en el presente trabajo es la tendencia de los anticuerpos vacunales a elevarse poco después del día 149 posvacunación y que continúa hasta el día 165 que corresponde al último día de muestreo serológico por lo que se desconoce su desarrollo posterior. Esta incremento pudo deberse al estímulo antigénico ocasionado por el desafío con la cepa virulenta de *B. melitensis*, lo que sugiere que existen otros determinantes antigénicos diferentes a la cadena “O” del LPS que juegan un papel importante en las respuestas inmunes contra las brucelas. Esto apoya las observaciones hechas por otros investigadores (Stevens *et al.*, 1993 ; Stevens *et al.*, 1995) quienes trabajaron con ratones y vacas y concretamente por Olsen *et al.*, 1997, quienes realizaron estudios en cabras y concluyeron que ciertas proteínas de la membrana externa (< 18 kDa) eran inmunodominantes y que estaban presentes tanto en *B. abortus* como en *B. melitensis*.

Es importante señalar la falta de estudios e información referentes a la respuesta inmune humoral en caprinos producida tanto por la infección como por la vacunación (vacuna clásica y experimentales), así como de la caracterización de las inmunoglobulinas producidas en ambos casos. Por fortuna, en México se están desarrollando nuevas líneas de investigación

dirigidas hacia el mayor conocimiento de estos aspectos en el ganado caprino (Alfonseca *et al.*, 1995).

A pesar de las bondades de la vacuna RB51 demostradas en esta investigación, es necesario seguir realizando más estudios en ganado caprino dirigidos a evaluar otros aspectos de la misma, como son la duración de su efecto protector a lo largo de los años y la posible eliminación de la cepa vacunal a través de la leche, ya que por ser un producto reciente esto no ha podido determinarse en forma adecuada, aunque cabe mencionar que en el momento actual se tienen evidencias de que la cepa RB51 no se elimina por la leche de cabras vacunadas por lo menos durante 2 meses posvacunación^{*}.

Es prioritario aumentar la cobertura de vacunación en los caprinos ya que a pesar de los esfuerzos de la Campaña, sigue siendo insuficiente para lograr avances importantes en el control de la brucelosis en esta especie doméstica, que constituye el medio de vida de un sector importante de la población mexicana y representan una fuente potencial de divisas para México a través de la comercialización de sus productos, principalmente quesos y que está seriamente limitada por las barreras no arancelarias impuestas por los países importadores. Para apoyar estos esfuerzos se requiere por un lado, aumentar el número y la calidad de las investigaciones en todos los aspectos relativos a la brucelosis caprina y por otro difundir más información entre los grandes y pequeños caprinocultores acerca de los beneficios de la vacunación y de las

* Suárez, G.; Díaz, A.; Soberón, M y Torres, A. Datos sin publicar

consecuencias de la enfermedad, con las repercusiones que ésta trae a la producción y productividad de sus animales así como de los riesgos que implica para la salud del propio productor, su familia y la población que consume sus productos.

5. CONCLUSIONES

- 1.-** Bajo las condiciones de este estudio, la vacuna RB51 de *B. abortus* a la dosis de 4×10^{10} u.f.c. por vía subcutánea confirió protección al 93.4% de las cabras desafiadas en forma experimental con 9×10^5 u.f.c. por vía conjuntival.
- 2.-** La vacuna RB51 no indujo la formación de anticuerpos detectables a través de la prueba de aglutinación en tarjeta al 3% utilizando antígeno liso por lo menos durante 168 días después de la vacunación.
- 3.-** La vacuna no ocasionó el aborto en cabras gestantes vacunadas a los 75 días de gestación.
- 4.-** La prueba de ELISA indirecta con antígeno de captura rugoso detecta la presencia de anticuerpos vacunales producidos por la cepa RB51 en caprinos.
- 5.-** Se requieren más estudios dirigidos a evaluar la duración de la protección conferida por la vacuna RB51 y su posible eliminación a través de la leche.

6. LITERATURA CITADA

1. Acha, P.N. and Szyfres, B.: Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y animales. *CPS-OMS*. Washington, 1986.
2. Alfonseca, S.E.; Díaz, A.E.; Hernández, A.L.; Velázquez, Q.F. y Suárez, G.F.: Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en cabras. *Vet. Mex.* 26: 2 p 52 (1995).
3. Alton, G.G. and Elberg, S.S.: Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study. *Vet. Bull.* 37: p 793-800 (1967).
4. Alton, G.G.; Elberg, S.S. and Crouch, D.: Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine, the stability of the degree of attenuation. *J. Comp. Pathol.* 77: p 293 (1967).
5. Alton, G.G.: Further studies of the duration of immunity produced in goats by the Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. *J. Comp. Path.* 78: p 173-178 (1968).
6. Alton, G.G.: Vaccination of goats with reduced dosis of Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. *Res. Vet. Sci.* 11: p 54-59 (1970).
7. Alton, G.G.: *Brucella melitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* 45/20 vaccines in goats: Immunity. *Am. J. Vet. Res.* 33: p 1747-1750 (1972).
8. Alton, G.G.: The epidemiology of *Brucella melitensis* in sheep and goats. *Brucella melitensis*. Edited by Verger, J.M. and Plommet, M. p 187. *Martinus Nijhoff*. Dordrecht, 1985.

9. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D. and Verger, J.M.: Techniques for the brucellosis laboratory. *Institut National de la Recherche Agronomique*. Paris, 1988.
10. Baer, G.M.; Flores, C.R.; Cortes, N.A. y Morales, S.H.: Comparación de la eficacia de dos vacunas vivas atenuadas contra la brucelosis caprina en México. *Téc. Pec. en Méx.* 17: p 30-37 (1971).
11. Báez, A.J.; Díaz, A.E.; Salinas, G.H. y Lozano, S.M.: Seroepidemiología de la brucelosis caprina en algunos municipios de Zacatecas. Memorias del Congreso Internacional en Producción Caprina. Simposio Internacional sobre Brucelosis Caprina. X Reunión Nacional sobre Caprinocultura, Zacatecas, México 1995. p 166-168 *FMIZ-UAZ AMPC* (1995).
12. Blasco, J.M. and Diaz, R.: *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* 347: p 805. (1993).
13. Buhman, D.L.: The behaviour and effects of *Brucella abortus* rough strain RB51 in mice and cattle. M.S. Thesis. *VPI & SU*. Blacksburg, V.A. U.S.A. (1989).
14. Bundle, D.R.; Cherwonogrodsky, J.W.; Caroff, M. and Perry, M.B.: The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Am. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: p92-98 (1987).
15. Casas-Olascoaga, R.: Diagnóstico serológico de la brucelosis. Boletín Zoonosis XVIII. *Centro Panamericano de Zoonosis OPS OMS*: p107-141 (1976).

16. Corbel, M.J.: Recent advances in *Brucella*- phage research. *Vet. Bull.* 54: p 65-74 (1984).
17. Crespo, I.F.: Brucelosis ovina y caprina. *Office International des Epizooties*. Paris, 1994.
18. Cheville, N.F.; Jensen, M.S.; Halling, S.M.; Tatum, F.M.; Morfitt, D.C.; Hennager, S.G.; Frerichs, W.M. and Schurig, G.G.: Bacterial survival, lymph node changes and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 53: p 1881-1888 (1992).
19. Cheville, N.F.; Stevens, M.G.; Jensen, A.E.; Tatum, F.M. and Halling, S.M.: Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 34: (10). p 1591-1596 (1993).
20. Díaz, A.E.; Prado, F.J.; Ontiveros, L. y Batalla, D: Evaluación serológica de anticuerpos posvacunales en cabras adultas vacunadas con una dosis reducida de Rev 1 en una zona enzoótica de Brucelosis. *Tec. Pec. Mex.* 47: p 137-141 (1984).
21. Díaz, A.E.; Ayala, G.; Céspedes, M.; Sánchez, V.; Rivero, L. and Prado, F.: Epidemiological study of caprine brucellosis in Aldama, Chihuahua, Mexico and implementation of a control program. Preliminary results. *Animal disease diagnostics in Latinoamerica*, San José de Costa Rica, 1990. p 5. *IFS-FAO-IAEA* (1990).
22. Díaz, A.E.: Diagnóstico serológico en la brucelosis caprina. Tesis Doctoral. *Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra*. España, 1993.

23. Diaz, A.E.: Perspectivas de la investigación sobre brucelosis caprina. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Acapulco, México, 1994. p 515-517 (1994).
24. Diaz, R.; Jones, L.M.; Leons, D. and Wilson, J.B.: Surface antigens of smooth brucellae. *J. Bacteriol.* 96: p 893-901 (1981).
25. Elberg, S.S.: Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II 1968-1980. *Vet. Bull.* 51: p 67-72 (1981).
26. Enright, F.M.; Walker, J.; Schurig, G.G. and Buhrman, D.: *Brucella abortus* RB51: A better bovine *Brucellosis* vaccine. *ADRWSS*, 1990. Raleigh, N.C. p 2 (1990).
27. FAO/OMS. Comité mixto de expertos en brucelosis. Sexto informe. *Organización Mundial de la Salud*. Ginebra, 1986.
28. García, C.: La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. *Office International des Epizooties*. Paris, 1987.
29. Jiménez de Bagüés, M.P.; Marin, C.M.; Barberán, M. and Blasco, J.M.: Responses of ewes to *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine administered by subcutaneous or conjuntival routes at different stages of pregnancy. *Ann. Rech. Vet.* 20: p 205-213 (1989).
30. Jiménez de Bagüés, M.P.; Elzer, P.H.; Jones, S.M.; Blasco, J.M.; Enright, F.M.; Schurig, G.G. and Winter, A.J.: Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* 62: 11 p 4990-4996 (1992).

31. Jiménez de Bagüés, M.P.; Elzer, P.H.; Blasco, J.M.; Marín, C.M.; Gamazo, C.; Enright, F.M.; Schurig, G.G. and Winter, A.J.: Mechanism of protection against homologous and heterologous *Brucella* species by vaccination on mice with *B. ovis* hot saline extract and live *B. abortus* rough strain RB51. Conference Research Workers in Animal Diseases. Chicago, Illinois. p23 (1993).
32. Jiménez de Bagüés, M.P.; Barberán, M.; Marín, C.M. and Blasco, J.M.: Protective efficacy of *Brucella abortus* RB51 vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 12: p 1-6 (1994).
33. López, M.A.: Brucelosis: Avances y perspectivas. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Publicación técnica No. 6* México, 1991.
34. López, M.A.; Migranas, O.R.; Pérez, M.A.; Magos, C.; Salvatierra, B.J.; Tapia, C.B.; Valdespino, J.L. y Sepúlveda, J.: Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud. Pub. Méx.* 34: 2, p 230-240 (1992).
35. Mancera, M.A.; Díaz, A.E.; Vázquez, N.J.; Velázquez, Q.F.; Suárez, G.F. y Flores, C.R.: Vacunación de cabras con la cepa rev 1 de *B. melitensis* en diferentes dosis: Evaluación serológica y desafío. *Rev. Vet. Méx.* 2: p 117-123 (1992).
36. Memorias de la Tercera Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo de Sanidad Animal. México, 1994. p 230-235 (CONASA-FMIZ (1995).
37. Memorias de la Cuarta Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo de Sanidad Animal. México, 1995. p 189-196 CONASA-FMVZ (1996).

38. Nielsen, K.H.; Cherwonogrodzky, J.; Duncan, J.R. and Bundle, D.R.: A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle. *Vet. Immunol. Immunopath.* 18: p 331-347 (1988).
39. Norma Oficial Mexicana: NOM-022-SSA2-1994 para la prevención y control de la brucelosis en el hombre en el primer nivel de atención. Secretaría de Salud. *Diario Oficial de la Federación*. México, 1995.
40. Norma Oficial Mexicana: NOM -041-ZOO-1995. Campaña nacional contra la brucelosis en los animales. Secretaría de Agricultura, Ganadería y desarrollo Rural. *Diario Oficial de la Federación*. México, 1996.
41. Olsen, C.S.; Cheville, N.F.; Stevens, M.G.; Houng, H.H.; Drazek, E.S.; Hadfield, T.L.; Warren, R.L. and Hoover, D.L.: Lymphocyte proliferative responses of goats vaccinated with *Brucella melitensis* 16M or a Δ purE 201 strain. *Infect. Immun.* 65: 7. p 2987-2991 (1997).
42. Palmer, M.V.; Olsen, S.C.; Stevens, M.G. and Cheville, N.F.: Placentitis induced by *Brucella abortus* strain RB51 in pregnant cattle. Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 1995. p 104-107 (1995).
43. Price, R.E.; Templeton, J.W. and Adams, L.G.: Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopath.* 26: 4 p 353-365 (1990).
44. Robertson, L.; Farrell, I.D. and Hinchliffe, P.M.: The isolation of *Brucella* from contaminated sources. A review. *Br. Vet. J.* 33: p 93-100 (1977).

45. Roop, R.M.; Jeffers, G.; Bagchi, T.; Walker, J.; Enright, F.M. and Schurig, G.G.: Serologic reactivity of mice, cattle and goats to RB51, a rough strain of *Brucella abortus*. Abstracts of the Sixty-seventh Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease. p 17 (1986).
46. Roop, R.M.; Jeffers, G.; Bagchi, T.; Walker, J.; Enright, F.M. and Schurig, G.G.: Experimental infection of goat fetuses *in utero* with a stable rough mutant of *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.* 51: p 123-127 (1991).
47. Ruíz, C.M.: Brucelosis. 3^a ed. *La Prensa Médica Mexicana*. México, 1986.
48. Salman, M.D.: Epidemiology of brucellosis. Memorias Magistrales del Simposio Internacional de Brucelosis caprina. *FMVZ-UAZ Asoc. Mex. de Prod. Caprina*. Zacatecas, México p 22-25 (1995).
49. Sánchez-Mejorada, P.H.: *Brucella melitensis*. Brucelosis. II Foro Nacional, México 1988 p 22-24. *UNAM-CANIFARMA-SARH*. México (1988).
50. Schurig, G.G.; Hammemborg, C. and Finkler, B.: Monoclonal antibodies to *Brucella* surface antigens associated with the smooth lipopolysaccharide complex. *Am. Vet. res.* 45: p 967-971 (1984).
51. Schurig, G.G.; Roop, M.R.; Bagchi, S.B.; Buhrman, D. and Sricanganathan, N.: Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28: p 171-188 (1991).

52. Schurig, G.G.: Important immunological considerations for the development of an effective vaccine using *B. abortus* strain as a model. Simposio Internacional de Actualización en brucelosis. *FAMIZ-UNAM*. México, 1994 p 1-6 (1994).
53. Séptimo Censo Agropecuario 1991. *Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática*. México (1991).
54. Siegel, S.: Estadística no paramétrica. 1ª ed. *Editorial Trillas*. México, 1982.
55. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Información preliminar 1997. *Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud*. México 1997.
56. Smith, L.D. and Heffron, F.: Transposon mutagenesis of *B. abortus*. *Infect. Immun.* p 2774-2776 (1987).
57. Soto, L.; Rojas, X. y Alonso, O.: Estudio *in vitro* del efecto de las fracciones de pared celular de *Brucella* sobre la actividad de leucocitos polimorfonucleares en bovinos. *Arch. Med. Vet.* 7: p 27-33 (1991).
58. Stevens, M.G.; Olsen, S.C. and Pugh, G.W.: Murine spleen cell proliferative responses immunodominant antigens of *Brucella abortus* strain 2308 y RB51. Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago, Illinois. p 23 (1993).
59. Stevens, M.G.; Olsen, S.C.; Pugh, G.W. and Palmer, M.V.: Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51 or 2308. *Infect. Immun.* 62: p 3206-3212 (1994).

- 60.** Stevens, M.G.; Olsen, S.C. and Cheville, N.F.: Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308 proteins in RB51-vaccinated or 2308-infected cattle. Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago, Illinois p 52 (1995).
- 61.** Villegas, A.H.: Estudio bacteriológico y fagotipificación de brucelas aisladas de caprinos y bovinos. Tesis de licenciatura. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, 1997.*
- 62.** Winter, J.A.: Mechanism of protective immunity against *Brucella abortus* in the mouse model system of infection. Advances in brucellosis research. Edited by Adams, G.L. p 137-141. *Texas A&M University Press. USA (1990).*

Cuadro 1.- Resultados de las técnicas bioquímicas aplicadas para la tipificación de la cepas sospechosas de *Brucella* aisladas de los órganos obtenidos al sacrificio.

No. de animal	Organos con aislamiento	Necesidad de CO ₂	Producción de H ₂ S	Ureasa	Citrato	TSI	Crecimiento en presencia de colorantes (µg/ml)						Acriflavina	Aglutinación con antisueños		Especie	Biotar
							Tioanina			Fucsina básica		Saltranina		A	M		
							10	20	40	10	20						
02 ¹	SM ¹ , B ²	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<i>B. melitensis</i>	1	
04 ²	SM ¹	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<i>B. melitensis</i>	1	
07 ³	SM ¹ , B ²	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<i>B. melitensis</i>	1	
14 ⁴	SM ¹	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<i>B. melitensis</i>	1	
16 ⁵	SM ¹	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<i>B. melitensis</i>	1	
17 ⁵	SM ¹ , PE ³ , RM ⁴ , GM ⁵	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<i>B. melitensis</i>	1	
216 ⁵	SM ¹ , UT ⁶	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	<i>B. melitensis</i>	1	
CEPAS CONTROL																	
16 M (a)		-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+			
544 (b)		+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-			
19 (c)		-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-			
RB51 (d)		-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-			

1 Infonodulo Submandibular

2 Hazo

3 Infonodulo Preescapular

4 Infonodulo Retromamario

5 Utero

k pertenecientes al grupo testigo

v perteneciente al grupo vacunado

(a) Cepa de referencia biovariedad 1 de *B. melitensis*

(b) Cepa de referencia biovariedad 1 de *B. abortus*

(c) Cepa vacunal de *B. abortus*

(d) Cepa rufosa de *B. abortus*

Cuadro 2.- Resultados de la fagotipificación de la cepas sospechosas de *Brucella* aisladas de los órganos obtenidos al sacrificio de los animales.

No. de Animal	Organos con aislamiento	Tb ^a	Tesis a la DCP* por los bacteriofagos				Especie	Biovareidad
			Wb ^b	Ei ^c	Bk ^d	R C ^e		
02	SM ¹ , B ²	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	1
04	SM ¹	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	1
07	SM ¹ , B ²	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	1
14	SM ¹	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	1
16	SM ¹	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	1
17	SM ¹ , PE ³ , RM ⁴ , GM ⁵	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	1
21b	SM ¹ , UT ⁶	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	1
CEPAS CONTROL								
<i>B. melitensis</i>	16 M (Cepa de referencia)	-	-	-	1 P	-	<i>B. melitensis</i>	
<i>B. abortus</i>	543 (Cepa de referencia)	1	1	1	1	-	<i>B. abortus</i>	
<i>B. abortus</i>	S19 (Cepa vacunal)	1	1	1	1	-	<i>B. abortus</i>	
<i>B. abortus</i>	RB51 (Cepa mutante R)	-	-	-	-	+	<i>B. abortus</i>	

* Dilucion corriente de prueba

a Tbilisi

b Weybridge

c Firenze

d Berkeley

e R C (para cepas rugosas)

1 Linfonodulo Submandibular

2 Bazo

3 Linfonodulo Preescapular

4 Linfonodulo Retromamario

5 Glandola Mamaria

6 Utero

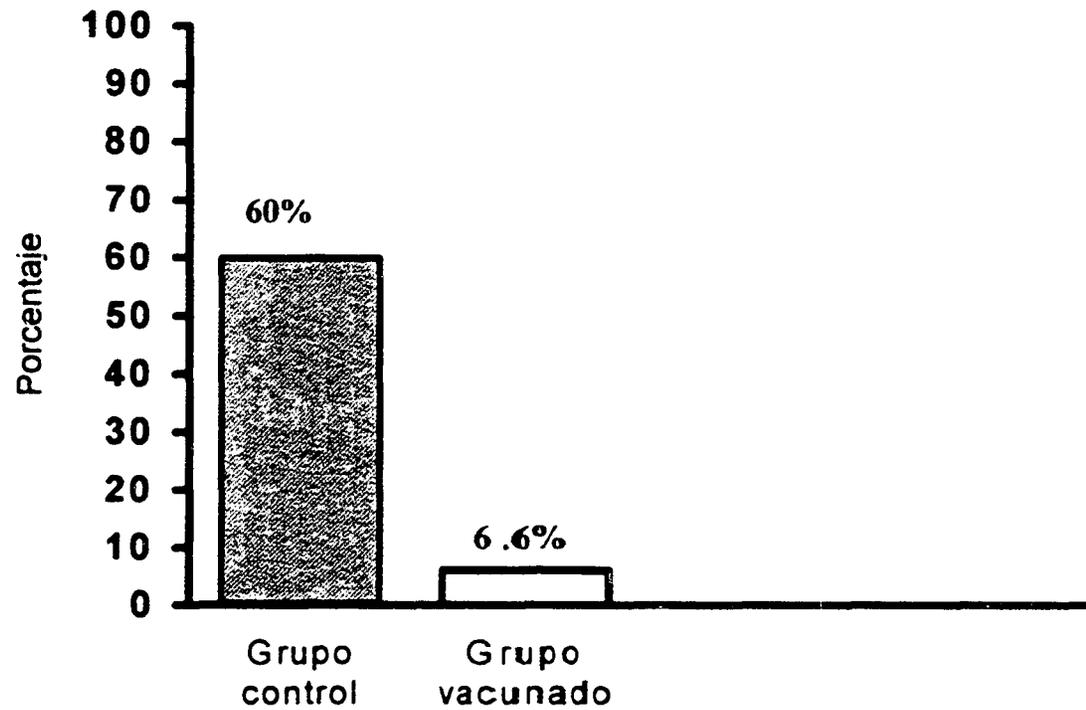


Figura 1.- Porcentajes de aislamiento de la cepa de desafío (*B. melitensis* biovar. 1) en los órganos obtenidos al sacrificio de las cabras del grupo control y del grupo vacunado.

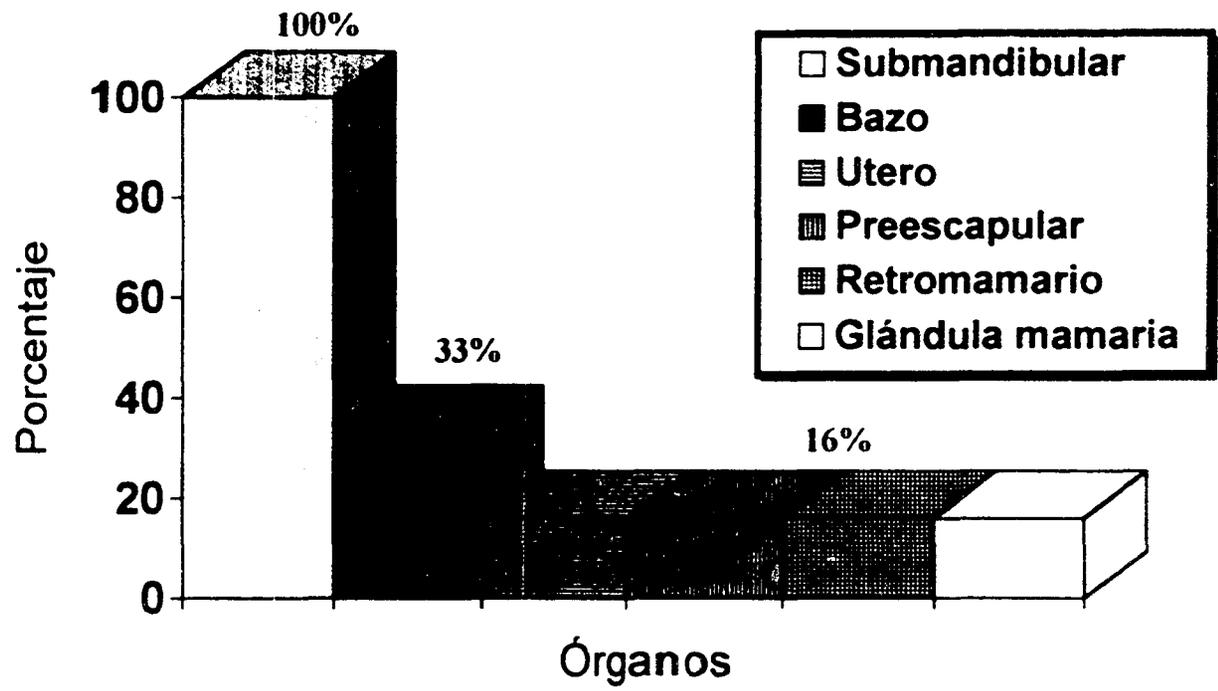


Figura 2.- Porcentaje de aislamiento de la cepa de desafío (*B. melitensis* biovar.1) en cada uno de los órganos obtenidos de las cabras al sacrificio.

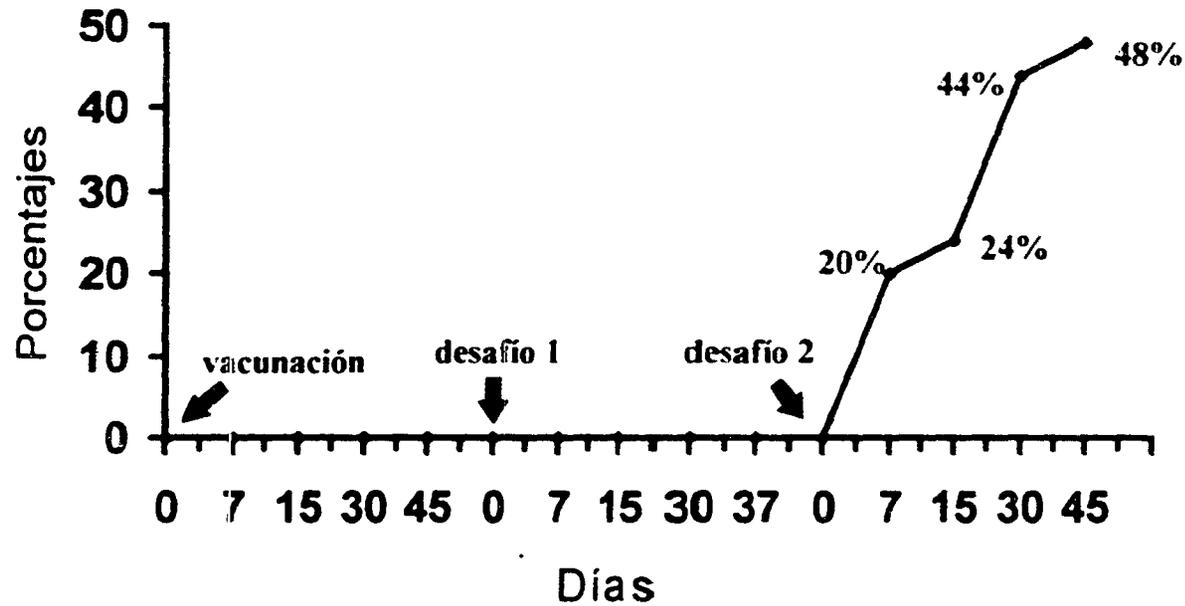


Figura 3.- Porcentaje general de seroconversión obtenido con la prueba de tarjeta al 3% con antígeno liso en los sueros de las cabras obtenidos a partir del día de la vacunación hasta el último día de muestreo.

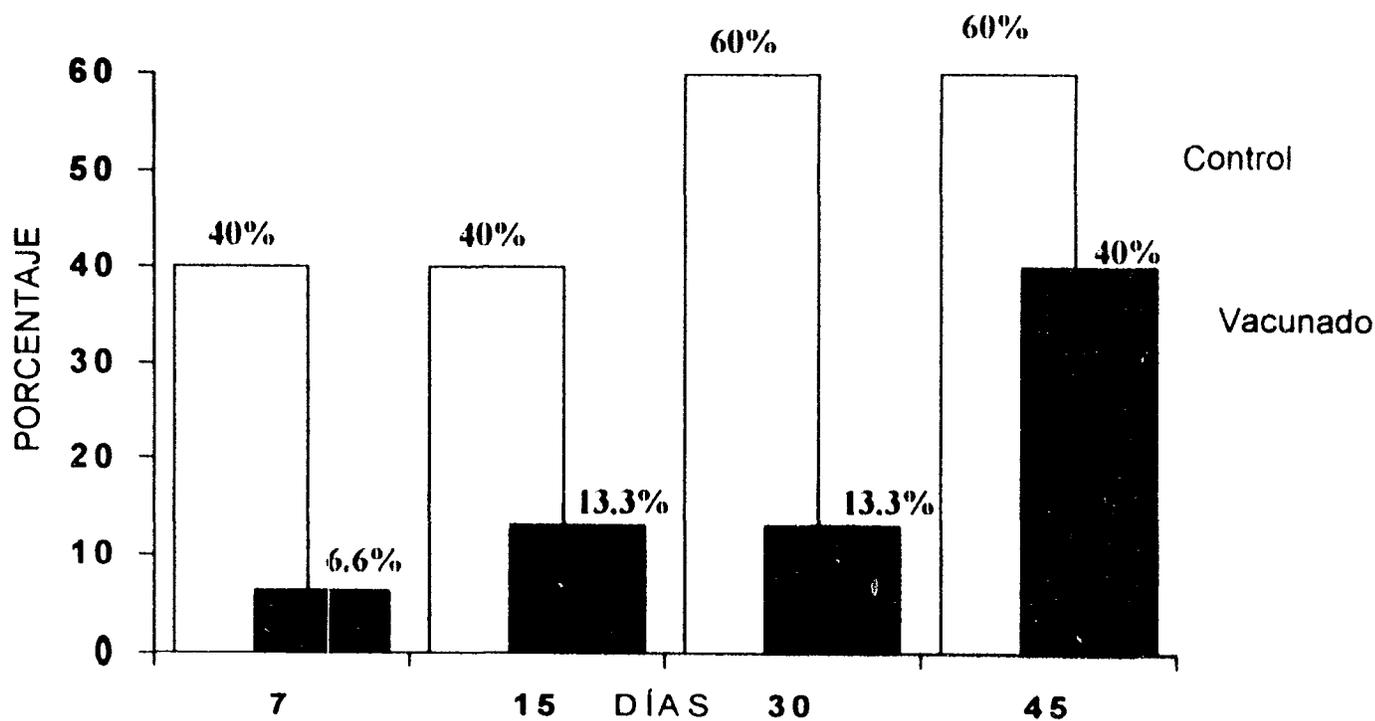


Figura 4.- Porcentaje de seroconversión obtenido con la prueba de tarjeta al 3% con antígeno liso en los sueros de las cabras del grupo control y del grupo vacunado después del segundo desafío con *B. melitensis*.

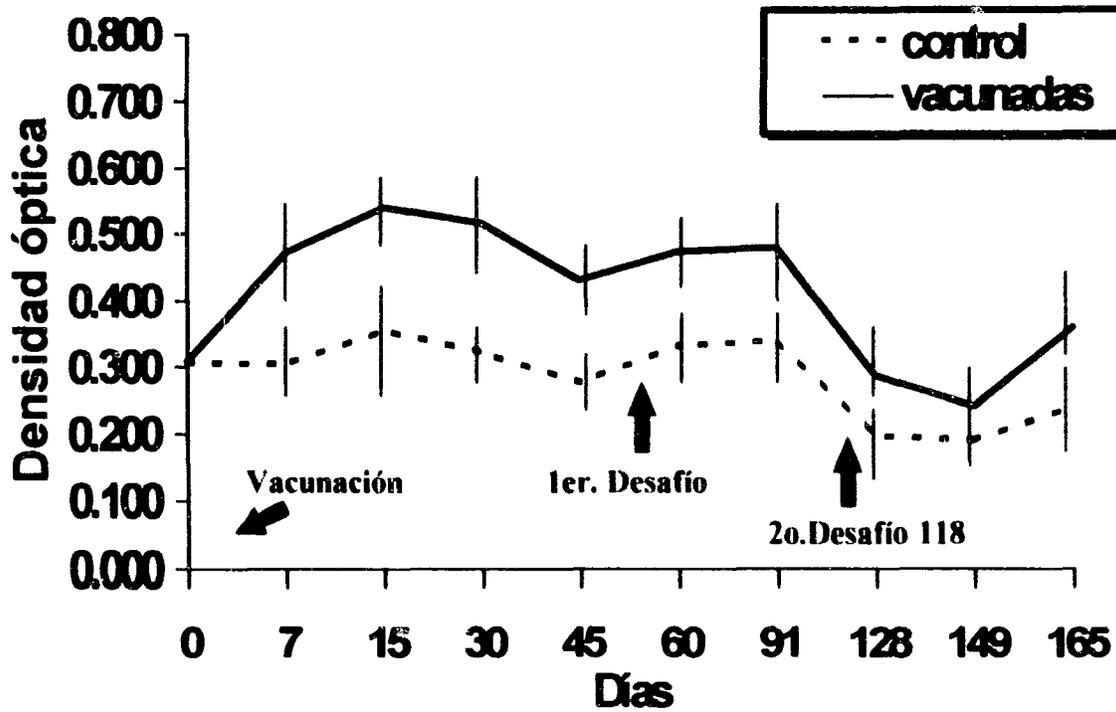


Figura 5.- Perfiles serológicos de las cabras del grupo vacunado con RB51 y del grupo control sin vacunar obtenidos a través de la prueba de ELISA indirecta con antígeno rugoso durante todo el estudio.