

01674
16



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“PROTECCION CONFERIDA POR LA VACUNACION
CON REV 1 *Brucella melitensis*; RB51 y rfbK
Brucella abortus, EN BORREGAS DESAFIADAS
EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella melitensis*.”

299733

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL
P R E S E N T A :
VIRGINIA LOCHOA DIAZ

TUTOR: FRANCISCO SUAREZ GÜEMES

COMITE TUTORAL: EFREN DIAZ APARICIO
ABEL CIPRIAN CARRASCO



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente estudio es parte del Proyecto aprobado y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con número K0028B. El estudio contó con el apoyo de diferentes instituciones: El laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias CENID Microbiología, el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y colaboraciones de Texas A&M University.

DEDICATORIAS

- ♦ A la memoria de mis abuelos, quienes son recordados con mucho amor, así como a mi abuelito Pablo.
- ♦ A mis padres: José Luis y Virginia por toda la comprensión y amor que me han brindado.
- ♦ A mis hermanos: J. Antonio, Gabriela, Leonardo, Esther, J. Luis, J. Guadalupe y Rafael porque siempre estuvieron con cariño apoyándome al igual que mis tíos: J. Guadalupe, Esther y Ofelia.
- ♦ A mi esposo Ricardo, a quien agradezco el estar en los momentos más importantes de mi vida, brindándome todo su amor, paciencia y apoyo. TA.
- ♦ A mi próximo gran amor, Luis Ricardo.
- ♦ A mis queridas sobrinas: Itzel y María Fernanda por todo el amor que me han dado.
- ♦ A Monina por todo el cariño y amor que me brindo toda su vida.

AGRADECIMIENTOS

- ♦ A los Drs. Efrén Díaz, Francisco Suárez que me dieron la oportunidad y el apoyo para la realización de este trabajo.
- ♦ De manera muy especial a la Dra. Laura Hernández Andrade quien siempre estuvo apoyándome con sus conocimientos durante todo el tiempo que duro el experimento, así como también la colaboración de los Drs. Victor Tenorio y Dionicio Córdoba.
- ♦ A todo el Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- ♦ A todas aquellas personas que colaboraron conmigo en la realización de esta tesis.

RESUMEN

Virginia Ochoa Díaz. PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN CON REV 1 *Brucella melitensis*; RB51 y rfbK *Brucella abortus*, EN BORREGAS DESAFIADAS EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella melitensis*. Asesorado por: Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Efrén Díaz Aparicio.

El objetivo fue determinar la protección conferida por la vacunación con cepas rugosas y lisas de *Brucella*, en borregas desafiadas experimentalmente con *Brucella melitensis*. Se trabajó con 64 borregas adultas de la raza Ramboillete seronegativas y no vacunadas contra la brucelosis. Para el estudio se dividieron en cuatro grupos de 16 animales. El grupo 1 fue el testigo negativo no vacunado, los grupos 2 y 3 fueron constituidos por animales vacunados con cepas rugosas de *Brucella abortus* RB51 y rfbK a una dosis de 2×10^8 y 4×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) respectivamente, el grupo 4 se vacunó con *Brucella melitensis* Rev 1 a una dosis de 1×10^5 UFC. A los 60 días posteriores de la vacunación se evaluó la respuesta inmune celular por la aplicación por vía intradérmica, de una brucelina comercial. Se tomaron muestras de suero posteriores a la vacunación a los días: 0,15,30,60,90,120,150,180 y 210 y a los 15,30,45 y 60 posteriores al desafío, para determinar la respuesta humoral mediante la prueba de tarjeta (PT) al 3% y la prueba de ELISA Indirecto con dos antígenos, uno para la detección de la respuesta a cepas lisas y otro para cepas rugosas. A los 210 días posteriores a la vacunación, todos los grupos fueron expuestos a una infección experimental con una dosis de 1×10^5 UFC de la cepa 133 de *B. melitensis*, biotipo 1, por vía conjuntival. Antes del desafío, los animales fueron instalados en unidades de aislamiento y a los 60 días posteriores al desafío fueron sacrificados de manera humanitaria. Se obtuvieron muestras de nódulos linfáticos submaxilares, preescapulares, retromamarios y mesentéricos, así como del bazo, útero y glándula mamaria. Las muestras se maceraron y se inocularon en medio de Farrell por duplicado y se incubaron a 37 C por diez días con y sin 10% de CO₂. Para la

identificación de especie de las cepas sospechosas se realizaron pruebas bioquímicas, de crecimiento en colorantes y antibióticos. Para la diferenciación de las cepas rugosas de las lisas se utilizó la prueba en acriflavina y la tinción con cristal violeta. Solo en el grupo 4 hubo un 93% de reactores a la PT a los 15 días posteriores a la vacunación, después disminuyeron gradualmente. Posterior al desafío, de la totalidad de los animales solo tres no seroconvirtieron (18.75%). Los resultados a ELISA evidenciaron una respuesta humoral para las tres vacunas probadas. La respuesta a la brucelina se dio en los tres grupos vacunados en más de un 90%. Del grupo control se logró aislar la cepa del desafío en siete de los animales. Al desafío experimental la Rev 1 y la *rfbK* dieron un 87.5% de protección, mientras que la RB51 dio un 81.25%. Por lo que se concluye que las tres vacunas protegen a los ovinos en la etapa adulta, aunque la RB51 protege en menor proporción.

Palabras clave: Vacunación, Rev 1, RB51, rfbK, B. melitensis, ovinos.

SUMMARY

Virginia Ochoa Díaz. PROTECTION CONFERRED BY VACCINATION WITH REV 1. *Brucella melitensis*; RB51 y *rfbK Brucella abortus*, IN SHEEPS EXPERIMENTALLY CHALLENGED WITH *Brucella melitensis*.

The goal in this work was to determine the protection conferred by vaccination with rough and smooth strains of *Brucella* in sheeps, experimentally challenged with *Brucella melitensis*. Sixty four adult female sheeps of Ramboillete breed, all seronegatives and not vaccinated against brucellosis were use in this study. The animals where divided into four groups of 16 animals each one. Group 1 was the negative unvaccinated control, groups 2 was vaccinated with rough strain of *B. abortus* RB51 in doses of 2×10^8 colony forming units (CFU), group 3 was vaccinated with rough strain of *B. abortus rfbK* in doses of 4×10^8 CFU, and group 4 was vaccinated with Rev 1 of *Brucella melitensis*, in doses of 1×10^5 CFU. Sixty days after vaccination Delayed-Type Hypersensitivity Test (DTH) was determined to evaluated the cellular immune response. Serum Samples of serum where collected on days 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 after vaccination, and on days 15, 30, 45 and 60 after the challenge, to determine the humoral response through the card test (CT), at 3% and the Indirect ELISA test with two antigens, one for detection of response to smooth strain vaccin, and another for rough strains vaccines. After 210 days from vaccination, all the groups where exposed to an experimental challenge with 1×10^5 CFU of *Brucella melitensis* strain 133, biotype 1, using conjuntival inoculation. Before the challenge, the animals where housed in isolation units, and 60 days after the challenge where humanitarianly sacrificed. Samples where obtained from the following lypho nodes: submaxilar, prescapular, retromamary and mesenteric, and from the spleen, uterus and mamary gland. These where macerated and inoculated in duplicate through Farrel medium, and where incubated at 37 C during ten days with and without 10% CO₂. To identify the species of the suspicious strains, biochemical tests, of

colorant growth and growing antibiotics were performed. To differentiate the rough strains from the smooth strains, the acriflavin test was done, and stain with violet crystal. Only group 4 had a 93% of reactors to CT, 15 days posterior to vaccination, after which they diminished gradually. After the challenge, only three of all animals did not seroconvert. The ELISA test results showed a humoral response for the three vaccines tested. The response DTH occurred in the three vaccinated groups, in more than 90% of the animals. From the control group, the challenge strain was successfully isolated from 7 out of the 16 animals. Rev 1 and *rfbK* conferred a 87.5% protection, while the RB51 gave a 81.25% protection to the experimental challenge. Thus, the 3 vaccines protect the sheeps in mature stage nevertheless RB51 offers a relative less protection.

Key words: Vaccination, Rev 1, RB51, rfbK, B. melitensis, Sheep.

INDICE

Resumen.....	V
1. Introducción.....	1
1.1 Estructura y características del microorganismo.....	3
1.2 Sobrevivencia Intracelular.....	6
1.3 Proceso Inmune.....	8
1.4 Vacunación.....	9
2. Justificación.....	11
2.1 Hipótesis.....	12
2.2 Objetivos.....	12
3. Material y Métodos.....	14
3.1 Animales estudiados.....	14
3.1.1 Criterios de inclusión.....	14
3.1.2 Criterios de exclusión.....	14
3.1.3 Sincronización de celos.....	15
3.1.4 Alimentación.....	16
3.2 Determinación de unidades formadoras de colonias de cada vacuna.....	16
3.3 Estudio Serológico.....	17
3.3.1 Prueba de Tarjeta al 3%.....	17
3.3.2 Prueba de ELISA Indirecta.....	18
3.4 Prueba de Intradermoreacción.....	20
3.5 Desafío.....	20
3.6 Estudio Bacteriológico.....	21
3.7 Análisis Estadístico.....	22
3.8 Ubicación del Estudio.....	22
4. Resultados.....	23

4.1 Sincronización de celos y gestación.....	23
4.2 Conteo Celular de las vacunas.....	23
4.3 Estudio serológico	24
4.3.1 Prueba de tarjeta al 3%.....	24
4.3.2 ELISA Indirecto utilizando como antígeno LPS de <i>B. melitensis</i>	24
4.3.3 ELISA Indirecto utilizando como antígeno células completas de <i>B. abortus</i> carentes de cadena O.....	29
4.4 Prueba de Intradermoreacción.....	32
4.5 Estudio Bacteriológico.....	34
5. Discusión.....	41
6. Conclusiones.....	52
7. Literatura citada.....	54
8. Anexos.....	62

LISTADO DE CUADROS

- Cuadro 4.4.1 Promedio en porcentaje de las lecturas de la intradermoreacción al muestreo basal y a las 48 hs posteriores a la aplicación de la brucelina en los cuatro grupos de ovinos estudiados.
- Cuadro 4.5.1.1 Porcentaje de aislamiento de la cepa de desafío de *B. melitensis* en los ovinos de los cuatro grupos estudiados.
- Cuadro 4.5.1.2 Porcentaje de aislamientos por órganos y nódulos linfáticos de la cepa de desafío de *B. melitensis*, en cada uno de los grupos (7 aislamientos en control, 3 en RB51, 2 en *rfbK* y 2 en Rev 1)
- Cuadro 4.5.3.1 Resultados del crecimiento en colorantes, sensibilidad a antibióticos, observación con cristal violeta y prueba en acriflavina de las 14 cepas de *B. melitensis* aisladas.

LISTADO DE GRÁFICAS

Gráfica 4.3.1.1 Porcentajes de sueros positivos a la prueba de tarjeta, en cuatro grupos de ovinos, posterior a la vacunación y al desafío con *Brucella melitensis*.

Gráfica 4.3.2.1 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno LPS de *B. melitensis*, en muestreos posvacunación.

Gráfica 4.3.2.2 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno LPS de *B. melitensis*. Muestreos al posdesafío experimental con *B. melitensis*.

Gráfica 4.3.3.1 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno células completas de RB51, en muestreos posvacunación.

Gráfica 4.3.3.2 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno células completas de RB51. Muestreos posdesafío experimental con *B. melitensis*.

Gráfica 4.4.1 Porcentaje de reactores por grupo de ovinos a la prueba de Intradermoreacción realizada a los 60 días posvacunación.

Gráfica 4.5.1.1 Porcentaje total de aislamientos por órganos y nódulos linfáticos de la cepa de desafío *B. melitensis* 133, en los cuatro grupos de ovinos.

PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN CON REV 1 *Brucella melitensis*: RB51 y *rfbK* *Brucella abortus*, EN BORREGAS DESAFIADAS EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella melitensis*.

1. INTRODUCCIÓN

Un desequilibrio dentro de un ecosistema natural, provoca el brote de algunas enfermedades y como el ecosistema cambia continuamente provoca que se modifiquen los procesos internos debido a presiones externas. De manera que, aquellas enfermedades que emergen y que son transmitidas al hombre, tienen un fuerte impacto en las diferentes sociedades y culturas que se han dedicado a la domesticación y reproducción de animales, que son destinados principalmente al consumo (Villa, 1996; Lugo, 1996).

La brucelosis es una enfermedad infecciosa que afecta tanto al hombre como a los animales, siendo los bovinos, ovinos y caprinos, las especies más afectadas. Los médicos veterinarios, matanceros, laboratoristas y la gente que trabaja en las unidades de producción tienen mayor riesgo de contagiarse. El riesgo de contraer la enfermedad varía de acuerdo a la especie bacteriana y a la dosis infectante. Al no existir un procedimiento efectivo para evitar el contagio al humano, que es principalmente por *B. melitensis*, se tiene que pensar en un programa de control de la enfermedad, para poder conseguir su eventual erradicación.

Diversas organizaciones de salud consideran a la brucelosis como la zoonosis más difundida del mundo. Históricamente los programas de control y erradicación de la brucelosis en los animales tiene como base el diagnóstico, llevando a cabo un programa

de sacrificio de los animales infectados y vacunando a los animales jóvenes. Esta estrategia de control ha resultado ser eficiente, ya que no solo ha reducido el número de los animales infectados, sino que también se ha reflejado en el descenso del contagio a humanos, sin embargo esto ha sido posible en países que presentaban una prevalencia baja de la enfermedad (Sales et al.,1992). En cambio en zonas con alta prevalencia, este plan no es factible de realizar, por lo que se requiere de la aplicación de un programa de profilaxis vacunal para evitar que se difunda la enfermedad, sin embargo, se debe de tener en cuenta que al utilizarse por sí solos los programas anteriores (zonas con baja y zonas con alta prevalencia) no se llega a un control del problema, por lo que es recomendable pensar en una combinación de ambos (Blasco, 1998).

En la mayor parte del mundo la brucelosis ovina suele ocurrir en los rebaños después de la compra e introducción sin cuarentena de animales infectados o por la excreción de las brucelas al momento del parto, ya que *B. melitensis* se caracteriza por ser una cepa lisa virulenta que está presente en la vagina y en los restos placentarios de las borregas infectadas. Esto, aunado a la sobrevivencia de la bacteria cuando las condiciones del suelo, humedad y temperatura son adecuadas, contribuye a la infección de más animales por vía oral o respiratoria. Se considera que para que la enfermedad se establezca en un animal, la dosis mínima infectante es de 1×10^5 bacterias. En el caso de la brucelosis causada por *B. ovis* esta, a semejanza de *B. melitensis*, penetra en los tejidos por mucosas como la oral, conjuntival, nasal, peneana o rectal. Se llega a localizar en células del sistema retículo endotelial de diferentes órganos, en el epidídimo y en glándulas sexuales accesorias, por lo que ya infectado un animal, la excreta en el semen o en secreciones genitales, por lo que la transmisión venérea es la principal vía de contagio. Se ha observado que una hembra puede ser montada por varios sementales lo que permite la diseminación de la enfermedad entre

estos. A comparación de los machos, las hembras parecen ser resistentes a *B. ovis*, aunque en ocasiones pueden llegar a tener abortos o problemas reproductivos (Blasco y Barberan, 1990).

La importancia de la brucelosis ovina causada por *B. melitensis* radica en el hecho de que produce abortos en el último tercio de gestación o el nacimiento de corderos prematuros poco viables que mueren a los pocos días, esto naturalmente tiene un fuerte impacto en la economía del productor (Blasco y Barberan, 1990).

México en 1998 contaba con una población ovina promedio de seis millones de cabezas, concentrándose en un 55% en los estados de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Querétaro, Michoacán, Zacatecas, Morelos y Guanajuato; un 23% del censo está en Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León y Tamaulipas, mientras que la zona sur que comprende a Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Tabasco y Yucatán tiene un 16 %; y por último el 6% restante esta distribuido en los estados restantes del país (Arteaga, 1999; INEGI, 1996). Actualmente el programa de control de la brucelosis ovina en nuestro país, radica en la aplicación de la vacuna Rev 1 de *B. melitensis*. La cobertura de vacunación en la actualidad es baja, pero se espera que en los próximos años se tome mayor conciencia de su importancia haciéndola cada vez más amplia.

1.1 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO

Las bacterias que pertenecen al género *Brucella*, son cocobacilos Gram negativos que se agrupan en siete especies, que aunque tienen preferencia por un tipo de hospedero, frecuentemente producen infecciones cruzadas, que se diferencian entre sí por su virulencia. Se sabe que *B. abortus* infecta preferentemente al ganado vacuno,

mientras que *B. melitensis* infecta al ganado caprino y ovino, *B. ovis* al ovino, *B. suis* al porcino, *B. neotomae* a la rata del desierto, *B. canis* a perros, y *B. maris* a mamíferos marinos. Algunas de estas especies son transmitidas al hombre, con la excepción de *B. ovis*, *B. neotomae* y se desconoce si *B. maris* pudiera infectarlo (Blasco y Gamazo, 1994).

El género muestra una gran resistencia a factores ambientales, lo que permite a las brucelas permanecer durante largo tiempo viables en la paja y polvo de los establos o en los alimentos, como la leche, queso y mantequilla; *B. melitensis* y *B. suis* pueden sobrevivir hasta cuatro meses en esta última (Blasco y Gamazo, 1994).

La brucela es una bacteria intracelular facultativa y a semejanza de otras bacterias Gram negativas, los componentes de su envoltura celular tienen mucho que ver con su resistencia a los factores ambientales. Cuenta con una membrana externa que representa su primera barrera de defensa a la acción tóxica de sales biliares, ácidos grasos y glicéridos, así como de enzimas proteolíticas y glicosidasas (Blasco y Gamazo, 1994).

A diferencia de otras bacterias Gram negativas, a la fecha no se han reportado estructuras en su superficie tales como fimbrias o material capsular, cápsula o exotoxinas, aunque se han identificado en *B. abortus* unas secuencias compatibles con moléculas proteicas adhesivas no fibrilares que son semejantes a las adhesinas (Pizarro et al., 1999).

El género presenta en la membrana externa un componente principal que es el lipopolisacárido (LPS), el cual es un antígeno inmunodominante que consta de un glicolípido (lípid A), un núcleo glicosídico y un polisacárido (cadena O). El lípid A

contiene glucosamina y diaminoglucosa. El núcleo está cualitativamente formado por el ácido 3-deoxi-D-manoctulosónico (KDO), manosa, glucosa y quinosa, por el cual se une la cadena O. Las especies de este género se diferencian por ser lisas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. maris*) o rugosas (*B. ovis* y *B. canis*). El carácter liso o rugoso radica en la presencia o ausencia de la cadena O (polisacárido, homopolímero de N-formil-perosamina) del LPS. Los mutantes rugosos carecen de quinosa y por tanto, de la cadena O. Otros componentes de la membrana externa son: una serie de glucanos circulares, el polisacárido B, fosfolípidos y las proteínas de membrana externa (PME). El LPS y las PME son componentes implicados como factores potenciales de virulencia (Blasco y Gamazo, 1994; Pizarro et al., 1999; Martínez et al., 1997; Sangari y Agüero, 1996).

La infección ocurre cuando la bacteria penetra en los tejidos a través de una herida en la piel, la vía conjuntival, la vía oral o por inhalación. Induce una inflamación crónica granulomatosa en los órganos que se aloja, debido a que por sus componentes quimiotácticos atraen a neutrófilos polimorfonucleares (Blasco y Gamazo, 1994; Blasco y Barberán, 1990).

El género *Brucella* ha sido asociado con el aborto al final de la gestación, esto es debido a que la bacteria tiene un tropismo hacia el eritritol, azúcar que es secretado en altas concentraciones durante la gestación y que sirve como estimulante del crecimiento de algunas especies de *Brucella*. Durante la colonización del útero gestante, la bacteria invade el epitelio trofoblástico que envuelve al embrión y se multiplica dentro de los trofoblastos eritrofagocíticos pasando después al epitelio corioalantoideo y de ahí a los tejidos vecinos, se dice que esta localización puede serle beneficiosa para su crecimiento ya que se ha sugerido que utiliza enzimas y metabolitos de las partes afectadas. El eritritol se encuentra presente en la placenta

de vacas, borregos, cabras, y cerdos, pero esta ausente en la placenta de humanos y roedores (Blasco y Gamazo, 1994; Samartino et al., 1994; Sangari y Agüero, 1996; Leonard et al., 1994).

1.2 SOBREVIVENCIA INTRACELULAR

Cuando la bacteria ha sido internalizada en las células fagocíticas, comienza la formación de un fagolisosoma, en el cual se localizan la mayoría de los compuestos bactericidas. Los mecanismos bactericidas, como la explosión respiratoria por parte de estas células del huésped, pueden ser interferidos por este género. Se ha establecido que *B. abortus* puede permanecer en el fagosoma intacto y bloquear la fusión posterior con el lisosoma. Esto le confiere protección, ante la acción de los péptidos catiónicos y enzimas líticas presentes en los gránulos lisosómicos. Se cree que la cadena O del lipopolisacárido y quizá lípidos de ornitina interactúan directamente con la membrana del fagosoma impidiendo la fusión (Martínez et al., 1997; Blasco y Gamazo, 1994; Sangari y Agüero, 1996; Orduña et al., 1994).

Se sabe que *B. abortus* sintetiza nucleótidos que probablemente actúen en la membrana del fagosoma y que inhiban la fusión fago-lisosoma por la liberación de purinas como extractos de la 5' guanosina monofosfato y adeninas, por inhibición de la mieloperoxidación hialida. Diversos autores relacionan la liberación de purinas y la presencia de la cadena O del lipopolisacárido a la sobrevivencia; ya que se ha observado que las cepas lisas de *B. abortus* (cepa 2308) son más resistentes a la destrucción intracelular en células fagocíticas y son más resistentes a la acción de sustancias bactericidas contenidas en el lisosoma.

Brucella resiste al efecto de intermediarios del oxígeno, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos, formados en los fagocitos durante la explosión respiratoria que acompaña a la fagocitosis para la destrucción de las bacterias ingeridas. Se conoce que la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, son enzimas que se han encontrado en *Brucella* y que se integran en el mecanismo de defensa que desarrollan algunos microorganismos frente a la toxicidad oxidativa. Un hallazgo importante, es que la suplementación con hierro a cultivos de macrófagos, aumentan la actividad bactericida contra el agente, pero *B. abortus* tiene un sideróforo, el 2-3- ácido dihidroxibenzoico, por medio del cual capta el hierro, el cual es requerido por el macrófago para la generación de radicales hidroxilos antibrucela, así como para la depuración de reactivos intermedios del oxígeno, lo que le permite a la brucela sobrevivir en el macrófago (Sangari y Agüero, 1996; Orduña et al., 1994; Leonard et al., 1994; Stevens et al., 1994; Stabel y Sha, 1994).

Una vez que la brucela ha entrado en un animal, esta infecta varios tipos de fagocitos no profesionales incluyendo a los del endocardio, cerebro, articulaciones y huesos. De acuerdo a múltiples observaciones *B. abortus* es incorporada dentro de los fagosomas y permanece en compartimentos membranales hasta que la célula hospedera muere. En fagocitos no profesionales *Brucella* es localizada en estructuras semejantes al retículo endoplásmico (RE) en donde se replica intracelularmente. Recientes evidencias indican que es transportada a través de la vía autofágica antes de la acumulación en el RE (Arenas et al., 2000; Pizarro et al., 1998).

Los macrófagos son particularmente importantes para la sobrevivencia y la diseminación de la *Brucella* durante la infección. El transporte intracelular de *Brucella* en esas células no ha sido totalmente caracterizado. Los resultados mostrados por

Arenas et al. (2000), indican que pronto después de la internalización, *Brucella* altera el transporte hacia compartimentos hidrolíticos y previene la fusión con los endosomas formados. Sin embargo la bacteria no previene la acidificación del fagosoma y sobrevive en vesículas que no se asemejan a estructuras del ER.

1.3 PROCESO INMUNE

La resistencia del huésped a parásitos intracelulares, esta asociada al desarrollo de una inmunidad mediada por células y por la activación de macrófagos para resistir la replicación bacteriana. Ambos fenómenos son controlados por la producción de citocinas, que funcionan como activadores de macrófagos y que algún defecto en su producción aumenta el riesgo de infectarse, por ejemplo, se ha demostrado que algunos pacientes con brucelosis tienen defectos en la producción de interferón gama (Gross et al., 1998).

Las células que han fagocitado *Brucella* procesan en los fagolisosomas los antígenos bacterianos, presentándolos en su superficie junto al complejo principal de histocompatibilidad del tipo II, el cual es reconocido por el linfocito Th, estimulando la liberación de Interleucinas (IL) como la IL2 y el interferón gama (INF γ) que son potentes estimuladores de la capacidad bactericida de la célula fagocítica. El LPS y las proteínas de la membrana externa de cepas lisas, contribuyen a la activación de la respuesta inmune. Una vez que la bacteria ha penetrado en el organismo, invade primero los nódulos linfáticos regionales; una vez que ha vencido esta barrera del sistema inmune, se disemina por la vía linfática o por la vía hemática al hígado, bazo y genitales. Se conoce que en la infección causada por *B. abortus*, ésta se aloja primariamente en las células fagocíticas, estimulando a más fagocitos a migrar debido

a que sus componentes, sus productos y su interacción con componentes séricos son quimiotácticos. Si la bacteria resiste el ataque del sistema inmunitario, se establece la infección crónica, diseminándose a los diferentes órganos antes descritos, pero en particular, en esta especie se ha demostrado que la cepa virulenta lisa evita la fusión fago-lisosoma y que se replica más eficiente de forma intracelular que alguna otra cepa atenuada (Orduña et al., 1994; Blasco y Gamazo, 1994; Pizarro et al. 1997).

1.4 VACUNACIÓN

La vacunación tiene que ser considerada como una herramienta importante para bloquear la diseminación de la brucelosis entre los animales. En nuestro país y de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995) la vacunación de ovinos, se realiza con *B. melitensis* Rev 1, que es una vacuna viva atenuada proveniente de la cepa virulenta *B. melitensis* 6056, biovariedad 1 que se revirtió hasta lograr escasa virulencia y que por clonación se obtuvo esta cepa dependiente de estreptomycinina para su crecimiento. Se utiliza en dos dosis de acuerdo a la edad. Las hembras de 3 a 4 meses de edad se vacunan con dosis clásica de 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), mientras que las hembras adultas reciben una dosis reducida de 1×10^5 UFC/ml, ambas son aplicadas por vía subcutánea (Soberón, 1997; Blasco, 1998).

En los últimos años ha surgido gran interés en la selección de cepas mutantes derivadas de cepas virulentas como la 2308 de *Brucella abortus*. Las mutantes seleccionadas carecen de la cadena O, por lo cual se les considera como cepas rugosas. Las principales características de estas cepas es la estimulación de una respuesta

inmune protectora, la corta sobrevivencia que tiene dentro del animal y una nula reversión a su virulencia. En el caso de la vacunación con cepas rugosas una ventaja es que no provocan una respuesta humoral que interfiera con el diagnóstico a través de pruebas oficiales. La vacuna RB51 se obtuvo de la cepa de *B. abortus* 2308 por medio de varios pases en medios con penicilina y rifampicina siendo de esta forma atenuada y no revertible, convirtiéndola en una opción para la diferenciación de animales vacunados de infectados (Pérez, 1997; Cheville et al., 1993; Brunet, 1997). Debido a la desventaja que presenta la Rev 1 en cuanto a la interferencia con el diagnóstico, la utilización de la RB51 provee un grado de atenuación que causa la colonización de la *Brucella* por pocas semanas en los animales, lo que les permite desarrollar una buena respuesta inmunológica. La RB51 (R= rugosa, B=*Brucella* y 51 por la nomenclatura de un laboratorio de referencia internacional), ha sido aprobada para su uso como vacuna oficial en Estados Unidos reemplazando a la cepa 19 y se ha utilizado en varios países incluyendo México. En estudios realizados en ratones también indican que la RB51 es capaz de proteger contra la infección con *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis*. Aunque en estudios en ovinos no se considera que de una buena protección contra *B. ovis*, por sí sola (Brunet, WHO).

A través de manipulaciones genéticas de la cepa virulenta de *B. abortus* 2308 se han logrado desarrollar cepas rugosas que son mutantes por transposición, esto es por medio de técnicas que interrumpen los genes que participan en la síntesis del LPS y específicamente de la síntesis de la cadena O. Las características de atenuación de estas cepas resultantes, dependen del gen o genes que son interrumpidos. Estas técnicas pueden ser de utilidad para la generación de mutantes rugosas de cualquier otra cepa lisa de *B. melitensis*, *B. abortus* o *B. suis*. Las cepas resultantes pudieran ser candidatos efectivos en la vacunación, por lo que la cepa rugosa mutante conocida

como *rfbK* esta siendo probada para ser aplicada como opción en el futuro para la vacunación de ovinos (Pérez, 1997; Brunet, 1997).

2. JUSTIFICACION

Se ha observado que en nuestro país, la infección por el género *Brucella* sucede con mayor frecuencia en gente que trabaja en el campo o que consume productos provenientes de animales infectados. La brucelosis ovina es una enfermedad endémica en México, que tiene un gran impacto tanto en la economía nacional como en salud pública porque provoca una importante disminución de la producción y por ser una zoonosis; en los ovinos es causada principalmente por *B. melitensis*. Hoy en día, en nuestro país, su distribución es amplia y no se han desarrollado de forma sistemática trabajos de prevención; es por ello que se debe de establecer un programa de vacunación efectivo para controlar la enfermedad. El uso de nuevas vacunas en ovinos pudiera ser una estrategia a probar, la vacuna aceptada por la NOM en ovinos es *B. melitensis* Rev 1, pero tiene la desventaja de inducir anticuerpos que interfieren en el diagnóstico cuando se realiza la prueba de tarjeta (PT) hasta ocho meses después de la vacunación; por lo cual es difícil diferenciar los anticuerpos producidos contra la *Brucella* por vacunación o por infección, además de que es potencialmente infectiva. Las vacunas de brucelas que carecen de la cadena O, llamadas cepas rugosas, como la RB51 y la *rfbK* pudieran ser una opción, ya que al carecer de ella, los anticuerpos que se producen después de la aplicación no interfieren en el diagnóstico serológico.

como *rfbK* esta siendo probada para ser aplicada como opción en el futuro para la vacunación de ovinos (Pérez, 1997; Brunet, 1997).

2. JUSTIFICACION

Se ha observado que en nuestro país, la infección por el género *Brucella* sucede con mayor frecuencia en gente que trabaja en el campo o que consume productos provenientes de animales infectados. La brucelosis ovina es una enfermedad endémica en México, que tiene un gran impacto tanto en la economía nacional como en salud pública porque provoca una importante disminución de la producción y por ser una zoonosis; en los ovinos es causada principalmente por *B. melitensis*. Hoy en día, en nuestro país, su distribución es amplia y no se han desarrollado de forma sistemática trabajos de prevención; es por ello que se debe de establecer un programa de vacunación efectivo para controlar la enfermedad. El uso de nuevas vacunas en ovinos pudiera ser una estrategia a probar, la vacuna aceptada por la NOM en ovinos es *B. melitensis* Rev 1, pero tiene la desventaja de inducir anticuerpos que interfieren en el diagnóstico cuando se realiza la prueba de tarjeta (PT) hasta ocho meses después de la vacunación; por lo cual es difícil diferenciar los anticuerpos producidos contra la *Brucella* por vacunación o por infección, además de que es potencialmente infectiva. Las vacunas de brucelas que carecen de la cadena O, llamadas cepas rugosas, como la RB51 y la *rfbK* pudieran ser una opción, ya que al carecer de ella, los anticuerpos que se producen después de la aplicación no interfieren en el diagnóstico serológico.

2.1 HIPÓTESIS

- Las borregas adultas vacunadas con las cepas rugosas de *B. abortus* RB51 y *rfbK* tendrán una mayor protección que las vacunadas con *B. melitensis* Rev 1 a dosis reducida, al ser desafiadas experimentalmente con *B. melitensis* cepa 133 biotipo 1.

2.2 OBJETIVOS

General:

Comparar la protección conferida por las vacunas *B. melitensis* Rev 1¹, *B. abortus* RB51² y *rfbK*³ en borregas al ser desafiadas experimentalmente con la cepa de campo *B. melitensis* 133.

Específicos:

- Determinar si una dosis de 2×10^8 UFC/ml de la vacuna RB51, por vía subcutánea, confiere protección en borregas ante el desafío experimental con *B. melitensis*.
- Establecer si la aplicación subcutánea de una dosis de 4×10^8 UFC/ml, de la vacuna *rfbK*, confiere protección en borregas ante el desafío experimental con *B. melitensis*.
- Evaluar si la vacuna Rev 1, aplicada por vía subcutánea a una dosis de 1×10^5 UFC/ml, confiere protección en borregas ante el desafío experimental con *B. melitensis*.

^{1y2}Laboratorio PRONABIVE, ³Texas A&M University

- Evidenciar la respuesta inmune humoral posterior a la vacunación por medio de la prueba de tarjeta al 3% y la técnica de ELISA indirecto utilizando antígeno rugoso y liso.
- Conocer la respuesta inmune celular tomando como indicativo la prueba de hipersensibilidad tardía.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES ESTUDIADOS

Se trabajó con 64 borregas de raza Ramboillete, seleccionadas con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

3.1.1 Criterios de inclusión :

- Con más de año y medio de edad
- Negativas a la PT
- Que no hayan sido vacunadas contra *Brucella*
- Animales que provengan de un hato negativo a la enfermedad

3.1.2 Criterios de exclusión :

- Con menos de año y medio de edad
- Sospechosas o positivas a la PT
- Que se hayan vacunado contra *Brucella*
- Animales que provengan de un hato positivo a la enfermedad

Grupos formados

De los 64 animales se formaron aleatoriamente cuatro grupos, cada uno compuesto de 16 animales.

Grupo 1 : Se consideró como testigo negativo y se les inyectó un placebo de 2 ml de solución salina fisiológica (SSF) por vía subcutánea. En este grupo no hubieron animales gestantes.

Grupo 2 : Animales que se vacunaron con 2 ml de *B. abortus* RB51 a una dosis de 2×10^8 UFC/ml aplicados subcutáneamente. En este grupo existieron 5 animales gestantes.

Grupo 3 : Animales que se vacunaron con *B. abortus* rfbK a una dosis de 4×10^8 UFC/ml aplicados subcutáneamente (vacuna experimental que se obtuvo por donación del Dr. Gary Adams de Texas A&M University, Lote 221057). En este grupo existieron 7 animales gestantes.

Grupo 4 : Animales que se vacunaron con 1 ml de Rev 1 a dosis reducida de 1×10^5 UFC/ml En este grupo hubo dos animales gestantes.

3.1.3 SINCRONIZACIÓN DE CELOS

Se sincronizó el celo de todas las hembras con esponjas vaginales que contenían 40 mg del progestágeno acetato de Fluorogestona y al término de doce días se retiraron las esponjas y se les aplicó 700 UI de Folligon⁴ (gonadotropina PMSG) intramuscularmente. A los dos días posteriores se les inyectaron 2 ml de Lutalyse (prostaglandina F2 α)⁵ para que se estimulara la ovulación. La relación macho - hembras fue de 1 - 8 respectivamente.

⁴ Laboratorio Intervet

⁵ Laboratorio Pharmacia & Upjohn

3.1.4 ALIMENTACIÓN

Debido a que los animales al llegar estaban bajos en peso, se les dio por 30 días una dieta cuya composición les otorgó: 89.5% de Materia seca, 2.3% de Energía Metabolizable, 16% de Proteína cruda, 0.73% de Calcio, 0.32% de Fósforo y 17% de Fibra cruda. La dieta consistió en una mezcla de: Alfalfa molida, Sorgo molido, Rastrojo de maíz molido, Soya, Sal molida, Harina de hueso y Carbonato de Calcio. Se dio aproximadamente 2.5 kg por animal .

La dieta de mantenimiento para los días posteriores, contuvo los mismos ingredientes pero en diferente proporción, la cual contenía un 10 % de proteína y 2.4 megacalorías de energía metabolizable. Se dio aproximadamente 1.2 kg por animal, durante ese tiempo.

3.2 DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE CADA VACUNA

A las tres vacunas se les realizó un conteo de UFC/ml mediante la técnica de Miles y Misra. De cada vacuna se hicieron diluciones décuples en SSF, se comenzó desde una solución concentrada hasta llegar a una dilución de 1×10^{-9} . De cada suspensión, se inocularon por duplicado 20 μ l en placas de agar brucela, se incubaron a 37 C por diez días con 5 a 10% de CO₂ . Se realizó el conteo y se determinó el número de UFC tomando solo las cajas que tenían de 50 a 200 UFC (Alton, 1988).

3.3 ESTUDIO SEROLÓGICO

Se colectaron muestras de sangre de todos los animales por venopunción en la yugular con el sistema vacutainer al día 0, que fue antes de vacunar y a los días 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 posteriores a la vacunación. Después del día 210 se desafiaron los cuatro grupos, recolectándose muestras sanguíneas para obtener el suero a los 15, 30, 45 y 60 días. De estos sangrados se obtuvo el suero que se mantuvo en congelación hasta el momento de ser utilizados.

De los sueros obtenidos de cada muestreo se detectó por medio de la técnica de ELISA indirecto a los anticuerpos producidos contra el antígeno de cepas lisas y rugosas, realizándose también la PT al 3 % (Díaz et al.,1999; Blasco et al.,1994b).

3.3.2 PRUEBA DE TARJETA AL 3%

Esta técnica se realizó sobre una placa de vidrio cuadrulado a manera de que se puedan hacer hasta 20 pruebas a la vez. El antígeno que se utilizó fue uno amortiguado estable de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* con una concentración del 3% que se utiliza en los ovinos, en un amortiguador de lactato a un pH de 3.5, teñido con rosa de bengala⁶.

La técnica se realizó como se describe a continuación:

1. Se descongelaron los sueros problema y los sueros controles (positivo y negativo), el antígeno refrigerado se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos.

⁶ Laboratorio PRONABIVE

2. Se depositó una cantidad de 30 μ l por placa seleccionada del suero problema y la misma cantidad del antígeno.

3. Se mezcla el suero con el antígeno con un aplicador o agitador, se imprime a la placa un ligero movimiento rotatorio.

A los cuatro minutos después se realizó la lectura en una caja con fondo negro (Díaz et al., 1999; Mancera 2001).

3.3.2 PRUEBA DE ELISA INDIRECTA

Esta técnica se realizó en microplacas de poliestireno de fondo plano. El antígeno que se utilizó fue el LPS de *B. melitensis* que previamente fue titulado para conocer la concentración más adecuada para su uso. El LPS se diluyó en una solución amortiguadora de carbonatos, 0.06 M a pH 9.6. Para obtener una adsorción pasiva del antígeno se adicionaron 100 μ l de la solución del LPS diluido a cada pozo de la microplaca y se incubó por 24 hs a 37C. El antígeno que no fue adsorbido se eliminó mediante tres lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH 7.2 con 0.05% Tween 20 (*PBS-Tween 20*), posteriormente las placas se cubrieron con plástico adhesivo y se almacenaron a 4 C. Con los sueros obtenidos de los diferentes muestreos se hicieron diluciones de 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 para conocer la concentración más adecuada para su uso.

La técnica se realizó como se describe a continuación:

1. Una vez que se pegó el antígeno a las microplacas se utilizó una solución bloqueadora de leche descremada al 2% en PBS, con la finalidad de ocupar sitios en donde no hubo adsorción del antígeno. La solución se dejó por 60 min a 37 C.
2. Se realizaron 4 lavados a las microplacas con *PBS-Tween 20*.
3. Se adicionaron 100 μ l del suero problema por duplicado, diluido 1:200 en PBS, en cada pozo, incubando las microplacas durante 60 min a 37 C.
4. Se realizaron 4 lavados a las microplacas con *PBS-Tween 20*.
5. Una vez seca la microplaca se agregaron 100 μ l de conjugado diluido 1:1000, en cada pozo, se utilizó proteína G conjugada con peroxidasa⁷. Se incubó por 60 min a 37 C.
6. Se realizaron cuatro lavados con *PBS-Tween 20*.
7. Se colocaron 100 μ l del sustrato a cada pozo y se incubó por 15 min. a temperatura ambiente en agitación moderada. Como sustrato se empleó el ácido 2-2 azinobis 3-etilbenzotiazolina sulfónico⁸, 5.5 mg en 50 ml de solución amortiguadora de citrato 0.05 M pH 4, más 19 μ l de H₂O₂ al 1.2%.

⁷ Immunopure ®, laboratory PIERCE

⁸ ABTS, SIGMA Chemical Co.

Posterior a esta incubación se realizó una lectura de manera inmediata a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro múltiple⁹, provisto de un impresor de datos (Bautista y Ochoa, 2001; Alfonseca et al., 1995; Alfonseca, 1998).

3.4 PRUEBA DE INTRADERMOREACCIÓN

La inmunidad celular se determinó por la respuesta a la aplicación de una brucelina comercial (extracto proteico de *Brucella*) elaborada por Rhône-Mérieux (Lyon, Francia) a una dosis de 0.1 ml/ animal de manera intradérmica en la tabla del cuello. Para realizar esta prueba se rasuró una parte del cuello del animal de aproximadamente de 5 x 5 cm. La respuesta celular fue determinada por la medición del grosor de la piel del animal con un Vernier antes de la aplicación y 48 hs después de la misma. La prueba se consideró positiva cuando hubo un incremento de por lo menos el 20% sobre el valor inicial de la medición (Cheville et al, 1993; Blasco et al., 1994a). La prueba se realizó a los 45 días posvacunación.

3.5 DESAFÍO

Al día 210 posvacunación todos los grupos fueron expuestos a una infección experimental con *B. melitensis* 133, biotipo 1 a una dosis de 1×10^5 UFC/ml por vía conjuntival. Esta cepa proviene de un aislamiento logrado a partir de cabras infectadas de Torreón, Coahuila y ha sido usada como cepa de desafío en anteriores trabajos (Soberón, 1997). Para confirmar la virulencia de esta cepa, antes del desafío, se le dio un pase inoculando a dos cabras de las cuales se recuperó a la bacteria del bazo. Antes del desafío los animales fueron alojados en unidades de aislamiento que

⁹ SIGMA

cuentan con 8 corrales separados entre si. Cada uno está cerrado totalmente y cuenta con comedero y bebedero. El piso es de cemento con una inclinación de 3° para su desagüe. Las Unidades tienen un sistema de ventilación interna que permite que los gases de las excretas de los animales se eliminen. Los animales se mantuvieron aquí hasta su sacrificio, que fue a los dos meses posteriores al desafío.

3.6 ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

Todos los animales fueron sacrificados a los dos meses posteriores al desafío experimental con *B. melitensis* y se obtuvieron de estos animales muestras de linfonodos submaxilares, preescapulares, retromamarios y mesentéricos, así como de bazo, glándula mamaria y útero. De los animales gestantes se colectaron las placentas y los fetos.

A los órganos y tejidos se les adicionó SSF y fueron macerados mecánicamente¹⁰ en bolsas de polietileno gruesas. De cada muestra se inoculó por duplicado en placas de medio de Farrell y se incubaron a 37 C por 10 días con y sin CO₂.

Para la identificación de las colonias sospechosas se realizaron pruebas bioquímicas de TSI (triple azúcar y hierro), SIM (indol, motilidad y ácido sulfhídrico), urea, citrato y de crecimiento en colorantes como: Tionina a diluciones de 1:25 000, 1:50 000, 1:100 000; Fucsina a diluciones de 1:50 000, 1:100 000 y Safranina a una dilución de 1:10 000 en placas de agar brucela, así como crecimiento en presencia de estreptomomicina y penicilina (Alton, 1988). Para confirmar la producción de ácido

¹⁰ *Stomacher 400 Laboratory Blender*

sulfhídrico se utilizaron tiras de papel impregnadas con acetato de plomo en tubos inclinados de agar brucela.

Para la diferenciación de cepas lisas y cepas rugosas se utilizó la tinción con cristal violeta a una dilución de 1:40 y la prueba de acriflavina.

Para la identificación de la cepa RB51 se observó su crecimiento en presencia de Rifampicina.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo al tipo de estudio y dada la naturaleza de las variables, éstas se sometieron a un análisis estadístico descriptivo y a un análisis de varianza para un modelo factorial (vacunación y tiempo posterior a la vacunación) en el paquete estadístico Menú (Olivares, 1997).

3.8 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Durante todo el experimento, los animales se mantuvieron en las instalaciones del CENID Microbiología, dependencia del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las muestras que se obtuvieron de los animales se procesaron en el Laboratorio de Bacteriología de este Instituto y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

4. RESULTADOS

4.1 SINCRONIZACIÓN DE CELOS Y GESTACIÓN

La sincronización de celos y el programa de empadre empleado dio como resultado un 21.87% de gestaciones del total de las hembras. En el grupo vacunado con RB51, hubo un 31.2% (5 de 16 animales) de borregas gestantes las cuales no abortaron, registrándose en el día del parto una mortandad del 60% (3 de 5 animales) de los corderitos. En el caso del grupo vacunado con *rfbk* hubo un 43.7% (7 de 16 animales) de borregas gestantes en los cuales se presentó un 62.5% (5 de 8 corderitos) de mortandad en los recién nacidos, uno de ellos murió por fracturas provocadas por la madre. En este grupo, un 14.28% (1 de 7 animales) de los animales gestantes abortó en el tiempo posterior a la vacunación, recuperándose de el feto una cepa rugosa que dio reacción positiva en la prueba de acriflavina. En el grupo vacunado con Rev 1 solo 2 animales quedaron gestantes y no abortaron, representando un 12.5% (2 de 16 animales), con una mortandad del 33.33% (1 de 3 corderitos) de los recién nacidos. En el grupo control no hubo animales gestantes.

4.2 CONTEO CELULAR DE LAS VACUNAS

Los resultados de la cuenta bacteriana en UFC/ml de las tres vacunas utilizadas fue la siguiente:

- Rev 1: 1×10^5 UFC/ml
- *rfbk*: 4×10^8 UFC/ml y
- RB51: 2×10^8 UFC/ml

4.3 ESTUDIO SEROLÓGICO

4.3.1 PRUEBA DE TARJETA AL 3 %

En la gráfica 4.3.1.1 se observa al grupo vacunado con Rev 1 que mostró un 93% de animales positivos a los 15 días posteriores a la vacunación, porcentaje que descendió gradualmente después del día 90. Posterior al desafío se observó seroconversión en los cuatro grupos de ovinos en el muestreo realizado a los 15 días. En el caso del grupo vacunado con RB51 a los 30 días posdesafío, se observó que el máximo porcentaje de seroconversión (87.5%) correspondió a 14 animales y esto se mantuvo hasta el sacrificio, dos (12.5%) de los animales de este grupo no seroconvirtieron. En el grupo vacunado con *rfbK* se observó que un 18.7% (3 animales) de los ovinos fueron positivos a los 60 días posteriores a la vacunación mientras que un ovino (6.25%) fue positivo desde el día 15 hasta el día 120, manteniéndose negativos los animales restantes hasta el día 210 (desafío). En los muestreos posteriores al desafío, a los 15 días el 31.2% (5 animales) seroconvirtió y a los 30 días el porcentaje aumentó a 93.8% (15 animales), un animal de este grupo (6.2%) no seroconvirtió. En cuanto al grupo testigo negativo se puede observar que ningún animal seroconvirtió antes del desafío y que todos lo hicieron posterior al mismo.

4.3.2 ELISA INDIRECTO UTILIZANDO COMO ANTIGENO LPS DE *B. melitensis*.

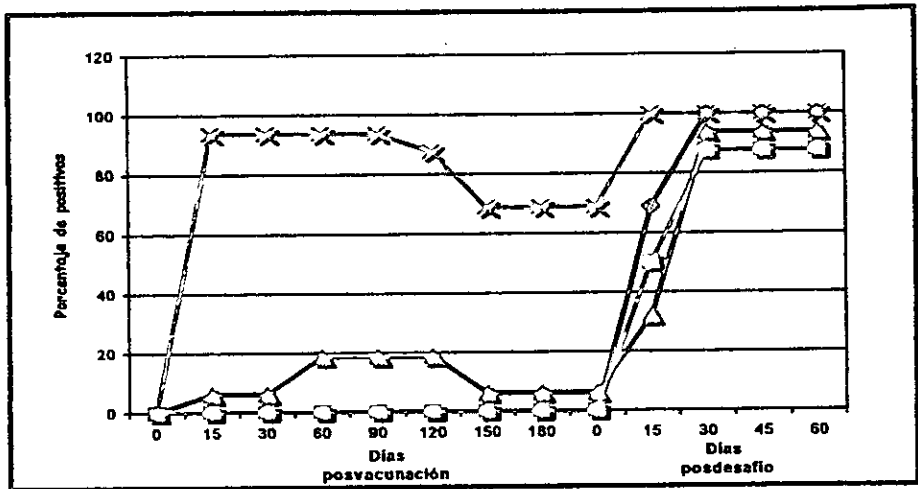
Como se puede apreciar en la gráfica 4.3.2.1 el resultado más sobresaliente es el del grupo vacunado con Rev 1, notándose una lectura más alta de densidad óptica (DO) a los 30 días posvacunación, posteriormente la DO disminuye. El grupo vacunado con Rev

1 tuvo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con el grupo control en los días posteriores a la vacunación. En esta gráfica se muestran solo los valores de DO al inicio y al final del tiempo posterior a la vacunación de los grupos vacunados con RB51 y *rfbK*.

En el tiempo posterior al desafío experimental con *B. melitensis* (gráfica 4.3.2.2) se puede observar que el grupo vacunado con Rev 1, mostró una DO superior a los demás grupos desde el día 15 posdesafío. En cuanto al grupo control, este mostró su máximo valor de DO a los 60 días, mientras que los grupos vacunados con RB51 y *rfbK* no mantuvieron valores altos.

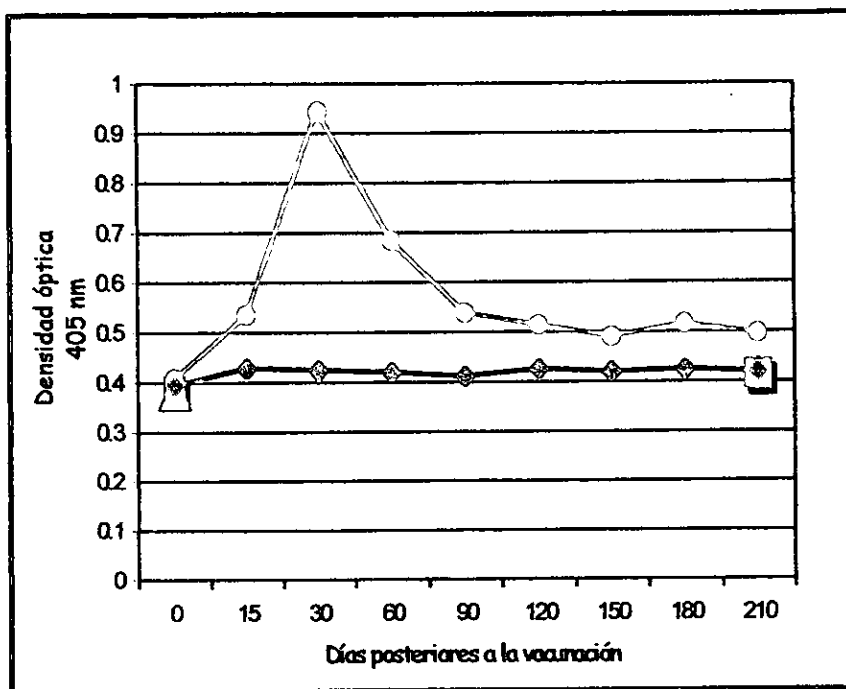
Al realizar el estudio estadístico y al compararse los cuatro grupos de ovinos estudiados se encontró que el grupo de Rev 1 no tuvo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), con el control, pero si con los grupos vacunados con cepas rugosas. El grupo control tuvo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), con el vacunado con *rfbK* pero no con el de RB51, mientras que entre los grupos vacunados con cepas rugosas no hubo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Gráfica 4.3.1.1 Porcentajes de sueros positivos a la prueba de tarjeta, en cuatro grupos de ovinos, posterior a la vacunación y al desafío con *Brucella melitensis*.



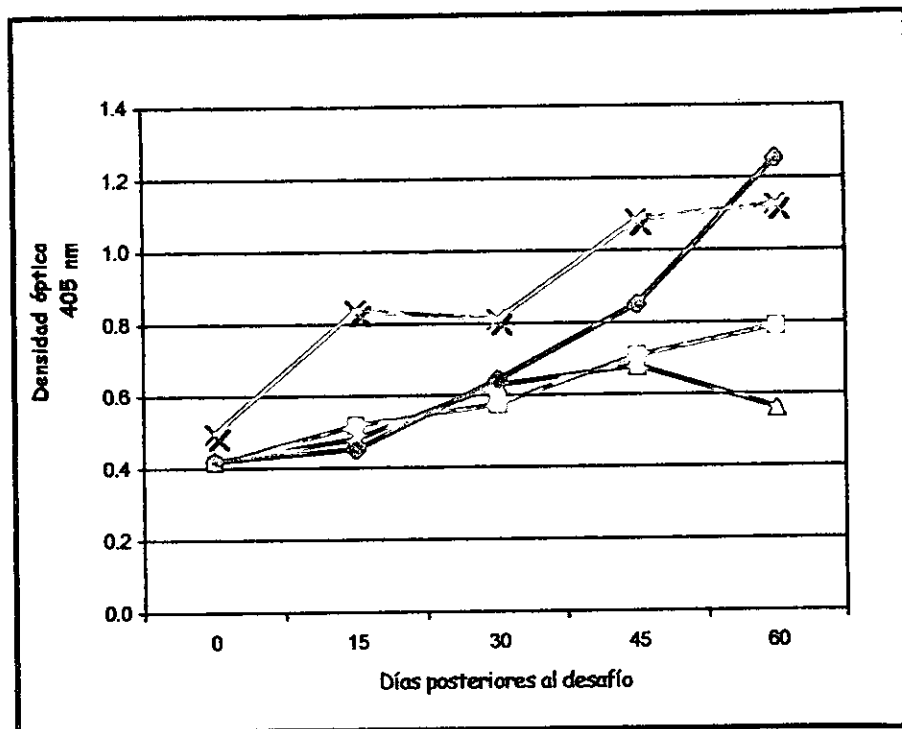
- ◇— 16 ovinos no vacunados
- 16 ovinos vacunados con RB51 (2×10^8 UFC/ml)
- △--- 16 ovinos vacunados con rfbK (4×10^8 UFC/ml)
- X— 16 ovinos vacunados con Rev 1 (1×10^5 UFC/ml)

Gráfica 4.3.2.1 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno LPS de *B. melitensis*, en muestreos posvacunación.



- ◇— 16 ovinos no vacunados
- 16 ovinos vacunados con RB51 (2×10^8 UFC/ml)
- △— 16 ovinos vacunados con *rfbK* (4×10^8 UFC/ml)
- 16 ovinos vacunados con Rev 1 (1×10^5 UFC/ml)

Gráfica 4.3.2.2 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno LPS de *B. melitensis*. Muestreos posdesafío experimental con *B. melitensis*.



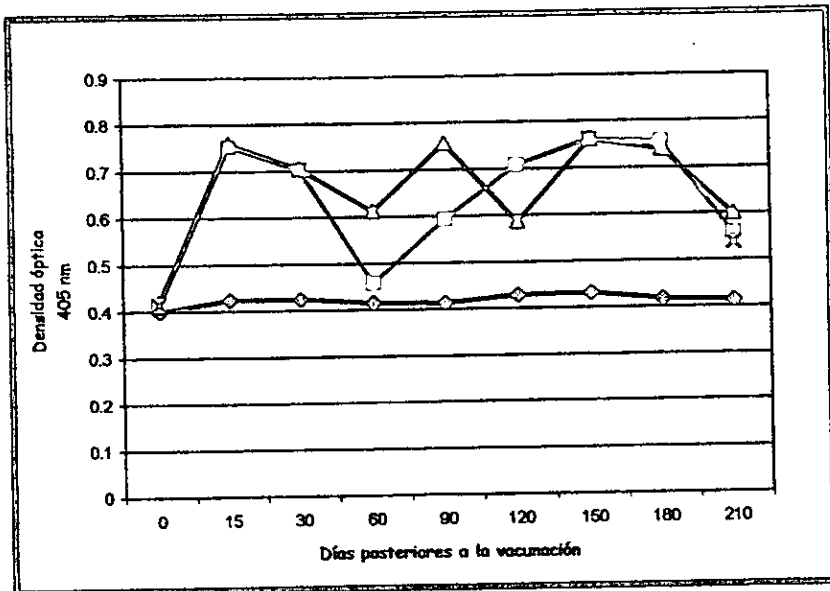
- ◇— 16 ovinos no vacunados
- 16 ovinos vacunados con RB51 (2×10^8 UFC/ml)
- △— 16 ovinos vacunados con *rfbK* (4×10^8 UFC/ml)
- X— 16 ovinos vacunados con Rev 1 (1×10^5 UFC/ml)

4.3.3 ELISA INDIRECTO UTILIZANDO COMO ANTÍGENO CÉLULAS COMPLETAS DE *B. abortus* CARENTES DE CADENA O.

En la gráfica 4.3.3.1 se observa que en la prueba de ELISA indirecto en la que se usaron células completas de *B. abortus* carentes de cadena O como antígeno (RB51), los grupos vacunados con RB51 y *rfbK* no mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre ellos, pero sí con el grupo control. El grupo vacunado con RB51 muestra desde los 15 días posteriores a la vacunación un valor alto de DO que desciende al día 60 y que a partir de ese día aumenta gradualmente su valor hasta llegar al día 180 donde comienza a descender paulatinamente. La misma tendencia se observó en el grupo vacunado con *rfbK*, mientras que en los grupos de Rev 1 y el control se mantuvieron con valores de DO bajos, aunque el de Rev 1 al día 210 aumentó con respecto al muestreo del día cero.

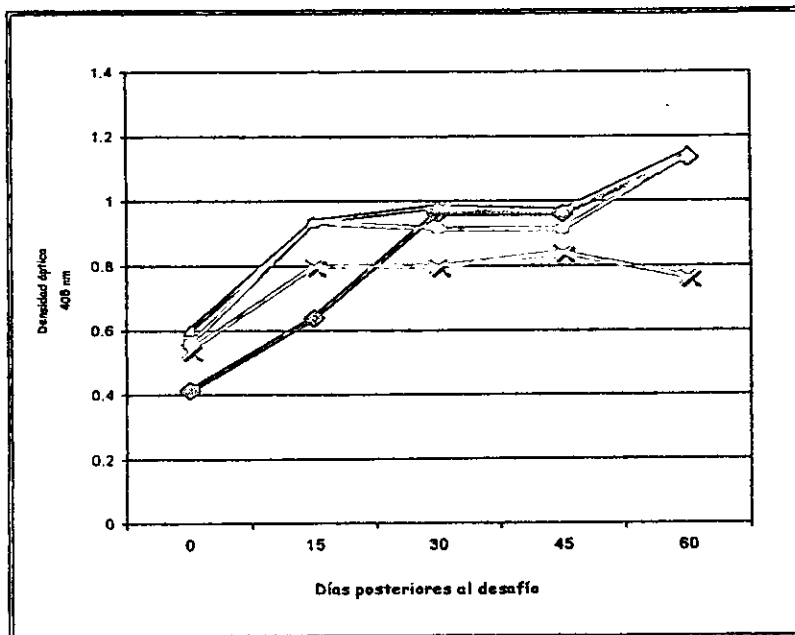
En el tiempo posterior al desafío (gráfica 4.3.3.2), el grupo control tiene un mayor valor de DO a los 60 días al igual que los grupos vacunados con cepas rugosas, mientras que el grupo Rev 1 tiene su valor más alto de DO al día 45 en el cual comienza a descender. El análisis estadístico mostró que entre los dos grupos vacunados con cepas rugosas no hubo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Entre el grupo *rfbK* y los grupos formados por Rev 1 y control se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). El grupo RB51 no tuvo diferencia al compararse con el grupo control, pero sí con el de Rev 1, mientras este último tuvo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con los grupos de control, RB51 y *rfbK*.

Gráfica 4.3.3.1 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno células completas de RB51, en muestreos posvacunación.



- ◇— 16 ovinos no vacunados
- 16 ovinos vacunados con RB51 (2×10^8 UFC/ml)
- △--- 16 ovinos vacunados con *rfbK* (4×10^8 UFC/ml)
- X--- 16 ovinos vacunados con Rev 1 (1×10^5 UFC/ml)

Gráfica 4.3.3.2 Promedio de los valores de densidad óptica por grupo de ovinos del ELISA indirecto a 405 nm, usando como antígeno células completas de RB51. Muestréos posdesafío experimental con *B. melitensis*.



- ◆ 16 ovinos no vacunados
- 16 ovinos vacunados con RB51 (2x10⁸ UFC/ml)
- △ 16 ovinos vacunados con rfbK (4x10⁸ UFC/ml)
- × 16 ovinos vacunados con Rev 1 (1x10⁵ UFC/ml)

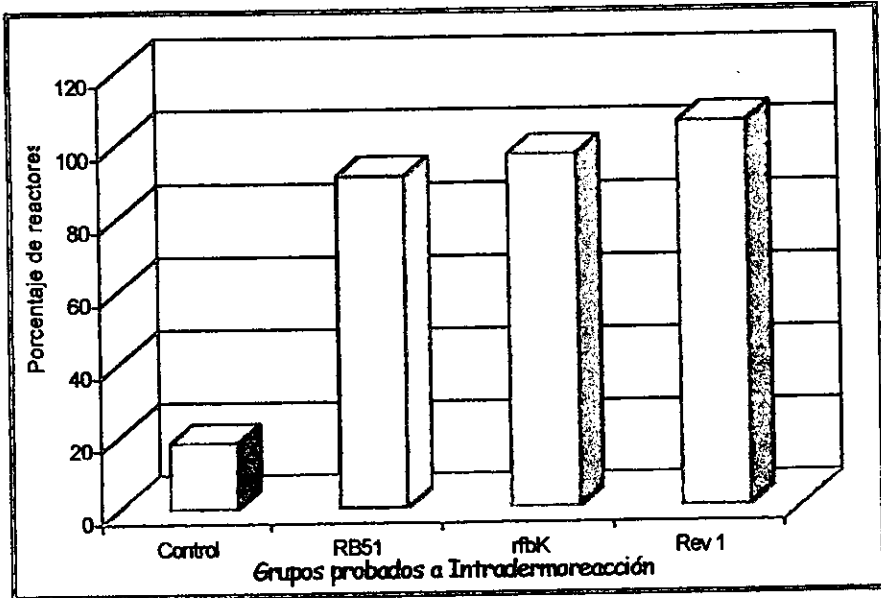
4.4 PRUEBA DE INTRADERMOREACCION (IDR)

Los resultados de la lectura se observan en la gráfica 4.4.1. El grupo testigo negativo presentó un 18.10% (2 de 16 animales) de reacción a la prueba, mientras que los tres grupos vacunados pasaron del 80% de reactivos. Las diferencias en porcentaje entre los grupos al día 0 (muestreo basal) y a las 48 hs posteriores se observan claramente en el cuadro 4.4.1. El análisis estadístico mostró que entre los grupos vacunados (Rev1, RB51 y *rfbK*) no hubo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), mientras que el grupo control al ser comparado con cualquiera de los tres grupos vacunados se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Cuadro 4.4.1 Promedio en porcentaje de las lecturas de Intradermoreacción al muestreo basal y a las 48 hs posteriores de la aplicación de la brucelina en los cuatro grupos de ovinos estudiados.

Muestreos	Promedio de las lecturas a IDR			
	Gpo. Control	Gpo. RB51	Gpo. <i>RfbK</i>	Gpo. Rev 1
Basal 0 hs	0.231	0.247	0.225	0.278
48 hs	0.273	0.472	0.439	0.572

Gráfica 4.4.1 Porcentaje de reactores por grupo de ovinos a la prueba de intradermoreacción realizada a los 60 días posvacunación.



4.5 ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

4.5.1 AISLAMIENTO DE LA CEPA DE DESAFÍO

Se logró el aislamiento de 14 cepas de *B. melitensis* de los cuatro grupos de animales desafiados. Los porcentajes de aislamiento de la cepa de desafío se observa en el siguiente cuadro:

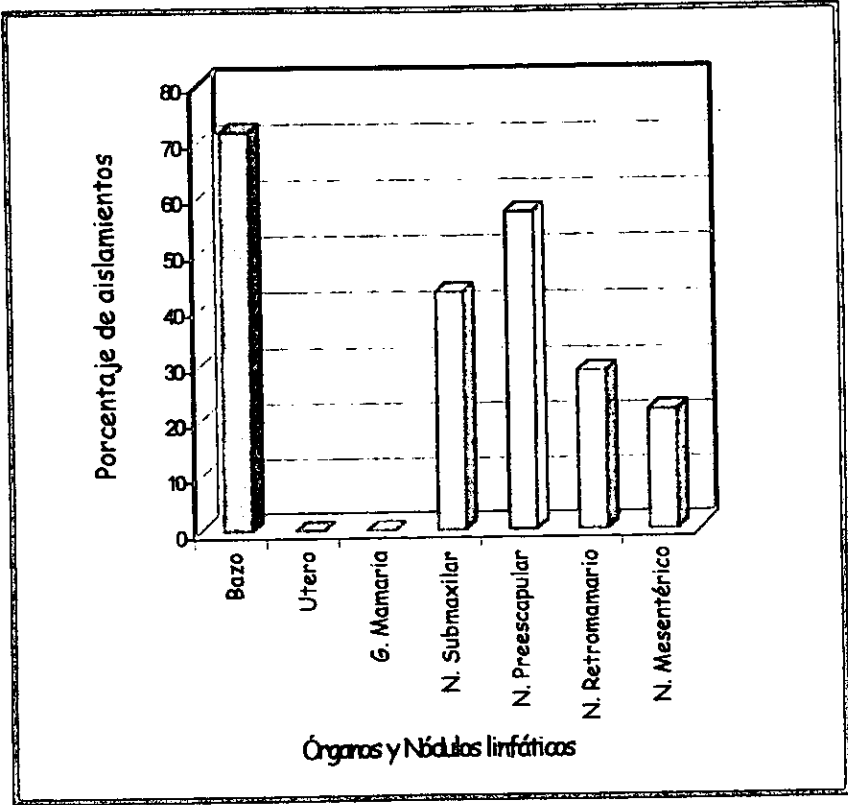
Cuadro 4.5.1.1 Porcentaje de aislamiento de la cepa de desafío de *B. melitensis* en los ovinos de los cuatro grupos estudiados.

Grupo	No. Animales positivos	%
Control negativo	7 de 16	43.75
Rev 1	2 de 16	12.5
RB51	3 de 16	18.75
<i>RfbK</i>	2 de 16	12.5

De las cepas vacunales utilizadas en este experimento no se consiguió aislamiento alguno a excepción del aislamiento de una cepa rugosa del feto abortado por una borrega del grupo vacunado con *rfbK*, sugerente a la vacunal. De ninguno de los conderitos estudiados se logró recuperar ninguna cepa.

De acuerdo a los resultados del aislamiento que se obtuvo de la cepa de desafío de *B. melitensis* en los diferentes órganos y nódulos linfáticos estudiados, en la gráfica 4.5.1.1 se puede apreciar que el órgano a partir del cual se lograron mayores aislamientos fue el bazo con un 71.42% del total de los animales de los cuales se logró aislar la cepa de desafío y que el menor número de aislamientos encontrado fue en los nódulos mesentéricos (21.42%).

Gráfica 4.5.1.1 Porcentaje total de aislamientos por órganos y nódulos linfáticos de la cepa de desafío *B. melitensis* 133, en los cuatro grupos de ovinos.



El porcentaje de crecimiento por órganos de cada grupo se puede observar en el cuadro 4.5.1.2 .

Cuadro 4.5.1.2 Porcentaje de aislamientos por órganos y nódulos linfáticos de la cepa de desafío de *B. melitensis*, en cada uno de los grupos (7 aislamientos en control, 3 en RB51, 2 en *rfbK* y 2 en Rev 1).

Órganos	Gpo. Testigo negativo %	Gpo. RB51 %	Gpo. RfbK %	Gpo. Rev 1 %
Bazo	71.4	66.7	100	50
Utero	0	0	0	0
Glándula mamaria	0	0	0	0
N. submaxilar	28.54	66.7	50	50
N. preescapular	57.14	100	50	50
N. retromamario	28.57	0	50	50
N. mesentérico	14.28	33.3	0	50

4.5.2 PRUEBAS BIOQUIMICAS

Las reacciones en pruebas bioquímicas para identificar género y especie de las cepas aisladas (nitrito y urea = positivo, TSI, H₂S y citrato= negativo), dió como resultado la identificación de *B. melitensis*, en la totalidad de las cepas aisladas.

4.5.3 CRECIMIENTO E INHIBICIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS EN PRESENCIA DE COLORANTES

De acuerdo a los resultados expresados en el cuadro 4.5.3.1 se observa que en el medio de cultivo que contenía una dilución de 1:25 000 de Tionina, ninguna cepa de las 14 probadas creció en presencia de este colorante. A diluciones de 1:50 000 y 1:100 000 de Tionina el 100% de las cepas aisladas crecieron. En el medio de cultivo que contenía Fucsina se obtuvo un 100 % de crecimiento a las 2 diluciones probadas. En el medio de cultivo que contenía Safranina solo una de las 14 cepas sembradas no creció, esta cepa era de un animal del grupo testigo negativo. El resultado de estas pruebas muestran que todas las cepas aisladas en los diferentes grupos de animales estudiados, pertenecen a *B. melitensis*, biotipo 1.

Cuadro 4.5.3.1 Resultados del estudio bacteriológico para identificación y tipificación de las 14 cepas de *B. melitensis* aisladas de los cuatro grupos de ovinos.

No.	Tionina 1:25 000	Tionina 1:50 000	Tionina 1:100 000	Fucsina 1:50 000	Fucsina 1:100 000	Safranina 1:10 000	Estrepto- micina	Penici- lina	Acriflavina*	Cristal Violeta**
Arete azul	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
178	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
817	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
1387	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
2155	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
3726	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
4917	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
5308	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
10708	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
15131	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
17723	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
19741	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
21994	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
24351	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-

* - = El resultado negativo indica una cepa lisa

** - = El resultado negativo indica una cepa lisa

4.5.4 SUSCEPTIBILIDAD EN PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS

Cuando las cepas se probaron para su susceptibilidad en medios que contenían antibióticos (ver cuadro 4.5.3.1) se obtuvo que el 100% se inhibió en presencia de estreptomina, mientras que un 92.85% creció en presencia de penicilina, por lo cual se determinó que pertenecían a la cepa del desafío. Se descartó que fuera la cepa vacunal Rev1 debido a que esta crece en Estreptomina a diferencia de la de desafío que solo crece en Penicilina.

4.5.5 PRUEBA DE ACRIFLAVINA Y DE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

El 100% de las cepas probadas no tuvieron reacción alguna en la prueba de acriflavina, ni con la tinción con cristal violeta, por lo que se apreciaron colonias blancas a la observación con un microscopio estereoscópico. Los resultados de estas dos pruebas indican que todas las cepas estudiadas eran lisas (cuadro 4.5.3.1).

5. DISCUSIÓN

El porcentaje de gestación fue más bajo a lo esperado ya que alcanzó solo el 21.87%, que se distribuyó en los tres grupos vacunados. Ningún animal del grupo control negativo quedó gestante. De acuerdo a estos resultados no fue posible hacer un análisis estadístico de la protección conferida por la utilización de las tres diferentes vacunas en las hembras gestantes. Este bajo porcentaje de gestación es debido a que los machos que se utilizaron en el presente estudio resultaron ser jóvenes sexualmente inmaduros.

La prueba más recomendada en las especies domésticas para la determinación de la prevalencia de brucelosis es la PT. Esta prueba y la de ELISA indirecto son sugeridas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) para su uso en el diagnóstico de la brucelosis en ovinos (MacMillan, 2000). La PT utiliza un antígeno preparado con células de *B. abortus* que reacciona con anticuerpos tanto producidos por un animal enfermo, que por uno vacunado con Rev 1. *B. abortus* y *B. melitensis* comparten antígenos, los cuales varían en concentración en cada una, por lo que los resultados a la PT son diferentes cuando se prueban en diversas especies animales dando valores diferentes de sensibilidad y especificidad (Díaz et al, 1999). De acuerdo al trabajo realizado por Díaz et al., (1999), el diagnóstico se debe de realizar por especie animal, utilizando una concentración celular del 8% del antígeno cuando se trata del ganado bovino, mientras que en los caprinos y ovinos se utiliza al 3%.

En este estudio a los 15 y 30 días posteriores a la vacunación, más del 90 % de los animales que fueron vacunados por vía subcutánea con Rev 1, mostraron una reacción positiva a la PT y después de los 60 días hubo una declinación gradual del número de

sueros positivos. Resultados similares son descritos por Delgado et al. (1995) que vacunó 461 hembras con dosis reducida de Rev 1 y el porcentaje de los sueros positivos a la PT llegaron a su máximo al día 28 posterior a la vacunación. En México, la NOM (1995), recomienda la aplicación de la vacunación por vía subcutánea. Sin embargo, existen opiniones encontradas sobre la vía de aplicación, ya que hay reportes que mencionan que la vía conjuntival es una mejor opción en el caso de los ovinos y trabajos que afirman lo contrario (Delgado et al., 1995). En México se prefiere la administración de la vacuna por vía subcutánea, principalmente por la facilidad de su aplicación y del manejo de los animales. Estudios realizados por Díaz et al. (1999) demuestran que la PT tiene una alta sensibilidad en la detección de los animales positivos a la enfermedad, lo cual se comprueba en este trabajo, en el que se demostró la efectividad de la PT desde los 15 días posteriores al desafío, donde un 95.75% de los cuatro grupos de ovinos estudiados eran positivos, pero no implica que estuvieran infectados, puesto que eso solo se pudo comprobar con el diagnóstico bacteriológico. La respuesta humoral que se determinó en el tiempo posterior al desafío, evidenciada al utilizar una prueba más sensible como es el ELISA indirecto con LPS de *B. melitensis*, fue más rápida y mayor en el grupo vacunado con Rev 1, mientras que en los grupos vacunados con cepas rugosas la respuesta fue menor y más lenta. Los resultados en los animales que pertenecían al grupo testigo fueron similares que los del grupo de Rev 1, solo después del día 30 posterior al desafío. Claramente se comprueba con estos datos que el grupo vacunado con cepa lisa y desafiado posteriormente con otra cepa lisa respondió mejor en el desafío debido a una respuesta inmunológica de tipo secundaria. El porque no se realizó la prueba de Fijación del complemento (FC) en este estudio a pesar de estar recomendada por la NOM, es con base en un estudio realizado por Blasco et al., (1994b), donde se comparan las pruebas de FC y PT en borregas, demostrando que la primera es menos

sensible, por lo tanto en este trabajo se utilizó la prueba de ELISA indirecta porque es más sensible y específica (Jiménez de Bagüés et al., 1992).

Los grupos vacunados con cepas carentes de la cadena O, como fue la RB51 y la *rfbK* no mostraron una reacción positiva a la prueba de tarjeta, a excepción de tres animales (18.75%) del grupo *rfbK* que seroconvirtieron, esto tal vez dado por una respuesta inespecífica a esta prueba debido a la infección por bacterias del género *Yersinia* spp. o *Salmonella* spp. ya que los animales al infectarse con estos microorganismos producen anticuerpos contra el LPS y pudiera suceder de este modo el cruzamiento en la PT (Kittelbergera et al., 1995). Los animales difícilmente podrían tener anticuerpos previos contra la brucelosis, ya que tanto en el muestreo de selección como en los dos primeros posteriores a la vacunación, todos los animales de estos grupos salieron negativos.

En México, la NOM (1995) establece que la vacunación de ovinos, contra brucelas lisas sea con *B. melitensis* Rev 1, ya que de acuerdo a trabajos anteriores, se ha demostrado que las vacunas vivas son las que confieren una mayor protección contra *Brucella*. Sin embargo la vacunación de ovinos en nuestro país es casi nula (Díaz et. al., 1999) por lo cual se debe tomar conciencia de su importancia y del impacto socioeconómico que causa; así como de establecer un programa de vacunación estricto para su control.

De acuerdo a los resultados de las UFC por ml de las vacunas empleadas en este trabajo, se encontró que eran diferentes las dosis aplicadas a las que se decían contener en las vacunas estandarizadas, a excepción de la vacuna Rev 1 que si cumplía con la concentración indicada, implicando con ello que los animales vacunados con dosis bajas queden con una protección menor.

La Rev 1 es considerada como la mejor opción disponible para la profilaxis de la infección por *B. melitensis* en los pequeños rumiantes, ya que provoca una sólida inmunidad contra esta cepa de campo (*B. melitensis* 133), sin embargo, presenta la desventaja de inducir anticuerpos contra *Brucella* en el tiempo posterior a la vacunación, por lo que es imposible durante aproximadamente ocho meses la diferenciación entre animales vacunados de infectados cuando el diagnóstico se realiza exclusivamente con base en la PT al 3% y FC; así como también puede provocar abortos en la hembras gestantes e infectar al humano cuando no se tiene el suficiente cuidado al manipular la vacuna. Aunque por otra parte, se han realizado estudios experimentales que han mostrado que la Rev 1 induce inmunidad contra *B. melitensis* igual o superior cuando se compara con la inmunidad inducida por la cepa 19 que se utiliza en los bovinos con una dosis reducida (WHO, Brunet, Sales et al., 1992).

En este estudio, la dosis de vacunación que se utilizó para Rev 1 fue la dosis reducida, dado que los animales de este grupo eran adultos, lo cual se valida con lo demostrado en un experimento realizado por Sales et al., (1992) en donde la dosis de Rev 1 aplicada a niveles de 10^6 puede ser utilizada en ovinos sin una aparente excreción del microorganismo o una reacción serológica prolongada a la PT. En su trabajo al igual que en el de Delgado et al., (1995), los animales vacunados entre los 73 y 100 días de gestación no abortaron, caso que pudo haberse dado al utilizar la dosis estándar, sin embargo sugiere Crowther et al. en Sales et al., (1992), que el pasar el nivel de 10^5 organismos si pudiera provocar el aborto y causar una seroconversión positiva por tiempos largos a la PT, por arriba de las doce semanas posteriores a la vacunación, por otro lado los trabajos de Nicoletti y Kolar (en Sales, 1992) sugieren que los niveles que van entre 10^6 y 10^7 UFC pueden ser necesarios para inducir un nivel satisfactorio de protección en los ovinos.

De la totalidad de los animales vacunados con Rev 1 con dosis reducida, solo se logró la recuperación de la cepa de desafío en dos animales, por lo que en este grupo la vacuna protegió al 87.5% (14 animales), además de que las dos borregas gestantes llegaron al parto sin ninguna complicación y los productos nacieron en buenas condiciones a excepción de un cordero que murió a las pocas horas posteriores al parto. Estos resultados contrastan a los publicados por Blasco (1997), en los que sostiene que aunque la dosis más utilizada y recomendada en animales gestantes sea la dosis reducida de Rev 1, hecho que se acepta en México, no la recomienda ya que sus resultados indican que la dosis reducida aplicada sobre todo en los primeros meses de la gestación induce aborto y confiere un grado bajo de inmunidad; situación que no se observó en este trabajo.

Los resultados encontrados por Blasco (1997) pueden deberse a las condiciones propias del desafío e incluso de la cepa utilizada en el mismo, ya que en países europeos la cepa más utilizada para el desafío es *B. melitensis* H:38, mientras en el presente trabajo se utilizó la cepa *B. melitensis* 133, aislada de un caprino en Torreón y de la cual se ha demostrado fehacientemente su virulencia (Soberón, 1997), en este caso puede ser que existan diferencias patogénicas entre las cepas y por ello los resultados encontrados son diferentes. En cuanto a la dosis también hay diferencia ya que en España usan dos logaritmos más en el desafío (2×10^7) mientras que en los ovinos de este experimento se les administro una dosis de 1×10^5 como refieren los trabajos clásicos realizados por Alton (1988). Por otra parte se ha observado que en condiciones experimentales las dosis individuales de 10^8 de *B. melitensis* aplicadas por vía conjuntival, infectan aproximadamente al 90% de los animales desafiados, mientras que en el presente trabajo, a la dosis señalada no se alcanzó el 50% de infectados en el grupo control, por lo que en próximos trabajos debe de contemplarse

usar unos logaritmos más, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos por Hernández et al. (2001) en un estudio en caprinos, comprobó que con la aplicación de una dosis de 1×10^9 de la cepa *B. melitensis* H:38 al desafío, se obtiene más del 90% de infectados en el grupo control.

Debe de tenerse en cuenta que esta el problema de la estandarización de las vacunas, ya que como se observó anteriormente el conteo de las vacunas RB51 y *rfbK* fue diferente a lo que se había señalado en un principio. A consecuencia de esto bien pueden ser los resultados discrepantes entre los países europeos y los americanos ya que son diferentes las dosis vacunales en las especies estudiadas, así como también las dosis de desafío y cepas utilizadas en el mismo para la evaluación de la eficacia protectora.

En el caso de la vacunación con *rfbK* y RB51, la estimulación de la respuesta inmune humoral se da, pero este tipo de anticuerpos no interfiere con el diagnóstico rutinario, por este motivo se probaron, para que en un futuro puedan ser opciones en la vacunación de ovinos en México. A manera de dar a conocer su comportamiento en cuanto a inmunidad humoral en el tiempo posterior a la vacunación en los grupos estudiados, aparte de hacer la PT, se realizó con los mismos sueros la técnica de ELISA indirecto, en la cual se midió la DO de los anticuerpos producidos por la vacunación y cuyos resultados se discutirán más adelante.

Trabajos anteriores realizados por Adams et al. (1998), demuestran que estas vacunas poseen una virulencia atenuada y una limitada sobrevivencia en el huésped, debido a la represión de la biosíntesis completa del LPS, lo que permite una mayor permeabilidad en la membrana que da paso libre a los péptidos catiónicos y a los productos de la

fagocitosis ocasionando la rápida eliminación de la bacteria por el hospedero. Estos estudios han sido realizados en bovinos y ratones pero no en ovinos.

Como se ha mencionado las cepas rugosas de *B. abortus* pueden ser una alternativa en la vacunación en México, para la protección de ovinos y caprinos, ya que la *rfbK* y la RB51 han mostrado ser efectivas en la prevención de la brucelosis sin causar complicaciones serológicas y aborto en el ganado bovino. Estudios preliminares indican que la RB51 y la *rfbK* pueden también proteger a las cabras contra *B. melitensis* (Soberón, 1997; WHO). En el presente estudio al probarse estas vacunas en ovinos se encontró que la RB51 protegió a los animales del desafío realizado con una cepa de campo de *B. melitensis* en un 81.25% mientras que la *rfbK* protegió en un 87.5%. Al analizar estos resultados con el mostrado con Rev 1 que protegió en un 87.5% no se encontró diferencia estadística significativa entre los tres grupos vacunados. Aunque se aprecia que los resultados de Rev 1 y *rfbK* son iguales, en cuanto a protección, sobresale la primera debido a que en la segunda hubo un caso de aborto. También existió una buena protección de los tres inmunógenos contra la presentación de la enfermedad, sin embargo es necesario realizar más experimentos enfocados en este caso, al estudio de protección contra el aborto.

Aunque si bien se sabe que la eficacia de la RB51 que ha sido determinada en ovinos, caprinos y suinos, en carneros, ha fallado en la protección contra *B. ovis*, por lo que una posible alternativa es el uso de vacunas provenientes de *B. melitensis* o *B. suis* para este caso (WHO). De hecho existen experimentos comparativos en ovinos con otras cepas vacunales vivas atenuadas, tales como la cepa lisa de *B. suis* S2 o la rugosa RB51 que por sus resultados han confirmado la excelente inmunidad conferida por Rev 1 (WHO).

En contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a la protección conferida se encuentran los experimentos realizados en cabras, donde la RB51 tiene un mayor porcentaje de protección a comparación de la *rfbK* (93% Vs 87% respectivamente), mientras que sí se valida el hecho de que ninguna de las dos produce anticuerpos que interfieran con el diagnóstico (WHO). Un estudio realizado por Soberón (1997), reporta que la RB51 protege en más del 90% a los caprinos cuando son desafiados experimentalmente con *B. melitensis*.

En otros estudios publicados en la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization WHO), se muestra que la *rfbK* protege más efectivamente (88%) contra el aborto en bovinos que la cepa 19 (80%), caso que se observó en los ovinos ya que de acuerdo a los resultados de este trabajo, se obtuvo que un animal (14.28%) de los siete que estaban gestantes de este grupo abortó protegiendo así al 83.3%, que comparándolo con la protección de la cepa 19 es todavía más aceptable, aunque por otro lado, se deberían de realizar más experimentos con esta vacuna para ver si este resultado se repite.

En la prueba de ELISA indirecto al utilizar el antígeno liso se observó que el grupo Rev 1 fue el que tuvo mayor valor de DO, esto de acuerdo a otros autores se debe a la propia naturaleza de la vacuna aplicada, ya que la vacuna es hecha a partir de células completas de *B. melitensis* y el antígeno que se utilizó en la prueba fue a base de LPS de *B. melitensis*, por lo que se explica su máximo valor al día 30 posterior a la vacunación como al tiempo posterior al desafío, en donde aun cuando obtiene una mayor DO a los 15 días no tiene diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con el grupo control. Esta reacción en el grupo Rev 1 se debe a que ya tenía un estímulo previo (la vacunación), por lo que el desafío experimental con *B. melitensis* provoca una

respuesta inmunológica de tipo secundario por las células de memoria. Los valores alcanzados por Rev 1 en el ELISA indirecto rugoso pudieron deberse a que *B. melitensis* comparte varios componentes antigénicos con *B. abortus* y si bien, los antígenos presentes en las cepas rugosas no son los inmunodominantes en cepas lisas si están presentes.

En la Intradermoreacción (IDR), el extracto de proteína citoplasmática de la brucelina utilizada, que es preparada por un método de extracción en frío de la cepa rugosa *B. melitensis* 115, es aceptada como el alérgeno más común. Como los componentes proteicos son los mismos en todas las especies de *Brucella* tanto en la fase lisa como en la fase rugosa, una amplia sensibilidad para el género *Brucella* se obtiene al realizar esta prueba (Pouillot et. al., 1997; Bercovich y Ter 1990). Es por ello que en este estudio se utilizó como indicativo de la respuesta inmune celular. Como se sabe la *Brucella* como bacteria intracelular induce tanto una respuesta inmune humoral como una celular, así que los ovinos del presente estudio que fueron vacunados con cualquier de las tres cepas utilizadas, mostraron reacciones positivas a IDR a las 48 hs posteriores a la aplicación de la brucelina. La reacción de IDR se midió de acuerdo a los datos publicados por Blasco et al. (1994a), tomando como reactores positivos aquellos grupos que sobrepasaban el 20 % de aumento en el grosor de la piel, medida con un vernier, a las 48 hs posteriores a la aplicación del brucelina. Los resultados obtenidos, claramente demuestran que bajo el anterior criterio los animales con respuesta mayor al 20 % fueron los grupos de ovinos vacunados, teniendo un mayor porcentaje los vacunados con Rev 1, mientras que en el grupo testigo negativo solo se obtuvo un 18.10% de reactores a la prueba de IDR, esto pudiera deberse a que la alta sensibilidad de esta prueba puede dar falsos positivos, ya que en los primeros muestreos tanto en el de selección como en los posteriores a la vacunación todos los animales de este grupo salieron negativos a la PT (Blasco et. al.,

1994a). Se ha descrito que una respuesta mediada por anticuerpos pudiera dar una lectura errónea de IDR, pero solo siendo aparente por corto tiempo, por lo que se recomienda realizar la lectura pasando las 48 hs (Blasco et. al., 1994a).

En cuanto a los resultados de las pruebas bioquímicas, de crecimiento en colorantes y antibióticos se confirmó que todas las cepas recuperadas pertenecían a la cepa de desafío, ya que de acuerdo a su crecimiento se clasificaron como cepas de *B. melitensis* biotipo 1, que a su vez se diferenciaron de la cepa vacunal Rev 1, ya que esta aunque también proviene de *B. melitensis* biotipo 1, se diferencia debido a que no crece en concentraciones de 20 µg/ml de Tionina y de Fucsina ni en medios con 5 UI/ml de Penicilina, por lo que estos resultados concuerdan con los datos publicados por Blasco y Barberán (1990), donde catalogan los diferentes biotipos de *B. melitensis* y hacen la diferenciación con la cepa vacunal Rev 1.

De acuerdo a los resultados en este trabajo al evaluar las tres vacunas y su similar eficacia protectora, ante nuevos proyectos de investigación una recomendación sería la de tomar en cuenta los efectos de la vacunación en el animal, ya que pudiera ser importante que se midieran los niveles de algunos productos celulares antes y después de esta, ya que como es sabido, el IFN γ , un factor importante producido por estimulación de la inmunidad celular, ha sido reportado como reductor del crecimiento de *Brucella* en los macrófagos, sin embargo la activación del IFN γ , por si solo, no resulta en la total eliminación de la *Brucella* intracelular. Los datos que se han presentado sobre citocinas indican que para la óptima resistencia hacia la infección producida por *Brucella*, las vacunas deben preferencialmente inducir una respuesta Th1, con la producción de las citocinas protectoras como IFN γ y de la interleucina 2, mientras que la inducción de la respuesta por Th2 con la producción de la IL 10 y la IL4 producen efecto negativo (WHO). De acuerdo a esto, la vacunación que se realizó

en este trabajo, desde el momento de la aplicación se estimuló tanto la inmunidad celular y la humoral que se evidenciaron por la prueba de IDR, para la primera y para la segunda la PT y ELISA indirecto. Como lo menciona la WHO, para que una vacuna sea aceptable, debe de demostrar que protege a más del 80% de los animales vacunados, hecho que se observó en los tres grupos vacunados.

Es un hecho que la Brucelosis ovina en México es una enfermedad zoonótica, siendo su única vía de control para su posterior erradicación, la vacunación, en combinación con el sacrificio de animales positivos. Se debe evitar hacer compras de reposición o pedir prestados a sementales o hembras de los que se desconozca su salud. En situaciones donde por los propios sistemas de producción establecidos se requiera de la compra de ovinos, se tiene que tomar en cuenta la realización de la PT (se prefiere por rápida y económica) a todos los ovinos que se quieran meter al rebaño, como una medida de precaución o la prueba de IDR con lo cual se aseguran de que los animales a comprar no han tenido contacto con la bacteria. Tal como lo cita Blasco y Barberán (1990), es controvertido el aspecto epidemiológico de la brucelosis, ya que de acuerdo a la edad de los animales, la susceptibilidad al contagio es mayor cuando están cerca de la pubertad (pasando los 4 meses), es por ello que debería de tomarse en cuenta este punto y vacunar a los animales desde jóvenes, en las zonas donde por la alta prevalencia sea necesario.

6. CONCLUSIONES

- ◆ El aislamiento de la cepa rugosa de un feto abortado en el grupo vacunado con *rfbK* sugiere que esta vacuna pudiera provocar el aborto y transmitirse al feto.
- ◆ La aplicación subcutánea de las tres diferentes vacunas produjo en este trabajo una protección mayor al 80% en los tres grupos de ovinos.
- ◆ La PT determina en un 100% a los animales positivos, aunque puede tener reacción cruzada con anticuerpos estimulados por otras bacterias de los géneros *Yersinia*, *Salmonella* o *E. coli*.
- ◆ El ELISA indirecto en el que se utilizó como antígeno LPS de *B. melitensis* permite diferenciar estadísticamente los grupos vacunados con cepas lisas de las cepas rugosas, comprobándose su alta sensibilidad y especificidad.
- ◆ El ELISA rugoso tiene mayor sensibilidad pero baja especificidad.
- ◆ La IDR mostró una especificidad del 81.9% en el grupo control no vacunado, por lo que hay una reacción cruzada en animales que hayan estado en contacto con otras bacterias.
- ◆ Las tres vacunas sobrepasaron el 80% de protección que es sugerido por algunos autores para que sea recomendable su uso en los ovinos.
- ◆ El bazo es el órgano del cual se logra mayor porcentaje de aislamientos de la cepa de desafío.

- ♦ El útero y la glándula mamaria no son órganos de predilección para la recuperación de la cepa de desafío.
- ♦ Se identificaron las 14 cepas recuperadas como *B. melitensis* biotipo 1 (cepa 133 del desafío).

7. LITERATURA CITADA

- ♦ Adams LG; Ficht TA. ; Allen CA. *Derivation and evaluation of the rough rfbK Brucellosis vaccine in Cattle. Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis; 1998. Acapulco. México.*

- ♦ Alfonseca SE. *Determinación de Isotipos en Perfiles serológicos Mediante un inmunoensayo enzimático indirecto en cabras vacunadas y desafiadas con Brucella spp. (Tesis de Maestría). México D.F. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.*

- ♦ Alfonseca SE; Díaz AE; Hernández AL; Suárez GF. *Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en diferentes grupos de bovinos. Anuario de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 1995. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México D.F.*

- ♦ Alton GG; Jones LM; Angus RD; Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory, París.INRA ed. 1988.*

- ♦ Arenas GN; Staskevich AS; Aballay A; Mayorga L. *Intracellular trafficking of Brucella abortus in J774 Macrophages. Infection and Immunity. 2000; Vol. 68 (7): 4255-4263.*

- ♦ Arteaga . *La Ovinocultura en México. 1999.*

- ♦ Bautista OM; Ochoa DV. *Técnicas de Inmunoensayo ligadas a enzimas*. En Díaz-Aparicio E; Hernández AL; Valero EG; Arellano RB, editores. *Brucelosis Animal* 2da. edición. México D. F. INIFAP. 2001: 92-95.
- ♦ Bercovich Z, Ter Laak EA. *An Evaluation of the Delayed-Type Hypersensitivity Test for Diagnosing Brucellosis in Individual Cattle: A Field Study*. *Veterinary Microbiology*. 1990. 22, 241 - 248.
- ♦ Blasco JM. *A review of the use of B. melitensis Rev 1 vaccine in adult sheep and goats*. *Preventive Veterinary Medicine*. 1997. 31 (3-4) 275 - 283.
- ♦ Blasco JM. *Profilaxis vacunal de la brucelosis en los rumiantes: las vacunas tradicionales y las nuevas vacunas*. Unidad de Sanidad Animal. Zaragoza, España, 1998.
- ♦ Blasco JM, Barberán M. *Epidemiología Patogenía y Cuadro Clínico. Ovis*. Tratado de Patología y Producción ovina. 1990. (8) 25 - 32.
- ♦ Blasco JM, Gamazo C. *Brucelosis Animal*. *Investigación y Ciencia*. 1994. 218. 56 - 62.
- ♦ Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, Jiménez de Bagués MP, Cau C. *Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats*. *The Veterinary Record*. 1994b. 134 . 415 - 420.

- ♦ Blasco JM, Marín C, Jiménez de Bagués M, Borberón, A. Hernández; L. Molina; J. Velasco, R. Díaz; I. Moriyón. *Evaluation of Allergic and Serological Test for Diagnosing Brucella melitensis Infection in Sheep*. Journal of Clinical Microbiology. 1994a. Vol 32. (8) 1835 - 1840.

- ♦ Brunet. 1999. *Brucellosis*. Dirección Internet:
<http://progress.box.co.il/brunet/index.html>

- ♦ Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM. *Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of Brucella abortus*. American Journal Veterinary Research. 1993. 54 (10) 1591 - 1596.

- ♦ Delgado S., Cármenes P, Fernández M. *Seroprevalences and lack of abortions after vaccination of Churra Sheep with reduced doses of Rev 1 Brucella melitensis vaccine by subcutaneous or conjunctival routes*. Preventive Veterinary Medicine. 1995. 23 (3-4) 153 - 161.

- ♦ Díaz-Aparicio E, Blasco MJM, Suárez GF. *Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina*. Veterinaria México. 1999. 30 (4) 307 - 311.

- ♦ Gross A, Spiessey S, Terraza A, Rouot B, Caron E, Dornand J. *Expresion and Bactericidal Activity of Nitric Oxide Synthase in Brucella suis - Infected Murine Macrophages*. Infection and Immunity. 1998. 66 (4) 1309 -1316.

- ♦ Hernández AL. Ochoa DV; Díaz AE; Córdoba LD; López MJ; Ontiveros CL.
Conferred protection for the vaccine of Brucella abortus RB51 to goats. 54th Annual Brucellosis Research Conference. 2001 Noviembre. 25. St. Louis Missouri. Estados Unidos.

- ♦ Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *IX Censo Agrícola Ganadero*, Tomo II, México, 1996.

- ♦ Jimenez de Bagüés MP; Marín CM; Blasco JM; Moriyón I; Gamazo C. *An ELISA with Brucella lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of B. melitensis infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival B. melitensis strain Rev 1 vaccination.* Veterinary Microbiology. 1992. 30. 233-241.

- ♦ Kittelbergera R; Hilbinka F; Hansena MF; Penrosea M; Lisleb GW; Letessonc JJ; Garin-Bastujid B; Searsonc J; Fossatif CA; Cloeckeaertg A; Schurigh G. *Serological crossreactivity between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica O:9 I.* Veterinary Microbiology. 1995.47. (3-4) 257-270.

- ♦ Leonard BA, López-Goni I, Baldwin GL. *Brucella abortus siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid protects Brucellae from killing by macrophage.* Veterinary Research. 1994. 28 (1) 67 - 92.

- ♦ Lugo de la Fuente G. *Symposium: Factores que influyen en las enfermedades infecciosas. Impacto Socioeconómico y cultural en la Salud Pública.* Memorias del XXVII Congreso Nacional de Microbiología. 1996 Acapulco (Guerrero) México.

- ♦ MacMillan AP. Short Communication: *Investigation of the performance of the Rose Bengal plate test in the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats*. 2000. Internet :
[Http://www.fao.org/ag/AGA/AGA/WAR/Warall/W6437t/w6437t09.htm](http://www.fao.org/ag/AGA/AGA/WAR/Warall/W6437t/w6437t09.htm)
- ♦ Mancera MA. *Prueba del antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta*. En Díaz-Aparicio E; Hernández AL; Valero EG; Arellano RB, editores. *Brucelosis Animal*. 2da edición, México D. F. INIFAP. 2001: 80 - 81.
- ♦ Martínez TG, Pizarro CJ, Moreno E, Moriyón I. *The outer membranes of Brucella spp. Are resistant to Bactericidal Cationic Peptides*. *Infection and Immunity*. 1997. 63 (8). 3054 - 3061.
- ♦ Olivares SE. *Paquete de Diseños Experimentales*. Menú. Versión 2.5. 1997
Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- ♦ Orduña A, Lorenzo B, Abad R, Rodríguez A. *Supervivencia Intracelular de Brucella en las células Fagocíticas*. *Jornadas Internacionales sobre Brucelosis*. 1994. España. Facultad de Veterinaria C.U.
- ♦ Pérez PJL. *Evaluación serológica de la vacuna de Brucella abortus cepa rugosa mutante por transposición, en un hato de bovinos con brucelosis* (Tesis de Licenciatura). México. D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1997.

- ◆ Pizarro CJ; Méresse S; Porton RG; Vander Goot G; Sola-Landa A. López-Goñi I; Moreno E; Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the Autophagic Pathway and replicates in the Endoplasmic Reticulum of Nonprofessional Phagocytes. *Infection and Immunity*. 1998. 66 (12). 5711-5724.

- ◆ Pizarro CJ, Moreno E, Saguadoice V, Mege JL, Gorvell JP. *Virulent Brucella abortus* Prevents Lysosome Fusion and Is Distributed within Autophagosome-Like Compartments. *Internet* 1997.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?uid=9573138&form=6&db=m&Dop=b>

- ◆ Pizarro CJ; Moreno E; Gorvel JP. *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles*. 1999. 6. 201 - 232.

- ◆ Pouillot R, Garin.Bastuji B, Gerbier G, Coche Y, Cau C, Dufour B, Moutou F. *The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis*. *Veterinary Research*. 1997. 28. 365 - 374.

- ◆ Sales HH, Hueston WD, Hoblet KH, Shulaw WP. *Field trial evaluating the safety and serologic reactions of reduced-dose Brucella melitensis Rev 1 vaccination in adult sheep*. *Preventive Veterinary Medicine*. 1992. 13. 205 - 215.

- ◆ Samartino LE, Truax RE, Enright M. *Invasion y Replication of Brucella Abortus in three different trophoblastic cell lines*. *Journal of Veterinary Medicine*. 1994. 41 (4) 229 - 236.

- ♦ Sangari FJ, Agüero J. *Molecular basis of Brucella pathogenicity: an update*
Publicación de la Sociedad Española de Microbiología .1996. España.
12. 2 - 3

- ♦ Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial
Mexicana NOM-041-ZOO-1995. *Campaña Nacional contra la
brucelosis en los animales*. Diario Oficial de la Federación. México.
1995. Dirección Internet :
http://www.sagar.gob.mx/users/Conasag/nom41_c8.htm

- ♦ Soberón M. *Protección conferida por la vacuna RB51 de Brucella abortus en cabras
expuestas a la infección experimental por Brucella melitensis* (Tesis de
Maestría). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
UNAM, 1997.

- ♦ Stabel T, Sha Z, Mayfield J. *Periplasmic location of Brucella abortus Cu/Zn
superoxide dismutase*. Veterinary Microbiology. 1994. 38. 4 307 -
314.

- ♦ Stevens MG, Tabatabai BL, Olsen S, Cheville NF. *Immune Responses to
superoxide dismutase and synthetic peptides of superoxide dismutase
in cattle vaccinated with B. abortus cepa 19 or RB51*. Veterinary
Microbiology. 1994. 41. 4. 383 - 389.

- ♦ Villa MLG. *Symposium: Factores que influyen en las enfermedades infecciosas.
Impacto de las zoonosis en la Salud Publica*. Memorias del XXVII
Congreso Nacional de Microbiología. 1996. Acapulco (Guerrero).
México.

- ◆ World Health Organization. *The development of new Improved Brucellosis Vaccines*. Report of WHO Meeting, 1997. Dirección Internet:
<http://www.who.int/emc>

ANEXOS

RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA DE LA PRUEBA DE INTRADERMOREACCION EN LOS CUATRO GRUPOS ESTUDIADOS

Valores en mm de la medición realizada con Vernier a las 48 hs posteriores a la aplicación de la brucelina en los cuatro grupos probados.

Tratamiento 1 Gpo. Control	Tratamiento 2 Gpo. RB51	Tratamiento 3 Gpo. rfbK	Tratamiento 4 Gpo. Rev 1
0.6	0.5	0.45	0.4
0.25	0.3	0.3	0.3
0.25	0.7	0.4	0.5
0.3	0.5	0.55	0.8
0.25	0.4	0.6	0.55
0.3	0.3	0.5	0.7
0.35	0.8	0.6	0.9
0.25	0.4	0.4	0.55
0.2	0.55	0.4	0.5
0.25	0.3	0.5	0.35
0.35	0.5	0.4	0.5
0.2	0.4	0.4	0.45
0.3	0.6	0.45	0.7
0.25	0.3	0.45	0.7
0.4	0.6	0.13	0.7
0.5	0.4	0.5	0.55

ANALISIS DE VARIANZA

F.V.*	GL	SC	CM	F	P > F	CV
Tratamientos	3	0.5495	0.1832	9.7672	0.000	30.51%
Error	60	1.1252	0.0187			
Total	63	1.6748				

FV = Fuente de variación

Tabla de Medias

Tratamiento	Repeticiones	Promedio
1	16	0.312500
2	16	0.471875
3	16	0.439375
4	16	0.571875

Resultados de la comparación de Medias

Tratamiento	Promedio
4	0.5719 A
2	0.4719 B
3	0.4394 B
1	0.3125 C

Nivel de Significancia: 0.05

RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA DEL ELISA INDIRECTO EN EL QUE SE USO COMO ANTIGENO LPS DE *B. melitensis*

Promedio de los valores de densidad óptica por animal en el grupo vacunado con Rev 1 y del grupo Control durante el tiempo posterior a la vacunación

Control	Rev 1
0.44	0.43
0.40	0.60
0.42	0.45
0.43	0.62
0.42	0.55
0.40	0.51
0.40	0.65
0.42	0.51
0.45	0.46
0.42	0.48
0.42	0.73
0.42	0.66
0.40	0.66
0.41	0.65
0.43	0.57
0.40	0.60

ANALISIS DE VARIANZA

F.V.*	GL	SC	CM	F	P > F	CV
Tratamientos	1	0.188	0.188	45.31	0.000	13.02%
Error	30	0.124	0.004			
Total	31	0.312				

FV = Fuente de variación

Tabla de Medias

Tratamiento	Repeticiones	Promedio
1	16	0.418
2	16	0.571

Resultados de la comparación de Medias

Tratamiento	Promedio
2	0.571 A
1	0.418 B

Nivel de Significancia: 0.05

PROMEDIO DE LOS VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA POR ANIMAL EN LOS CUATRO GRUPOS ESTUDIADOS DURANTE EL TIEMPO POSTERIOR AL DESAFÍO

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Gpo. Control	Gpo. Rev 1	Gpo. RB51	Gpo. rfbK
0.87	0.52	0.48	0.61
0.50	0.69	0.65	0.44
0.79	0.56	0.45	0.88
1.17	0.97	0.53	0.54
0.78	1.08	0.55	0.76
0.77	1.12	0.45	0.41
0.89	1.59	0.46	0.45
0.89	1.57	0.56	0.42
0.62	1.54	1.01	0.43
1.01	0.78	1.06	0.79
0.41	0.57	0.52	0.46
0.54	0.95	1.10	0.71
0.93	0.94	0.45	0.54
0.77	0.72	0.87	0.45
1.12	0.57	0.71	0.45
0.74	1.27	0.55	1.06

ANALISIS DE VARIANZA

F.V.*	GL	SC	CM	F	P > F	CV
Tratamientos	3	1.362	0.454	6.633	0.001	34.86%
Error	60	4.107	0.068			
Total	63	5.469				

FV = Fuente de variación

Tabla de Medias

Tratamiento	Repeticiones	Promedio
1	16	0.800
2	16	0.965
3	16	0.650
4	16	0.588

Resultados de la comparación de Medias

Tratamiento	Promedio
2	0.965 A
1	0.800 AB
3	0.650 BC
4	0.588 C

Nivel de Significancia: 0.05

RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA DEL ELISA INDIRECTO EN EL QUE SE USO COMO ANTIGENO CELULAS COMPLETAS DE LA CEPA RB51 DE *B. abortus*

Promedio de los valores de densidad óptica por animal en los grupos vacunados con RB51, rfbK y grupo Control durante el tiempo posvacunal.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Gpo. RB51	Gpo. rfbK	Gpo. Control
0.691	0.780	0.44
0.672	0.568	0.40
0.650	0.571	0.42
0.590	0.672	0.43
0.601	0.610	0.42
0.672	0.589	0.40
0.628	0.656	0.40
0.656	0.716	0.42
0.653	0.660	0.45
0.586	0.641	0.42
0.658	0.692	0.42
0.617	0.762	0.42
0.617	0.658	0.40
0.551	0.656	0.41
0.644	0.647	0.43
0.657	0.676	0.40

ANALISIS DE VARIANZA

F.V.*	GL	SC	CM	F	P > F	CV
Tratamientos	2	0.561	0.281	158.34	0.000	7.38%
Error	45	0.079	0.001			
Total	47	0.641				

FV = Fuente de variación

Tabla de Medias

Tratamiento	Repeticiones	Promedio
1	16	0.634
2	16	0.660
3	16	0.418

Resultados de la comparación de Medias

Tratamiento	Promedio
2	0.660 A
1	0.634 A
3	0.418 B

Nivel de Significancia: 0.05

PROMEDIO DE LOS VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA POR ANIMAL EN LOS CUATRO GRUPOS ESTUDIADOS DURANTE EL TIEMPO POSTERIOR AL DESAFIO.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Gpo. Control	Gpo. RB51	Gpo. rfbK	Gpo. Rev 1
0.90	1.05	1.03	0.97
0.72	0.92	0.89	0.88
0.98	0.82	1.16	0.79
1.01	0.93	1.06	0.80
0.92	0.97	0.87	0.83
1.00	0.89	0.95	0.73
0.94	1.01	1.05	0.80
0.84	0.99	1.02	0.88
1.04	1.04	1.00	0.75
0.92	1.06	1.15	0.89
0.77	0.83	0.96	0.81
0.99	1.08	1.08	0.79
0.94	1.05	0.93	0.64
0.83	1.03	1.02	0.69
1.07	1.05	0.97	0.74
0.91	0.89	1.04	0.84

ANALISIS DE VARIANZA

F.V.*	GL	SC	CM	F	P > F	CV
Tratamientos	3	0.302	0.101	18.40	0.000	8.74%
Error	60	0.329	0.005			
Total	63	0.631				

FV = Fuente de variación

Tabla de Medias

Tratamiento	Repeticiones	Promedio
1	16	0.822
2	16	0.891
3	16	0.928
4	16	0.748

Resultados de la comparación de Medias

Tratamiento	Promedio
3	0.928 A
2	0.891 A
1	0.822 B
4	0.748 C

Nivel de Significancia: 0.05

Resultados de cepas recuperadas a Pruebas Bioquímicas

Grupo testigo negativo

No.	Órganos	Urea	Citrato	SIM	TSI	H ₂ S ₂
178	Bazo	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
1387	Bazo, NP, NMA, NS	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2155	Bazo, NP, NMA, NME, NS	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
5308	NP	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
10708	Bazo	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
15131	NP	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
17723	Bazo	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

NP = Nódulo pre-escapular NMA = Nódulo Mamario NS = Nódulo Submaxilar NME = Nódulo Mesentérico

Grupo vacunado con RB51

No.	Órganos	Urea	Citrato	SIM	TSI	H ₂ S ₂
817	Bazo	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
19741	NP, NMA, NS	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
24351	Bazo, NP, NS	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

NP = Nódulo pre-escapular NMA = Nódulo Mamario
NS = Nódulo Submaxilar

Grupo vacunado con rfbK

No.	Órganos	Urea	Citrato	SIM	TSI	H ₂ S ₂
4917	Bazo, NP, NS,	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
21994	Bazo, NMA,	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

NP = Nódulo pre-escapular NMA = Nódulo Mamario NS = Nódulo Submaxilar

Grupo vacunado con Rev 1

No.	Órganos	Urea	Citrato	SIM	TSI	H ₂ S ₂
Arete Azul	Bazo, NP, NS, NME	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
3726	NME	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

NP = Nódulo pre-escapular NS = Nódulo Submaxilar NME = Nódulo Mesentérico