



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“RESPUESTA INMUNE HUMORAL AL ANTÍGENO
LPS LISO,
DE VACAS REVACUNADAS CON RB51 EN
HATOS CON DIFERENTES PREVALENCIAS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
R I C A R D O A L B A C R U Z

ASESORA:

MC. MARISELA LEAL HERNÁNDEZ

COASESORES:

**DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO
MVZ. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi Mamá:

Por el cariño y palabras de aliento que me has dado durante este tiempo

A mi Papá:

Por el apoyo que durante todo este tiempo me has brindado.

A mi Hermana Rosario:

Gracias por ser un ejemplo y quiero que sepas que cuentas conmigo.

A mi Hermano Eduardo:

Gracias por estar cuando te he necesitado brindándome tu ayuda.

A mi Sobrino Ángel:

Por los grandes momentos de felicidad que me ha dado este pequeño.

AGRADECIMIENTOS:

Dr. Efrén Díaz:

Te agradezco por dirigirme en la tesis, haberme brindado tu amistad y confianza. Gracias.

MC. Marisela Leal:

Por compartir parte de tu trabajo para realizar mi tesis.

Dr. Osnaya:

Gracias por su colaboración en la realización del análisis estadístico presentado en esta tesis.

MVZ. Rafael Pérez:

Por la confianza que me tuvo al canalizarme al CENID-Microbiología.

Gracias a todo el personal del CENID que me brindaron su apoyo cuando lo necesite; Arturo M., Beatriz A., Enrique H., Francisco M., Francisco V., Jesús V., Marcos M., Laura C., Laura H., Laura J., Víctor T.

Mis Amigos:

Carlos (la Flaca): Por ser neutral en las diferencias que se presentaron.

José A. (la Chepa): Eres un buen amigo cuando no eres soberbio.

Mario (la Chaparrita): No dejes de ser sincero.

Raquel (la Gorda): Encontré en ti la otra parte que me hacia falta.

Rene (el Sapo): Por tu amistad y ser un ejemplo de tenacidad.

Sedighe (diez, diez, diez): Por tener siempre una respuesta.

Vicente (el Chente): Por compartir momentos de júbilo.

A todas las personas que en la F.E.S. compartieron momentos agradables conmigo muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen

1. Introducción	1
1.1 Importancia Económica	1
1.2 El género <i>Brucella</i>	2
1.3 Estructura del Género <i>Brucella</i>	2
1.4 Vacunación	3
1.5 Factores de Virulencia	5
1.6 Inmunología de Brucelosis	6
1.7 Diagnóstico de Brucelosis	9
2. Antecedentes	12
3. Justificación	13
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	14
5.1 Objetivo General	14
5.2 Objetivos Específicos	14
6. Material y métodos	15
6.1 Grupos de Animales	15
6.2 Antígenos Usados	15
6.2.1 Prueba de IDR con Hapteno Nativo	
6.2.2 ELISA Indirecta	
6.3 Protocolo para la Obtención del Hn de <i>Brucella melitensis</i>	16
6.3.1 Obtención de Células	
6.3.2 Procesamiento del Paquete Celular	

6.3.3	Obtención del Primer Precipitado	
6.3.4	Obtención del Segundo Precipitado	
6.3.5	Segundo Precipitado	
6.4	Protocolo para la Obtención del LPS de <i>Brucella abortus</i> S19	18
6.4.1	Obtención de Células	
6.4.2	Procesamiento del Paquete Celular	
6.4.3	Obtención del Precipitado	
6.4.4	Precipitado	
6.5	Pruebas Serológicas	19
6.5.1	Prueba de IDR con HN	
6.5.2	ELISA Indirecta con LPS de <i>Brucella abortus</i> S19	
6.6	Análisis estadístico	21
7.	Resultados	22
7.1	Prueba de IDR	22
7.2	Niveles de inmunoglobulinas por grupo obtenidos del ELISA-I utilizando como antígeno LPS liso de <i>B. abortus</i> S19	24
7.3	Comparación de niveles de inmunoglobulina entre grupos, obtenidos del ELISA-I utilizando como antígeno LPS liso de <i>B. abortus</i> S19	29
8.	Discusión	35
9.	Conclusiones	39
10.	Bibliografía	40
11.	Anexos	45

RESUMEN

Con el objetivo de conocer la respuesta inmune humoral hacia el antígeno LPS de la cepa 19 de *B. abortus* (S19), en vacas revacunadas con la cepa RB51 de *B. abortus* (RB51) bajo diferentes condiciones de prevalencia de brucelosis, se trabajo con sueros de vacas tomados cada 30 días hasta 240 días posvacunación que proceden de un estudio previo realizado por Leal (2003), en el cual el objetivo fue evaluar la respuesta inmune en vacas revacunadas con RB51 a la exposición natural así como la eliminación de la cepa vacunal en leche y exudado vaginal. Las características de los grupos son las siguientes; Grupo 1: 30 vacas seronegativas revacunadas con RB51 de un hato en fase de control de brucelosis, Grupo 2: 30 vacas seronegativas de un hato libre, Grupo 3: 30 vacas seronegativas revacunadas con RB51 de un hato infectado con una prevalencia de 25.6 % de brucelosis, Grupo 4: 30 vacas seropositivas revacunadas con SRB51 pertenecientes al mismo hato que el grupo 3. La vacunación de los grupos 1, 3 y 4 la realizaron con RB51 de *B. abortus* a una dosis de 3×10^9 ufc/ml (Nova Litton). Los grupos 3 y 4 los revacunaron cuatro meses antes de iniciar el trabajo y revacunaron nuevamente 4 meses después de iniciado el trabajo. El grupo 2 no fue vacunado. Mediante la prueba de ELISA-I usando como antígeno LPS liso de la S19 de *B. abortus* y usando conjugados Anti-IgG1, Anti-IgG2 y Anti-IgM, se obtuvieron valores de Densidad Óptica (D.O.) a los cuales se les realizó una comparación de datos entre grupos, por medio de un análisis de varianza con el programa SAS en donde los valores menores a $P < 0.05$ fueron considerados como significativos. Los resultados obtenidos fueron; que los niveles mas altos de IgG1 e IgG2 los obtuvo el grupo 4 de animales seropositivos a brucelosis, con una diferencia significativa ($P < 0.05$) durante los muestreos. El grupo 1 se revacunó al inicio de los muestreos, cuatro meses antes que los grupos 3 y 4, por lo que estadísticamente no es posible compararlo con estos, pero al compararlo con el grupo 2, los niveles de IgG1 e IgG2 no mostraron diferencias significativas durante los muestreos. Pero al comparar los niveles de IgM fueron significativamente ($P < 0.05$) mayores los del grupo 2 durante todos los muestreos.

Por otro lado se evaluó el desempeño de la prueba de Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo de la cepa Rev 1 de *B. melitensis* (IDR) comparándolo con las pruebas de Tarjeta y Rivanol.

En el grupo 3 cuatro animales mostraron una respuesta posvacunal transitoria, en el grupo 4 tres de los animales del primer muestreo fueron positivos a Tarjeta y Rivanol pero negativos a IDR y en los muestreos posteriores algunas veces fueron positivos a tarjeta, en una ocasión dos presentaron títulos de 1:25 en la prueba de Rivanol, el suero de estos tres animales nunca fueron positivos a IDR, para el último muestreo estos animales fueron negativos a todas estas pruebas. De este mismo grupo dos animales que obtuvieron títulos altos en la prueba de Rivanol (1:400), en algunos muestreos fueron negativos a las pruebas de Tarjeta y Rivanol, pero nunca a la prueba de IDR.

Palabras clave: *Brucella abortus*, Respuesta Inmune Humoral, LPS, IDR y ELISA-I.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia Económica

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la brucelosis en el grupo III de enfermedades zoonóticas de riesgo. La brucelosis causa cuadros de fiebre aguda y después progresa en forma crónica, llegando a causar serias complicaciones en los sistemas músculo esquelético, cardiovascular y nervioso central. Las vías de infección son la oral, respiratoria, conjuntival, pero el consumo de productos lácteos elaborados con leche bronca constituye el principal riesgo. La población en riesgo son los granjeros, veterinarios y el personal de laboratorio encargado de procesar muestras. (1)

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) incluye a la brucelosis en la lista B de enfermedades, las cuales se definen como: “enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista económico y sanitario, y cuyos efectos para el comercio internacional de animales y productos pecuarios no son desdeñables”. (2)

Desde el punto de vista pecuario la brucelosis se puede abordar de la siguiente manera:

Salud animal: es la causa de abortos, epididimitis y orquitis, artritis (claudicación y lordosis), higrómas, abscesos supurantes, perdida de peso, formación de complejos inmunes. (3,4)

Producción y productividad: la producción láctea se ve afectada hasta en un 30% en los casos agudos y un 15% en los casos crónicos, 17% en la ganancia de peso (bovinos productores de carne), 60% en la eficiencia productiva (aumento en el periodo de días abiertos y servicios por concepción). (3)

Limitante para la comercialización: se restringe el movimiento de los animales de zonas infectadas a zonas libres (Sonora), cada año se exporta un promedio de 1,200,000 cabezas de ganado. De las cuales 170,000 son vaquillas que tienen que ser esterilizadas para minimizar el riesgo de transmisión de brucelosis. Cada tratamiento de una vaquilla tiene un costo de 29 US \$ (esterilización, tratamiento posquirúrgico, prueba de tuberculina y procedimientos oficiales). Por lo que el costo de exportación de vaquillas es de 5 millones US \$. (3,5)

1.2. El Género *Brucella*

Los miembros del género *Brucella* son bacterias patógenas Gram negativas, intracelulares facultativas que son capaces de multiplicarse en el interior de las células del hospedador, en el que estimulan una respuesta celular y humoral. (6)

Para su clasificación las brucelas se han agrupado en varias especies siguiendo el criterio de su huésped animal preferente, dentro de estas especies se pueden distinguir biotipos o biovariedades, por lo que la clasificación actual es de la siguiente manera: *Brucella melitensis* (3 biotipos), *B. abortus* (7 biotipos), *B. suis* (5 biotipos), *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis* y la especie mas recientemente identificada *B. maris* que afecta a mamíferos marinos. (6,7)

Para diferenciar el tipo de especie, se realizan pruebas como: lisis de bacteriófagos, ureasa y oxidasa. Para diferenciar biovariedades se usan cuatro pruebas complementarias; requerimiento de CO₂, producción de sulfuro de hidrógeno, sensibilidad a colorantes (tionina, fucsina básica y safranina) y la aglutinación con sueros monoespecíficos (anti-A y anti-M). (7)

1.3. Estructura del Género *Brucella*

La estructura mas característica de las bacterias Gram negativas es la envoltura celular formada por: la membrana citoplasmática, la membrana externa y un espacio periplásmico intermedio. (6)

La membrana externa es la única región bacteriana en contacto con el medio, contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un antígeno inmunodominante que es el lipopolisacárido (LPS), la distribución de este LPS junto con las proteínas (porinas) hace que actúe como una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrófilos e hidrofóbicos. (6,8) Esta membrana se diferencia de las demás Gram negativas típicas (*Pseudomonas*, Enterobacterias) ya que es permeable a agentes hidrófobos (colorantes, sales biliares y detergentes) por lo que esto se ha utilizado como una herramienta para diferenciar especies y biotipos. (6) Es resistente a péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisosima, lactoferrina y defensinas) y la polimixina B. (6,9)

El LPS consta de una parte glucolipídica (Lípido A) insertado en la membrana externa (no expuesto) y otra parte polisacárida dirigida hacia el exterior que se divide en núcleo y la cadena O, de la cual carecen las cepas rugosas. El lípido A, es un disacárido de diaminoglucosa sustituido con β hidroxiacidos y otros ácidos grasos de cadena larga. El núcleo; esta compuesto por 2-ceto, 3-deoxioctulosonato (Kdo), glucosa galactosa y quinovosamina. La cadena O, también llamado polisacárido O, constituido de N-formil-perosamina. (10,6)

El Hapteno nativo (HN) que al inicio de su identificación se le llamó segundo polisacárido O, algunos mencionan que es igual al Polisacárido O (6,11). Existe una cierta confusión en el uso de los términos HN, cadena O libre y Polisacárido B, por lo que los dos primeros se han usado equivalentemente y el tercero esta presente en la mutante rugosa cepa B115 de *Brucella melitensis* que es químicamente semejante al HN. (6)

1.4. Vacunación

Aunque la vacuna cepa 19 (S19) de *B. abortus* se ha usado en México desde 1942, no fue sino hasta principios de los 70's cuando la S19 se volvió obligatoria. (3) Becerras de 3 a 6 meses de edad que son vacunadas con dosis clásica de 5-8 x

10^{10} UFC de S19 (12,13), son resistentes durante 7 años o más a la infección (13), en las vacas se usa dosis reducida de 3×10^8 a 3×10^9 UFC (12,13). La dosis clásica no se debe usar en hembras mayores de seis meses ni menores de tres meses. (12)

Las características de la S19, son la baja patogenicidad, buena antigenicidad y alta inmunogenicidad, para su crecimiento no necesita CO_2 , crece en tionina a concentraciones de 1:500 a 1:1000, no crece en presencia de penicilina y eritritol. (13) El principal obstáculo en el uso de esta vacuna es la persistencia de títulos serológicos posvacunales persistentes, el riesgo de aborto, infección permanente en animales preñados y sexualmente maduros. (5)

En Noviembre de 1995 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña nacional contra la brucelosis en los animales. (12) En 1996 se crea la Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, como un organismo que regula y vigila los procedimientos relacionados con la salud animal, sanidad vegetal y vigilancia fitozoosanitaria de puertos y fronteras, es en este contexto donde se vigila el cumplimiento de la NOM. (14)

La vacuna de cepa RB51 (RB51) fue desarrollada por el Dr. Gerhardt G. Schuring, en 1991, es una mutante rugosa y avirulenta derivada de la cepa lisa 2308 de *B. abortus*. La RB51 se obtuvo por pases repetidos en medio de cultivo con diferentes concentraciones de rifampicina y penicilina. Después de tres pases en el medio adicionado con 50, 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina se obtuvieron colonias con morfología rugosa, lo que se comprobó por la tinción con cristal violeta y autoaglutinación en acriflavina. Una de estas colonias identificada como RB fue sometida a varios pases en diversas concentraciones de rifampicina (125 $\mu\text{g/ml}$) y penicilina (20 $\mu\text{g/ml}$) hasta obtener la cepa que carecía de la habilidad para reaccionar con un anticuerpo monoclonal (BRU38) específico para la perosamina de la cadena O. La cepa obtenida, se sometió a más pases en medio sin suplementar para estabilizar la mutación hasta llegar finalmente a la RB51. (15)

En julio de 1997 la SAGAR autoriza la venta de la vacuna de *Brucella abortus* RB51 (5,14,16) con respaldo de investigaciones realizadas en colaboración de PRONABIVE, LITTON e INIFAP. Las conclusiones de estos estudios fueron que: inmuniza a los animales contra la infección, la cepa vacunal no es eliminada en leche, no provoca abortos, no produce anticuerpos que aglutinan en pruebas oficiales, la RB51 es una herramienta principal en la campaña. (16) Sin embargo, en investigaciones recientes se ha demostrado que se elimina en leche y secreciones vaginales hasta los 7, 67, 120 días posparto. (17,18,19)

La dosis reducida de la RB51 de $1-3 \times 10^9$ UFC es comercialmente producida para vacas adultas y para becerras se usa la dosis normal de $1-3 \times 10^{10}$ UFC de RB51. (16,5) En dosis becerro de los 3 a 12 meses de edad y la dosis reducida en vacas adultas en hatos con más del 3% de prevalencia o no conocida. (14,5)

1.5. Factores de Virulencia

Los verdaderos elementos de virulencia de la *Brucella* son los determinantes moleculares que le permiten invadir, resistir la muerte intracelular y buscar su replicación dentro de fagocitos profesionales y no profesionales. (20)

La *Brucella* una vez opsonizada es internalizada vía complemento y por receptores Fc de monocitos y macrófagos, después de su internalización se encuentra dentro de una vacuola que fue establecido por la célula hospedera, minutos después, la bacteria estaría localizada dentro de un compartimiento multimembranoso autofagosomal y continuando con la maduración de la vacuola en los tiempos tardíos de la infección, las brucelas virulentas se encontrarán presentes dentro del retículo endoplásmico en el que se replican. (20,21)

Las cepas de brucelas no virulentas que son utilizadas como vacunas vivas, como es el caso de la RB51 y S19 de *B. abortus*, tienen un tránsito intracelular diferente de las cepas virulentas, ya que en más del 90% de los casos, estas

bacterias pasan por el endosoma temprano, el endosoma tardío y por último por los lisosomas en donde son destruidas y los péptidos son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie de la célula a los Th1 y Th2 para provocar una respuesta inmune. (20)

La vacunación con S19 o algunas fracciones de esta inducen una respuesta de linfocitos T, similar pero no igual a la que induce la RB51, ya que S19 persiste en los linfonodos por mayor tiempo que RB51. (22)

Brucella utiliza sus sistemas de secreción del tipo IV, que les permiten inyectar dentro del citoplasma de la célula hospedera, efectores bacterianos como son complejos de ADN-proteínas o proteínas las cuales modifican el metabolismo celular (acidificación del fagosoma (pH 4)) del hospedero y permiten así la sobrevivencia de las bacterias. (9,20,21)

El LPS de *Brucella* no es pirógeno, no activa el sistema del complemento de manera significativa y su actividad como mitógeno sobre células B murinas es muy débil. Además, se requiere por lo menos 10 veces más de LPS de *Brucella* para inducir letalidad y la producción de interferón en comparación con las endotoxinas de las enterobacterias. (20)

1.6. Inmunología de Brucelosis

Durante el curso de la infección por microorganismos intracelulares en los que se incluye *B. abortus*, las células infectadas necesitan matar a la bacteria o ser muertas para que *B. abortus* pueda ser atacada por otros mecanismos de eliminación como son los mediados por anticuerpos. (23)

Las estructuras moleculares en la superficie del microorganismo son primero reconocidos por receptores Fc, los cuales liberan señales para activar las células presentadoras de antígenos (CPA en las que se incluyen macrófagos y células

dendríticas) y facilitar la fagocitosis de la bacteria. Esta reacción inicial no es antígeno específica y es dada por la inmunidad innata. Las bacterias que se internalizaron son muertas y procesadas hasta formar o reducirlos a péptidos antigénicos que junto con el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) se expresarán en su membrana para ser reconocidos por los Linfocitos T (LT). (22,23)

Los LT reconocen los antígenos por medio de receptores de células T (TCR's compuestos por cadenas α/β y/o γ/δ) asociados a un co-receptor CD4 (linfocitos ayudadores o Th) o CD8 (linfocitos citotóxicos o Tc), estos co-receptores deciden que tipo de MHC reconoce. (14) Por lo que los LT CD4+ TCR α/β reconocen el MHC-I y los LT CD8+ TCR α/β reconocen MHC-II. (22,23)

Las CPA usualmente proveen dos señales las cuales se requieren para una óptima activación de los LT; vía unión TCR/MHC-péptido y moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 de las CPA que se unen al receptor CD28 de los LT. Los LT activados a su vez pueden activar a las CPA por el ligando CD40 que interactúa con el CD40 de las CPA además de la producción de INF- γ . (23) Por otro lado los LT TCR γ/δ , son parte del sistema innato, cuando se activan producen IL-2 e INF- γ que estimula a los LT TCR α/β . (22)

Los linfocitos Th se han subclasificado en dos subpoblaciones dependiendo de las citocinas que liberan o producen:

Linfocitos Th1 o células T inflamatorias. IL-2, IFN- γ , e TNF- β

Linfocitos Th2 ó células ayudadoras en la producción de anticuerpos: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. (21,23)

Tabla 1 La subpoblación que dominara Th1 o Th2 dependerá de de la producción de las siguientes citocinas

CITOCINA	CÉLULAS QUE LA PRODUCEN	ACCIÓN
Interferón Gamma (INF- γ)	Th ₁	Deprime Th ₂
Interleucina 4 (IL-4)	Th ₂	Estimula Th ₂
IL-10	Th ₂	Deprime Th ₁
IL-12	Macrófagos y Células B	Estimula Th ₁

Las citocinas secretadas por los LT CD4+ TCR α/β ayudan a los LT CD8+ TCR α/β a ser citotóxicas y a los Linfocitos B (LB) a transformarse en células plasmáticas, que son promotoras para iniciar la producción de IgM y de otras clases y subclases de inmunoglobulinas de tipo IgG, producidas en la respuesta humoral contra microorganismos intracelulares como lo es *Brucella*. Presumiblemente estos anticuerpos tienen una mejor capacidad que los otros isotipos para reconocer antígenos microbiales en la superficie de las células infectadas y procesadas. Sus propiedades son atribuidas a la longitud y flexibilidad de la región de la bisagra. (22)

Las células NK son parte de la primera línea de defensa contra los patógenos, después de su activación son capaces de matar células blanco, las cuales han sido infectadas. *B. abortus* puede activar a las células NK por inducir la secreción de IL-12 por parte de las CPA y LB, lo que desencadena que las células NK comiencen a matar células blanco y secreten INF- γ . (23)

Estudios recientes indican que el papel principal de los Lth1 es la liberación principalmente de INF- γ , juega un papel importante en la activación de los macrófagos limitando la infección de *Brucella* tanto *in vitro* como *in vivo*. (22,23)

A la inversa de la citocina de los Th2, la IL-10 puede suprimir la función de los macrófagos e incrementar la susceptibilidad de la infección. Las clases y subclases de los diferentes tipos de inmunoglobulinas, son influenciadas por el tipo de Linfocitos Th involucrados en la interacción LT-LB y principalmente por las citocinas

que secretan. Por lo tanto, los linfocitos Th1 que secretan $\text{INF-}\gamma$ causa en los ratones que se active el gen productor de inmunoglobulinas, de modo que predomina IgG2a, mientras que los linfocitos Th2 que secretan IL-4 promueve la producción de IgG1 e IgGE (Fig. 1). (23)

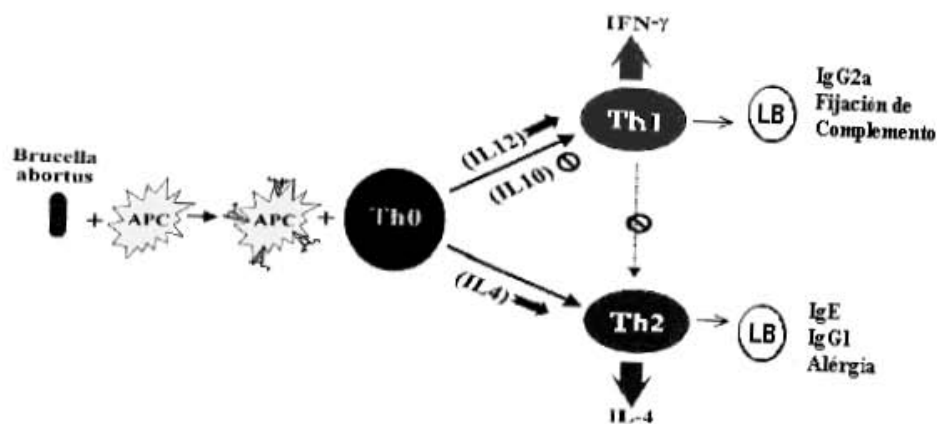


Figura 1 Citocinas involucradas en la infección por *B. abortus*, desencadenan que las CPA liberen IL-12, lo cual provoca que los Th0 se diferencien en Th1, secretando $\text{INF-}\gamma$. Este ocasiona que se inicie la producción de IgG2a en el ratón. Este isotipo junto con la fijación de complemento, se ha asociado contra infecciones virales y bacterias intracelulares

1.7. Diagnostico de Brucelosis

El diagnostico de brucelosis bovina se debe de realizar en laboratorios aprobados por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), con muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y muestras de tejidos, mediante pruebas inmunológicas, estudios bacteriológicos u otros que sean autorizados por la SAGARPA. Las pruebas inmunológicas para las brucelas lisas son; la prueba de tarjeta, rivanol, fijación de complemento y la prueba de anillo en leche. (12)

Prueba de Tarjeta:

Se ha observado que es la prueba cualitativa más sencilla y con una sensibilidad de 97 al 100%, por lo que es raro encontrar falsos negativos, su especificidad es baja 77.6%, por lo que presenta alrededor de un 32% de falsos positivos, y se ha utilizado como prueba tamiz. Considerando positivos aquellos sueros que presenten cualquier tipo de aglutinación. (8,12,24)

Prueba de Rivanol:

Es una prueba complementaria, presenta una sensibilidad del 83% y una especificidad del 93%. (25) Se identifican los tubos con el número del suero, se agregan 400 μ l del suero y 400 μ l de solución de Rivanol, mezclar y dejar reposar por 30 min. Posteriormente centrifugar a 3,000 rpm. por 5 min., depositar en la placa 80, 40, 20, 10, y 5 μ l. del sobrenadante y agregar a cada una 30 μ l del antígeno y mezclar (utilizar diferente punta por suero y por dilución), las diluciones obtenidas serán; 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. Se le da un movimiento rotatorio ligero durante un minuto, para proseguir con la lectura de esta prueba con una fuente de luz para observar con mayor claridad los grumos. (12,25,26)

Prueba de Fijación de Complemento:

Esta prueba presenta resultados más confiables con alta sensibilidad y especificidad, ya que las reacciones con antígenos heterólogos son menores y los anticuerpos posvacunales fijadores del complemento desaparecen más rápido que los anticuerpos aglutinantes. (27)

Prueba de Anillo en Leche:

Se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en la leche de vacas infectadas y se usa en vigilancia epidemiológica. Esta prueba se practica con leche cruda, fluida y fresca. El antígeno debe tener una concentración de 4.5% de *B.*

abortus cepa 1119-3 teñido con hematoxilina. En caso de que la muestra sea positiva se formara un anillo de color azul debido a la unión antígeno-anticuerpo más los glóbulos de grasa que ascienden por efecto del calor al ser incubados a 37 °C por una h. (28)

Prueba de IDR con HN:

Esta prueba presenta una alta especificidad para diferenciar animales con infección demostrada por aislamiento bacteriológico de los vacunados con S19, en el caso más desfavorable, que se da en la revacunación de adultos con la S19, su especificidad es del 80%. Los sueros se consideraron positivos en aquellos que aparezca un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo, y se observa claramente cuando se ilumina oblicuamente contra un fondo oscuro. (11,29)

2. ANTECEDENTES

Stevens y Olsen 1996, reportaron en un ELISA-I con un antígeno a partir de células completas de *B. abortus* cepa 2308, los bovinos vacunados con SRB51 (5×10^9 UFC) tuvieron un incremento significativo en la concentración de IgG pero no de IgM a las cuatro semanas posvacunación. (30)

Díaz *et. al.* (2003) Encontraron usando un ELISA-I con lipopolisacárido (LPS) liso como antígeno, en vacas infectadas niveles elevados de IgG2 y de IgG1 en vacas vacunadas y revacunadas con SRB51 y cuando utilizaron LPS-R de la SRB51 no hubo diferencias entre isotipos ni entre grupos. (31).

Leal-Hernández *et al* (2005), en un grupo de 35 vacas preñadas que fueron vacunadas de becerras con 1×10^{10} UFC de SRB51 y revacunadas de adultas con dosis reducida de SRB51 posteriormente fueron introducidas a un hato con una prevalencia del 38% de brucelosis, 5 de las 35 vacas resultaron positivas a la prueba de Tarjeta, solo 2 fueron positivas a Tarjeta y Rivanol, y de estas dos fue aislada la cepa virulenta, ninguna de las vacas abortaron y concluyeron satisfactoriamente la gestación. (19)

Los sueros usados en este trabajo fueron tomados cada 30 días hasta 240 días pos-vacunación, y proceden de un estudio previo realizado por Leal (2003), en el cual, el objetivo fue evaluar la respuesta inmune en vacas revacunadas con SRB51 a la exposición natural así como la eliminación de la cepa vacunal en leche y exudado vaginal. La vacunación de los grupos 1, 3 y 4 la realizaron con SRB51 de *B. abortus* a una dosis de 3×10^9 ufc/ml (Nova Litton). Los grupos 3 y 4 los revacunaron cuatro meses antes de iniciar el trabajo y revacunaron nuevamente 4 meses después de iniciado el trabajo. El grupo 2 no fue vacunado. (32)

3. JUSTIFICACIÓN

Se desconocen las características de la respuesta inmune humoral al antígeno LPS de la S19 de *B. abortus* en animales revacunados con cepa RB51 y expuestos a cepas de campo en zonas de alta prevalencia como lo es México.

Por otro lado se ha observado en México que al revacunar vacas con la cepa RB51 algunas resultan positivas a la prueba de tarjeta por algunos meses y posteriormente se vuelven negativos. (19)

4. HIPÓTESIS

La presencia de anticuerpos del isotipo IgG1 frente al LPS liso, son directamente proporcionales a la prevalencia de brucelosis de los hatos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar de la respuesta inmune humoral, en vacas revacunadas con RB51 bajo diferentes condiciones de prevalencia de brucelosis, mediante la prueba de ELISA-I usando como antígeno LPS Liso de la cepa S19 y evaluar el desempeño de a prueba de Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo de la cepa Rev 1 de *B. melitensis* (IDR).

5.2. Objetivos Específicos

Estandarizar la prueba de ELISA indirecto con antígeno LPS liso, usando como conjugados Anti-IgG1, Anti-IgG2 y Anti-IgM.

Medir mediante la prueba de ELISA la respuesta inmune humoral a los isotipos IgG1, IgG2 e IgM, en vacas revacunadas con RB51 bajo diferentes condiciones de prevalencia.

Evaluar la IDR con los sueros de vacas revacunadas con RB51 bajo diferentes condiciones de prevalencia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Grupos de animales

Grupo 1:

30 vacas en pastoreo, seronegativas a brucelosis, revacunadas con SRB51 en un hato en fase de control de brucelosis localizado en Tepozotlán, Estado de México, con una población de 150 animales con un sistema de explotación semi-intensivo.

Grupo 2:

30 vacas en pastoreo, seronegativas a brucelosis, de un hato libre de brucelosis localizado en el Estado de Veracruz con una población de 1,500 animales en un sistema de explotación extensivo.

Grupo 3:

30 vacas estabuladas, seronegativas a brucelosis, revacunadas con SRB51, de un hato infectado con una prevalencia de 25.6 % de brucelosis un año antes de iniciar el trabajo, localizado en Tizayuca, Hidalgo, con una población de 550 animales en un sistema de explotación intensivo.

Grupo 4:

30 vacas estabuladas, seropositivas a brucelosis, revacunadas con SRB51, pertenecientes al mismo hato que el grupo 3.

6.2. Antígenos Usados

6.2.1. Prueba de IDR con Hapteno Nativo (HN):

Se utilizó el HN liofilizado de la cepa Rev 1 de *B. melitensis*, diluyéndose a una concentración de 1 mg de HN por 1 ml de agua destilada estéril.

6.2.2. ELISA Indirecta:

Se utilizó el LPS liofilizado de la cepa S19 de *B. abortus*, diluyéndose a una concentración de 2.5 µg de LPS por 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2 estéril.

6.3. Protocolo para la obtención del HN de *Brucella melitensis*

6.3.1. Obtención de células

Se prepararon botellas de Roux con 50 ml de agar brucela y un 5% de agar base, se sellaron con aluminio y papel, para ser esterilizadas junto con el agar. Una vez estériles se colocaron de forma horizontal para que se formara una película de agar en la parte plana de estas botellas, se mantuvieron en la estufa bacteriológica a 37 °C como prueba de esterilidad.

Se prepararon inóculos de *B. melitensis* con 48 h de crecimiento a una temperatura de 37 °C en tubos con agar brucella, se les inocularon 5 ml de PBS estéril en cada tubo para suspender las células, se recuperó la mayor cantidad de PBS para ser utilizado como inóculo.

Se les inyectó 2.5 ml del inóculo a cada botella de Roux, dejándolas reposar por 15 min antes de introducirlas a la estufa bacteriológica a una temperatura de 37 °C por 72 h procurando que la película de agar quede en la parte superior. Se observaron las botellas a las 24 h en caso de observar contaminación, se desecharon.

Se preparó una solución al 10% de fenol, diluyéndolo en PBS para inyectar 5 ml por botella, con movimientos lentos cubrir el interior de la botella e incubar por 24 h más, de esta manera se inactivaron las brucelas.

Para cosechar las brucelas se le añadió 10 ml de PBS por botella para resuspender la mayor cantidad de células, se juntó en un matraz el contenido de todas las botellas. Para obtener el paquete celular se centrifugó a 7,500 rpm por 15 min. Una vez obtenido el paquete celular se le realizó dos lavados con PBS.

6.3.2. Procesamiento del paquete celular

Una vez obtenido el paquete celular y conocido el peso húmedo, se resuspendió con agua destilada a razón de 100 ml por cada 30 g de peso húmedo, se colocó en un matraz de vidrio con tapa y se rompieron las células en el autoclave por 30 min a 120 °C con vapor fluente. Una vez frío se retiraron los restos celulares por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C.

6.3.3. Obtención del primer precipitado

El sobrenadante obtenido se precipitó agregándole tres volúmenes de etanol, manteniéndolo en agitación y refrigeración por 18 h, se centrifugó a 5,000 rpm 15 min a 4 °C para obtener el primer precipitado que es rico en LPS, proteínas y un poco de HN.

6.3.4. Obtención del segundo precipitado

Al sobrenadante obtenido del primer precipitado se le agregaron dos volúmenes mas de etanol se dejó precipitar a -20 °C durante 24 h, se centrifugó a 5,000 rpm 15 min a 4 °C para obtener el segundo precipitado que es rico en HN.

6.3.5. Segundo precipitado

Este precipitado se resuspendió en una pequeña cantidad de agua destilada y se colocó en membranas (Spectra/Por, Molecularporus Membrana Tubing) para dializar por 24 h, cambiando el agua en 4 ocasiones.

Una vez dializado se colocó 1 ml en viales de vidrio con tapón de hule y se congelaron a -20 °C para posteriormente ser liofilizado a -40 °C con una presión de vacío de 133×10^{-3} mBar (Freeze dry Sistem / Freezone 4.5, LABCONCO) una vez terminado el proceso que duró aproximadamente 36 h, se sellaron los viales, quedando listos para usarse. (33,34)

6.4. Protocolo para la obtención del LPS de *Brucella abortus* S19

6.4.1. Obtención de células

Se creció la cepa en placas de agar brucela por 48 h a 37 °C, se le realizaron frotis y tinción de Gram para comprobar pureza. Las placas se incubaron por 4 días a 37 °C.

Para cosechar las bacterias de las placas, se preparó una solución al 10% de fenol, diluyéndolo en PBS, se añadió 1 ml de esta solución a cada placa y con la ayuda de una varilla de vidrio (doblada en forma de T) se resuspendieron las bacterias y se recuperó la mayor cantidad de la solución en un matraz estéril, de esta manera se cosecharon las placas.

Las bacterias cosechadas permanecieron 24 h en refrigeración para su inactivación. Para obtener el paquete celular se centrifugó a 7,500 rpm por 15 min. Una vez obtenido el paquete celular se le realizó dos lavados con PBS.

6.4.2. Procesamiento del paquete celular

Una vez obtenido el paquete celular y conocido el peso húmedo, se resuspendió con agua destilada a razón de 100 ml por cada 30 g de peso húmedo, se colocó en un matraz de vidrio con tapa y se rompieron las células en el autoclave por 30 min a 120 °C con vapor fluente. Una vez frío se retiraron los restos celulares por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C.

6.4.3. Obtención del precipitado

El sobrenadante obtenido se precipitó agregándole tres volúmenes de etanol, manteniéndolo en agitación y refrigeración por 18 h, se centrifugó a 5,000 rpm 15 min a 4 °C para obtener el primer precipitado que es rico en LPS, proteínas y una pequeña cantidad de HN.

6.4.4. Precipitado

Este precipitado se resuspendió en una pequeña cantidad de agua destilada y se colocó en membranas (Spectra/Por, Molecularporus Membrana Tubing) para dializar por 24 h, cambiando el agua en 4 ocasiones.

Una vez dializado se colocó 1 ml en viales de vidrio con tapón de hule y se congelaron a -20 °C para posteriormente ser liofilizado a -40 °C con una presión de vacío de 133×10^{-3} mBar (Freeze dry Sistem / Freezone 4.5, LABCONCO) una vez terminado el proceso que duró aproximadamente 36 h se sellaron los viales, quedando listo para usarse. (34)

6.5. Pruebas serológicas

6.5.1. Prueba de IDR con HN

Se realizó a los sueros procedentes del hato de alta prevalencia (grupos 3 y 4). Los sueros se consideraron positivos en aquellos que aparezca un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo.

Preparación del gel, (3ml/placa) los cálculos son para 20 µg de HN/ml como concentración final. Habitualmente el título de HN es de este orden o inferior. (Anexo 2)

6.5.2. ELISA-Indirecto con LPS de *B. abortus* S19

Se realizó en todos los sueros. En el ganado bovino se han utilizado infinidad de antígenos, así como diferentes métodos de extracción de los mismos, obteniendo valores muy altos de sensibilidad y especificidad, usando LPS es de 100% y 96% respectivamente. (35)

Conjugados

Se utilizó anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgM de bovino conjugados con peroxidasa, producidos en ovinos (Laboratorios Bethyl, Texas, USA).

Adsorción del antígeno en las placas

Para obtener una adsorción pasiva del antígeno se adicionaron 100 µl de la solución de LPS diluido en cada pozo de la microplaca (96 pozos de fondo plano NUNC, MaxiSorp) y se incubó por 24 h a 37 °C, el antígeno que no es adsorbido se eliminó mediante tres lavados con PBS conteniendo 0.05 % de Tween 20 (PBS Tween 20, ver anexo 3).

Bloqueo de las Placas

Se utilizó una solución 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 minutos a 37°C. Se realizaron 4 lavados a las microplacas con PBS-Tween 20. Posteriormente las placas se cubrieron con plástico adhesivo y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Los sueros que se trabajaron se diluyeron a una concentración de 1:200 (v/v).

Realización de la Prueba

Se adicionaron 100 μ l del suero problema a cada pozo incubando las placas por 60 min a 37°C. Se realizaron cuatro lavados a las microplacas con PBS-Tween 20. Posteriormente se agregaron 100 μ l de conjugado diluido a una concentración de 1:2000 (v/v) con PBS en cada pozo, se incubó por 60 min a 37°C. Se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 20.

Se colocaron 100 μ l del sustrato a cada pozo y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente en agitación moderada. Como sustrato se usó el ácido 2-2 azinobis 3-etilbenzotiazolina sulfónico (ABTS) en pastillas de 10 μ g Laboratorios SIGMA, (Anexo 4).

Posterior a la incubación se realizó una lectura de manera inmediata a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro múltiple (EIA multi-well reader, Sigma Diagnostics), provisto de un impresor de datos.

Se realizaron tres repeticiones independientes y los valores de densidad óptica que se obtuvieron se promediaron por grupo, por muestreo y por inmunoglobulina, para ser analizados y comparados entre grupos.

6.6. Análisis Estadístico

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

7. RESULTADOS

7.1. Prueba de IDR.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la prueba de IDR comparándolos con las pruebas anteriormente realizadas por Leal (2003). Todos los sueros de los grupos 1 y 2 fueron negativos a la prueba de Tarjeta, por lo que no se realizó a estos la prueba de Rivanol, sin embargo, al probar el HN se incluyeron algunos de estos sueros como controles negativos.

En el grupo 3 al cual pertenecían animales seronegativos del hato con alta prevalencia de brucelosis cuatro animales mostraron una respuesta posvacunal transitoria la cual consistió en que después de la revacunación estos animales fueron positivos a la prueba de tarjeta durante 1 a 3 meses posrevacunación. Pero solo en los últimos muestreos encontramos dos animales positivos a Rivanol y al probarlos con IDR resultaron positivos.

En el grupo 4 formado por animales seropositivos residentes en hato con una elevada prevalencia de brucelosis, tres de los animales del primer muestreo fueron positivos a Tarjeta y Rivanol pero negativos a IDR y en los muestreos posteriores algunas veces fueron positivos a tarjeta, en una ocasión dos presentaron títulos de 1:25 en la prueba de Rivanol, el suero de estos tres animales nunca fueron positivos a IDR, para el último muestreo estos animales fueron negativos a todas estas pruebas. De este mismo grupo dos animales que obtuvieron títulos altos en la prueba de Rivanol (1:400), en algunos muestreos fueron negativos a las pruebas de Tarjeta y Rivanol, pero no a la prueba de IDR.

Tabla 2 Resultados de las pruebas de Tarjeta, Rivanol e IDR de los grupos 3 y 4, obtenidos en los ocho muestreos.

GRUPO	MUESTREO	TOTAL DE ANIMALES	POSITIVOS A TARJETA	%	POSITIVOS A RIVANOL	%	POSITIVOS A IDR	%
Grupo # 3 Hato Infectado (Animales Seronegativos)	1	30	0					
	2	30	0					
	3	30	0					
	4	30	1	3.3				
	5	30	3	10				
	6	29	4	13.8				
	7	29	5	17.2	2	6.9	1	3.4
	8	27	2	7.4	2	7.4	2	7.4
Grupo # 4 Hato Infectado (Animales Seropositivos)	1	30	30	100	30	100	20	66.6
	2	26	24	92.3	23	88.5	19	73.1
	3	26	24	92.3	23	88.5	20	76.9
	4	23	18	78.3	16	69.6	16	69.6
	5	22	19	86.4	17	77.3	16	77.7
	6	20	19	95.0	15	75.0	14	70.0
	7	19	17	89.5	13	68.4	14	73.7
	8	18	15	88.3	13	72.2	13	72.2

7.2. Niveles de Inmunoglobulinas por grupo obtenidos del ELISA Indirecto utilizando como antígeno LPS liso de *B. abortus* S19

Grupo 1 animales seronegativos residentes en un hato en fase de control de brucelosis.

En el Gráfico 1 se observa que los niveles de IgG1 e IgG2 no mostraron diferencias significativas con respecto al primer muestreo pero con la inmunoglobulina IgM se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los muestreos 4^o, 5^o y 6^o.

Grupo 2 animales seronegativos residentes en un hato libre de brucelosis.

En el Gráfico 2 Se aprecian diferencias significativa ($P < 0.05$) en los siguientes muestreos, la IgG1 en el 3^o, la IgG2 en los 2^o, 3^o, 5^o y 6^o y la IgM solo en el 4^o, con respecto al primero.

Grupo 3 animales seronegativos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis.

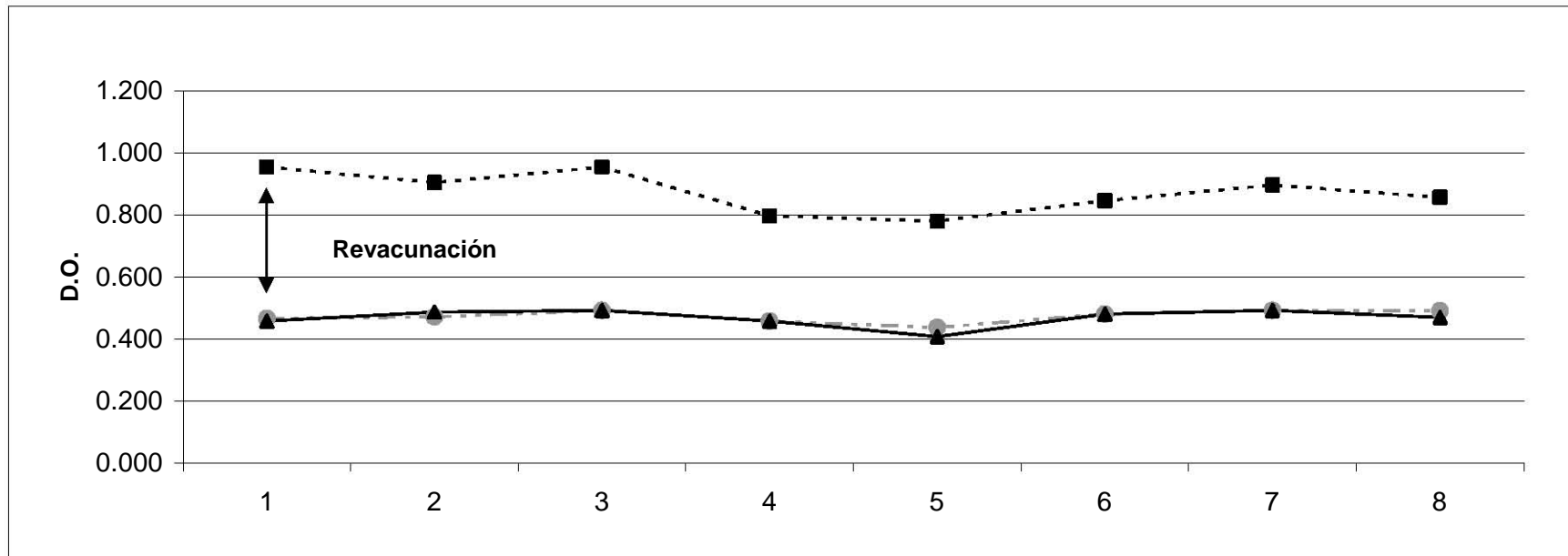
En el Gráfico 3 se observa que los niveles de IgG1 fueron en ascenso hasta al cuarto muestreo, con una diferencia significativa ($P < 0.05$), en los muestreos posteriores disminuyeron con excepción del último donde aumentó. Los niveles de IgG2 mostraron una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el 2^o y 6^o. Los niveles de IgM comparándolos con el primero, tuvieron una diferencia significativa ($P < 0.05$), en los primeros cinco y en los últimos no se encontró una diferencia significativa.

Grupo 4 animales seropositivos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis.

En el Gráfico 4 se puede apreciar que los niveles de IgG1 en los siete primeros muestreos aumentaron con diferencia significativa ($P < 0.05$). Los niveles de IgG2 aumentaron con diferencia significativa ($P < 0.05$) en los muestreos 2^o y 3^o comparándolos con el primero, en el 4^o se observó un descenso, en el 5^o y 6^o no se observaron diferencias significativas y en los últimos fueron menores que el primero con una diferencia significativa ($P < 0.05$). Los niveles de IgM fueron menores con diferencia significativa ($P < 0.05$) observándose esto hasta el 5^o muestreo, en los posteriores no se observo diferencia significativa.

Gráfico 1 Niveles de Inmunoglobulinas obtenidas del ELISA-I usando como antígeno el LPS liso de *B. abortus* S19.

Grupo 1 animales residentes en un hato en fase de control de brucelosis.

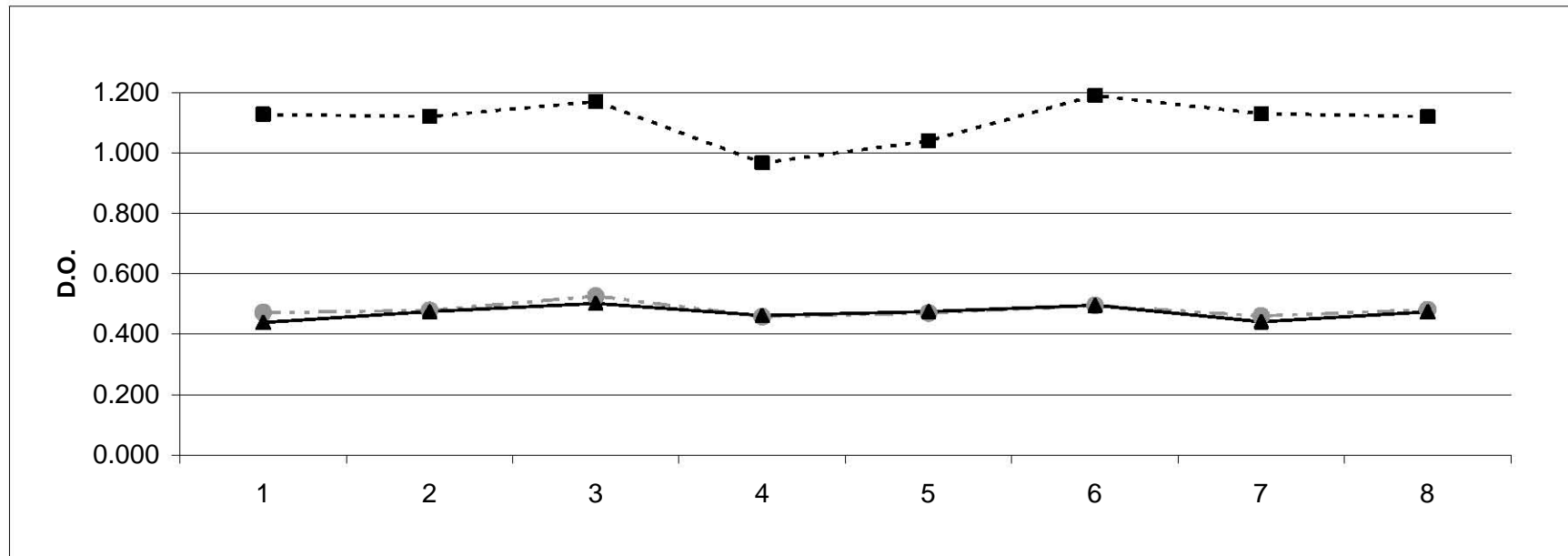


Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8
IgG1 -●-	0.46606 ±0.015a	0.47104 ±0.015a	0.49174 ±0.015a	0.4577 ±0.015a	0.4372 ±0.015a	0.48032 ±0.015a	0.49194 ±0.015a	0.49072 ±0.015a
IgG2 -▲-	0.4576 ±0.011a	0.48646 ±0.011a	0.49174 ±0.011a	0.4577 ±0.011a	0.40752 ±0.011b	0.48032 ±0.011a	0.49194 ±0.011a	0.46934 ±0.011a
IgM -■-	0.95414 ±0.032a	0.90408 ±0.032a	0.95422 ±0.032a	0.79744 ±0.032b	0.77988 ±0.032b	0.84536 ±0.032b	0.8968 ±0.032a	0.85626 ±0.032a

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

Gráfico 2. Niveles de Inmunoglobulinas obtenidas del ELISA-I usando como antígeno el LPS liso de *B. abortus* S19.

Grupo 2 animales residentes en un hato libre de brucelosis.

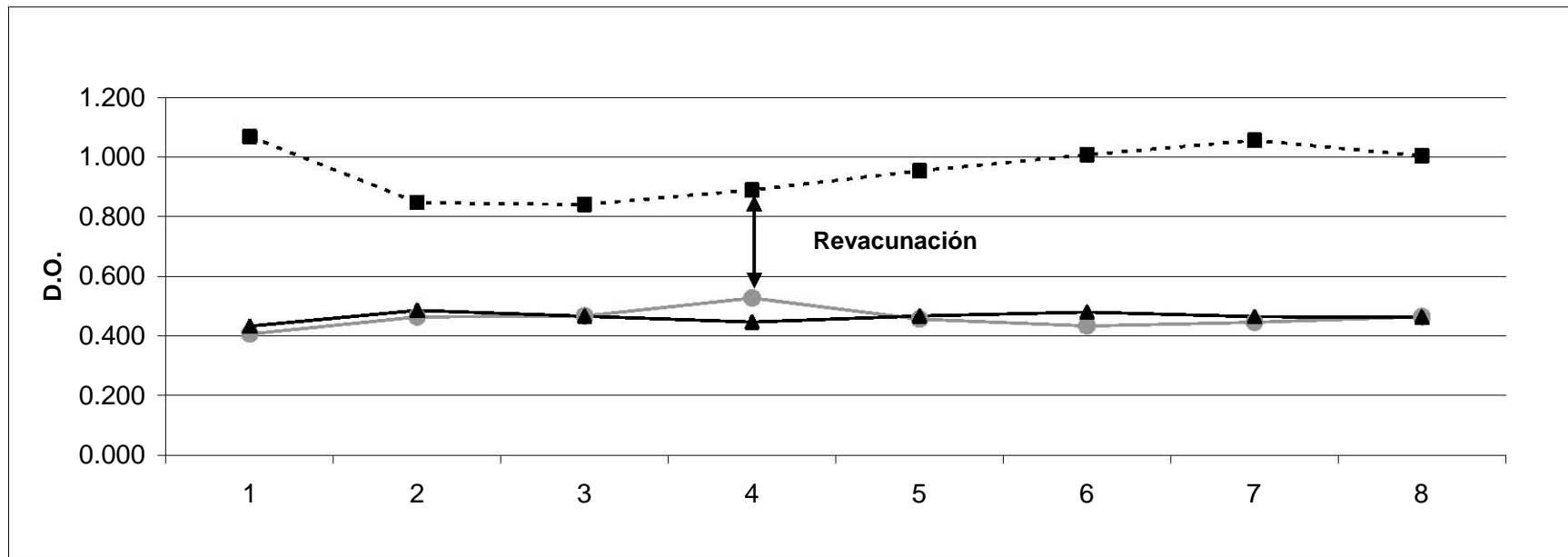


Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8
IgG1 -●-	0.47187 ±0.015a	0.47858 ±0.015a	0.52635 ±0.015b	0.45823 ±0.015a	0.46981 ±0.015a	0.49469 ±0.015a	0.45994 ±0.015a	0.48117 ±0.015a
IgG2 ▲	0.43817 ±0.011a	0.47488 ±0.011b	0.50200 ±0.011b	0.46204 ±0.011a	0.47488 ±0.011b	0.49552 ±0.011b	0.44115 ±0.011a	0.47395 ±0.011a
IgM ■	1.12794 ±0.032a	1.12015 ±0.032a	1.17008 ±0.032a	0.96694 ±0.032b	1.04035 ±0.032a	1.19015 ±0.032a	1.12993 ±0.032a	1.12063 ±0.032a

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

Gráfico 3. Niveles de Inmunoglobulinas obtenidas del ELISA-I usando como antígeno el LPS liso de *B. abortus* S19.

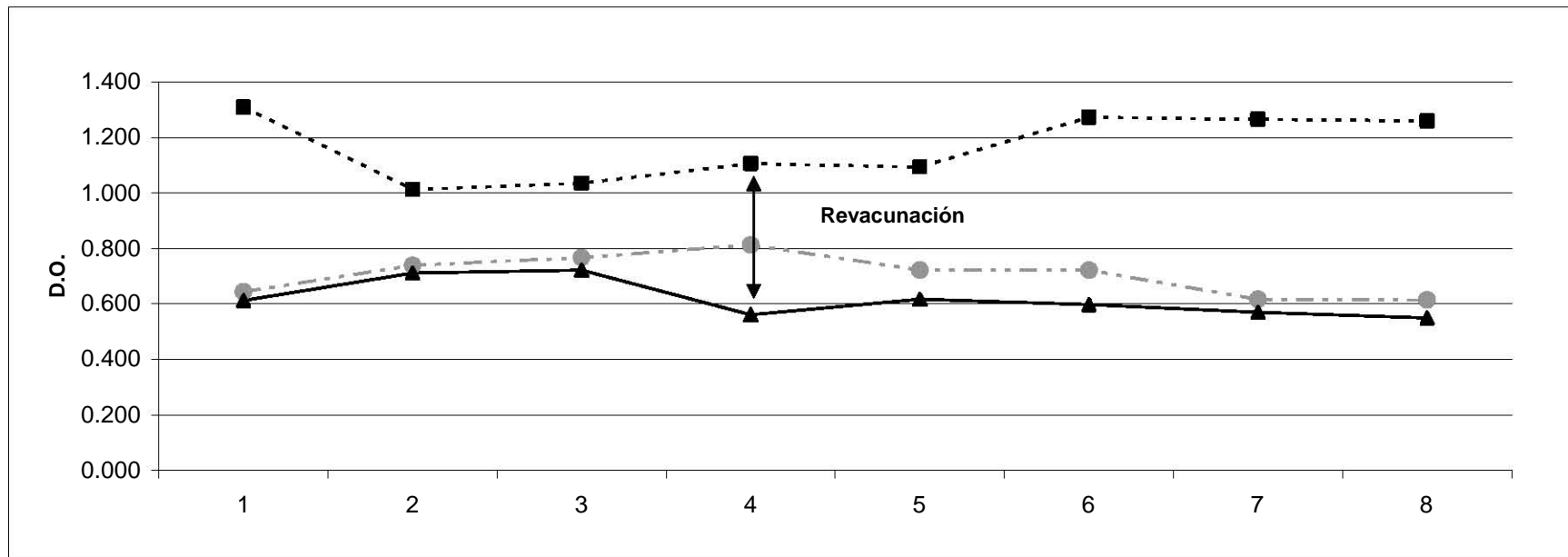
Grupo 3 animales seronegativos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis.



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

Gráfico 4. Niveles de Inmunoglobulinas obtenidas del ELISA-I usando como antígeno el LPS liso de *B. abortus* S19.

Grupo 4 animales seropositivos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis.



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

7.3. Comparación de niveles de inmunoglobulina entre grupos, obtenidos del ELISA-I utilizando como antígeno LPS liso de *B. abortus* S19.

Niveles de IgG1

En el Gráfico 5 se observa que los niveles mas altos de IgG1 los obtuvo el grupo 4 animales seropositivos a brucelosis, con una diferencia significativa ($P < 0.05$) durante los muestreos. Al comparar el grupo 3 formado por animales seronegativos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis con el grupo 2 animales seronegativos de un hato libre de brucelosis se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los muestreos 1°, 3° y 4°, pero nunca hubo un predominio en los niveles de IgG1 para alguno de estos dos grupos.

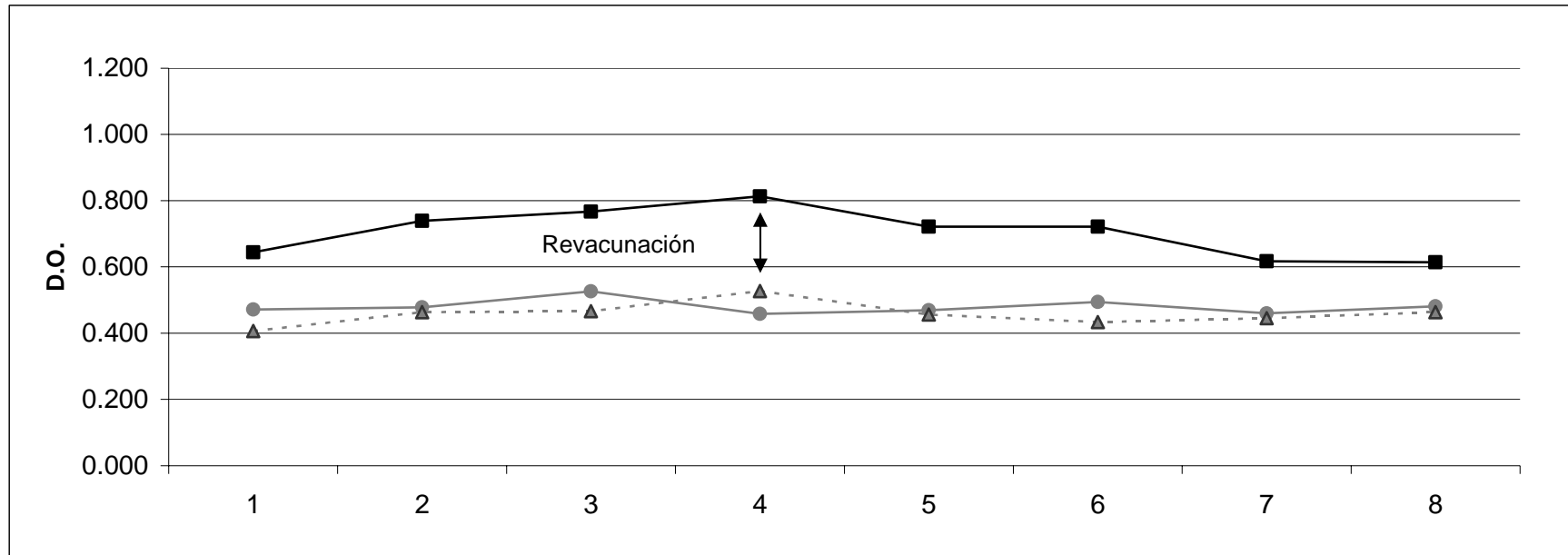
Niveles de IgG2

Como se puede apreciar en el Gráfico 6 el grupo 4 de animales seropositivos de un hato con alta prevalencia de brucelosis obtuvo niveles más altos de IgG2 con una diferencia significativa ($P < 0.05$) en todos los muestreos, pero al comparar los grupos 2 al cual pertenecían animales seronegativos residentes en un hato libre de brucelosis y el grupo 3 formado por animales seronegativos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis, no se observó ninguna diferencia significativa durante los muestreos.

Niveles de IgM

El gráfico 7 muestra que los niveles de IgM del grupo 3 formado por animales seronegativos residentes en un hato con alta prevalencia son significativamente ($P < 0.05$) más bajos que el grupo 4 integrado por animales seropositivos de un hato con alta prevalencia de brucelosis y de la misma forma sucede con el grupo 2 al cual pertenecían animales seronegativos residentes en un hato libre de brucelosis. Pero al comparar los grupos 2 y 4 no se observa un predominio en los niveles de IgM para ninguno de estos dos grupos.

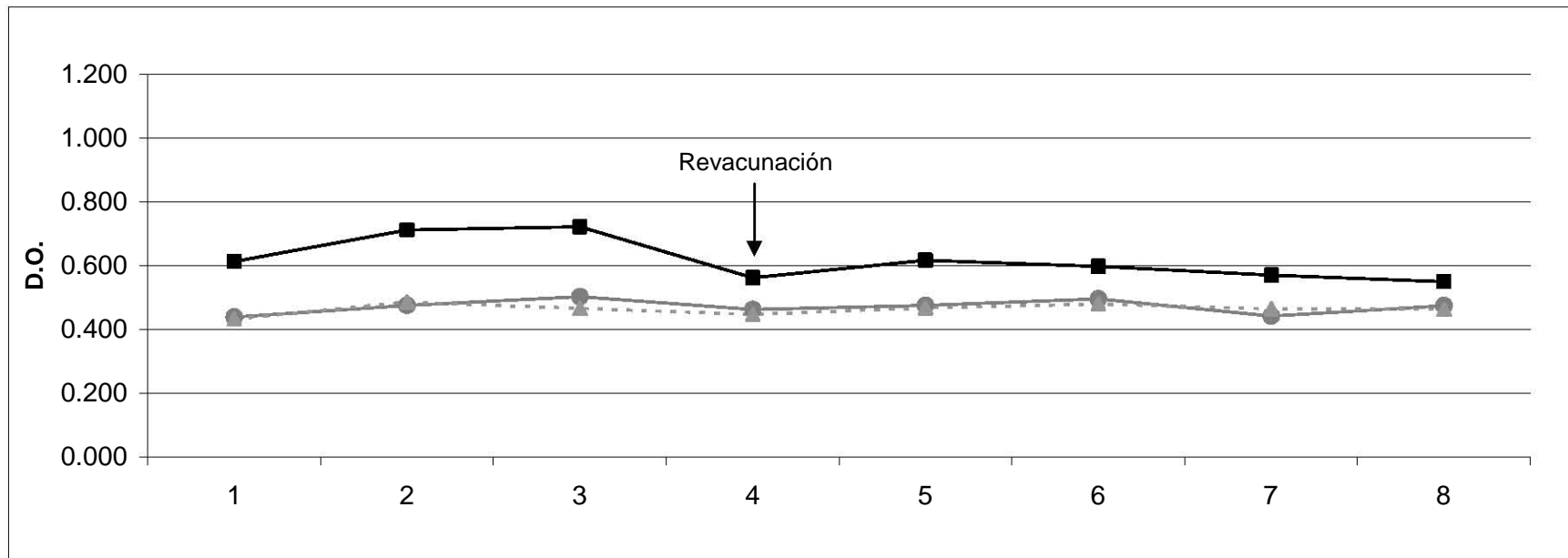
Gráfico 5 Comparación de niveles de IgG1 entre **grupo 2** animales seronegativos de un hato libre de brucelosis, **grupo 3** animales seronegativos y **grupo 4** animales seropositivos, ambos pertenecientes a un hato con alta prevalencia de brucelosis



2	0.47187	0.47858	0.52635	0.45823	0.46981	0.49469	0.45994	0.48117
-◇-	±0.015a	±0.015a	±0.015a	±0.015a	±0.015a	±0.015a	±0.015a	±0.015a
3	0.40680	0.46355	0.46670	0.52696	0.45638	0.43334	0.44541	0.46384
-▲-	±0.014b	±0.014a	±0.014b	±0.014b	±0.014a	±0.014a	±0.014a	±0.014a
4	0.64433	0.73950	0.76715	0.81315	0.72195	0.72195	0.61695	0.61450
-■-	±0.017c	±0.017c	±0.017c	±0.017c	±0.017c	±0.017c	±0.017c	±0.017c

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

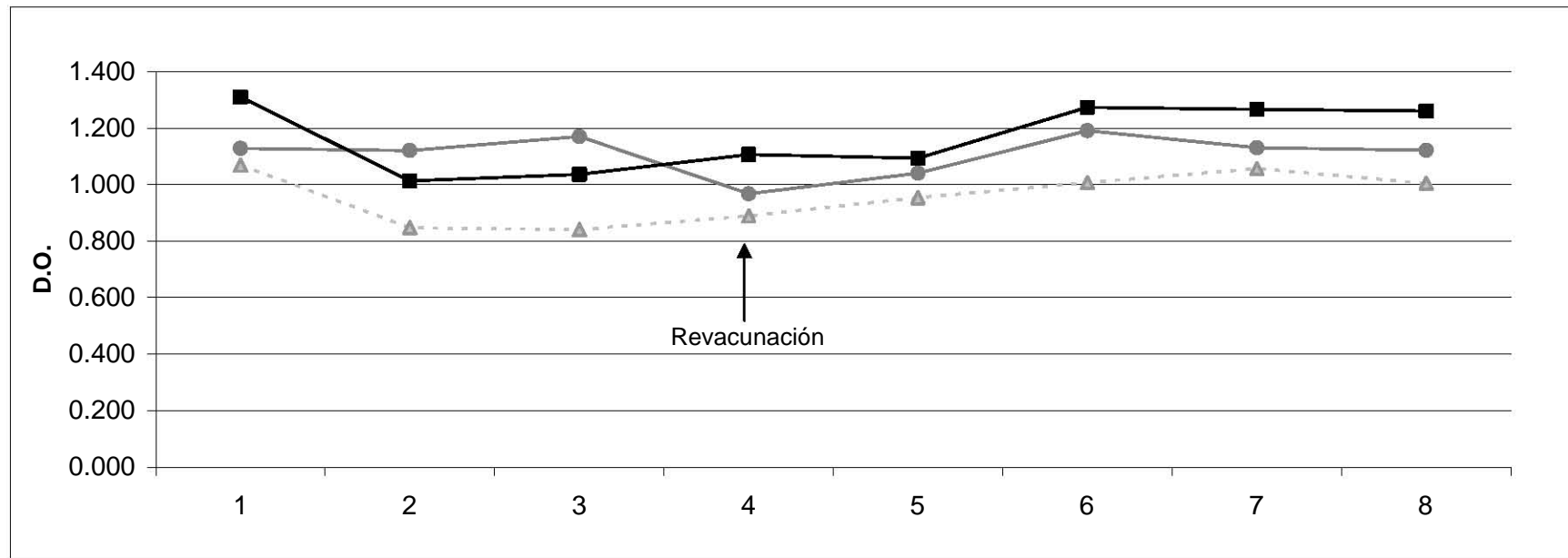
Gráfico 6 Comparación de niveles de IgG2 entre **grupo 2** animales seronegativos de un hato libre de brucelosis, **grupo 3** animales seronegativos y **grupo 4** animales seropositivos ambos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis



2 -◆-	0.43817 ±0.010a	0.47488 ±0.010a	0.50200 ±0.010a	0.46204 ±0.010a	0.47488 ±0.010a	0.49552 ±0.010a	0.44115 ±0.010a	0.47395 ±0.010a
3 -▲-	0.43259 ±0.010a	0.48564 ±0.010a	0.46552 ±0.010a	0.44670 ±0.010a	0.46705 ±0.010a	0.47959 ±0.010a	0.46393 ±0.010a	0.46266 ±0.010a
4 -■-	0.61293 ±0.012c	0.71143 ±0.012c	0.72163 ±0.012c	0.56125 ±0.012c	0.61660 ±0.012c	0.59770 ±0.012c	0.57005 ±0.012c	0.54955 ±0.012c

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

Gráfico 7 Comparación de niveles de IgM entre **grupo 2** animales seronegativos de un hato libre de brucelosis, **grupo 3** animales seronegativos y grupo 4 animales seropositivos ambos residentes en un hato con alta prevalencia de brucelosis



2	1.12794	1.12015	1.17008	0.96694	1.04035	1.19015	1.12993	1.12063
-◆-	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a
3	1.06827	0.84686	0.84034	0.88911	0.95357	1.00700	1.05621	1.00421
-▲-	±0.030a	±0.030b	±0.030b	±0.030a	±0.030a	±0.030b	±0.030a	±0.030b
4	1.30995	1.01290	1.03580	1.10625	1.09375	1.27300	1.26600	1.26040
-■-	±0.036c	±0.036c	±0.036c	±0.036c	±0.036c	±0.036c	±0.036c	±0.036c

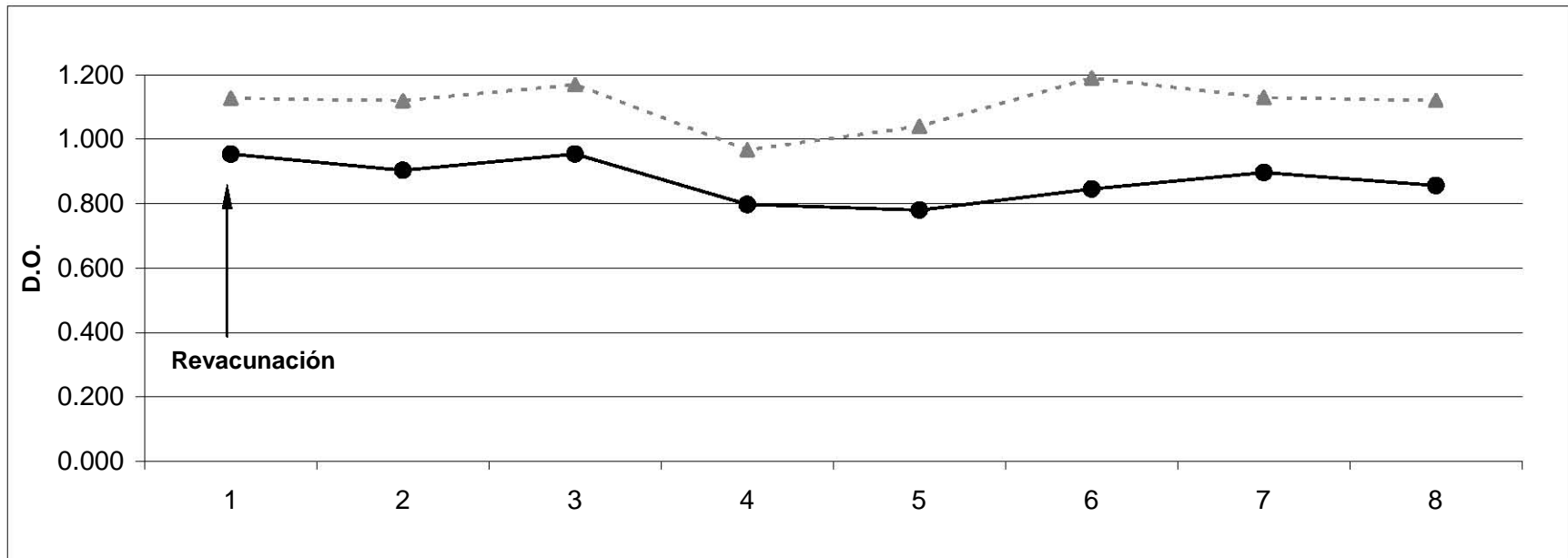
Letras diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($P < 0.05$)

Comparación de inmunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgM entre el grupo 1 animales seronegativos residentes en un hato en control de brucelosis y el grupo 2 animales seronegativos residentes en un hato libre de brucelosis.

El grupo 1 se revacunó al inicio de los muestreos, cuatro meses antes que los grupos 3 y 4, por lo que estadísticamente no es posible compararlo con estos, pero se puede comparar con el grupo 2, obteniendo que al comparar los niveles de IgG1 e IgG2 no se encontraron diferencias significativas durante los muestreos.

Pero al comparar los niveles de IgM fueron significativamente ($P < 0.05$) mayores los del grupo 2 durante todos los muestreos, como se puede apreciar en el gráfico 8.

Gráfico 8. Comparación de niveles de IgM entre el **grupo 1** animales seronegativos residentes en un hato en control de brucelosis y el **grupo 2** animales seronegativos residentes en un hato libre de brucelosis.



1 -●-	0.95414	0.90408	0.95422	0.79744	0.77988	0.84536	0.89680	0.85626
	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a	±0.032a
2 -▲-	1.12794	1.12015	1.17008	0.96694	1.04035	1.19015	1.12993	1.12063
	±0.032b	±0.032b	±0.032b	±0.032b	±0.032b	±0.032b	±0.032b	±0.032b

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

8. DISCUSIÓN

Varios autores coinciden en que la respuesta inmune humoral de los bovinos frente a la vacunación con S19, aparecen las IgM alrededor de los cinco días posteriores a la vacunación, alcanzando su pico a los 13 días, persistiendo por más tiempo que lo que sucede en una infección con cepas de campo. Las IgG1 aparecen simultáneamente o un poco después que las IgM y su pico lo alcanzan entre los 28-42 días, posteriormente comienzan a declinar haciéndose imperceptibles a los ocho meses después de la vacunación. (8,10,17,31,36,37,38)

En los bovinos infectados con cepas de campo de *B. abortus* los anticuerpos que aparecen primero son los del tipo IgM, desde la primera a la tercera semana post-infección. Posteriormente, la IgG es predominante y generalmente la subclase IgG1 es la más abundante, persistiendo los títulos de aglutinación hasta por 10 meses. Los títulos de IgM descienden gradualmente, mientras que los títulos de IgG permanecen con títulos elevados. En caso de infecciones crónicas de campo las IgM declinan a niveles muy bajos y la actividad residual reside en los isotipos IgG1 e IgG2 que permanecen con niveles altos. (31,36,38). Lo referido anteriormente respecto a la respuesta humoral de animales infectados con cepas de campo de *B. abortus*, es lo que se esperaba que se presentase en el grupo seropositivo del hato con alta prevalencia. Sin embargo, se obtuvieron niveles de IgG1, IgG2 e IgM fueron mayores que el grupo seronegativo en hato libre, pero las IgM nunca fueron mas bajas que las IgG's, entre estas las más altas fueron de tipo IgG1. Estos datos son similares a los encontrados por Nielsen y Duncan (1988), en los controles positivos con infección demostrada por una cepa de campo de *B. abortus*, los cuales presentaron una respuesta alta de IgG1 e IgM y bajos niveles de IgG2. (39)

La propiedad de la vacuna RB51 de no inducir anticuerpos detectables contra el LPS-S en las pruebas serológicas oficiales en los animales vacunados (15), se puede corroborar en el grupo 1 formado por animales seronegativos residentes en un hato en fase de control de brucelosis, los cuales al ser revacunados no cambiaron su estatus inmunológico a las pruebas Tarjeta, Rivanol e IDR durante los muestreos,

pero en los animales seronegativos procedentes del hato de alta prevalencia (grupo 3) si se observaron reactores nuevos a las pruebas anteriormente mencionadas después de la revacunación, pero en el ELISA no se observó aumento en los niveles de inmunoglobulinas. Stevens y Olsen (1996), demostraron que en becerras vacunadas con *B. abortus* RB51, producen una pequeña cantidad de IgG's en el suero pero no de IgM, demostrado por medio de ELISA usando como antígeno células completas de la cepa 2308 de *B. abortus*, pero en el ELISA usando como antígeno el LPS de la misma cepa no se encontró producción de IgG ni de IgM. Sin embargo, las IgG's encontradas no aglutinaron en la prueba de aglutinación estándar en tubo. En la prueba de "Western blot" se encontró que el suero de estas vacas contienen IgG's que reaccionan con proteínas de 84 a <20 kDa. (30)

Lord., *et al* (1998), llevaron a cabo un estudio para evaluar la respuesta inmune en bovinos vacunados y revacunados con RB51 y revacunados con S19, bajo condiciones de campo de alta (39%) y baja prevalencia (2%), estos animales fueron monitoreados por 12 meses utilizando pruebas convencionales (tarjeta, rivanol, aglutinación en tubo, fijación de complemento) además de la prueba de IDR, sus resultados fueron que los animales vacunados con S19 cambiaron su estatus inmunológico volviéndose positivos a estas pruebas e incluso después de 30 días algunos fueron positivos a IDR, en contraste con los animales vacunados con RB51 donde los resultados en todos los muestreos y en los dos hatos fueron negativos. (40) Esto es diferente a lo que encontramos en este trabajo ya que en el grupo 4 de animales seronegativos de un hato de alta prevalencia de brucelosis, encontramos reactores nuevos a las pruebas de aglutinación y hubo otros positivos a la prueba de IDR o con títulos altos de rivanol, los que con base a estudios previos nos indica que son animales infectados (41,11), por lo que la vacuna SRB51 no ofreció una protección total como en el estudio anterior.

En la mayoría de los hatos de México no hay eliminación de animales positivos, estos llegan a alcanzar tasas de prevalencia muy altas, por lo que en estos hatos la posibilidad de presentarse reactores nuevos es mayor. Lo que ha llevado a prácticas erróneas como son la utilización de la revacunación en diferentes tipos de

esquemas (cada año, cada 6 meses, e incluso hasta cada 3 meses). La revacunación esta contemplada por la Norma Oficial Mexicana, ya sea con S19 o RB51, pero se especifica que se podrá realizar solamente una vez en vacas de hatos localizados en zonas endémicas de la enfermedad. (12) La revacunación no tiene un sustento científico que explique que una vacuna viva, como son el caso de la S19 y RB51, para despertar una sólida respuesta celular y humoral debe aplicarse repetidamente, ya que el uso de una revacunación repetida puede llegar a provocar en los animales una respuesta de hipersensibilidad tardía o tipo IV debido a la constante administración del antígeno. (42,11)

La revacunación repetida con S19, puede provocar un aumento en la posible eliminación post-vacunal a través de la leche, ya que con una sola revacunación con dosis reducida, se presenta desde un 0.5 a un 2 % de vacas que eliminan la cepa vacunal. (42) De la misma forma ocurre con la RB51 de la cual hay reportes de que se elimina en leche y secreciones vaginales hasta los 7, 67, 120 días posparto. (17,18,19,)

Por todo lo anterior el diagnóstico se ha dificultado, ya que el uso de la S19 ocasiona seroconversión y la RB51 una respuesta pos-vacunal transitoria, la Norma Oficial Mexicana menciona que el diagnóstico de Brucelosis bovina se debe realizar mediante las pruebas de Tarjeta, Rivanol, Fijación de complemento y anillo en leche. (12) Estas pruebas no han sido suficientes en zonas endémicas para diferenciar animales infectados de vacunados; se han evaluado otras pruebas como la prueba de IDR que se puede usar como prueba complementaria.

En diferentes trabajos se ha empleado la prueba de IDR con hapteno nativo, se ha observado una especificidad de por lo menos del 80% en ganado bovino vacunado, tanto con dosis clásica como dosis reducida de cepa 19 y una sensibilidad del 96 %. Se ha descrito la capacidad que tiene la IDR para identificar animales positivos después de la vacunación con dosis reducida, comparada con otras pruebas como tarjeta, rivanol y fijación de complemento. (41,42)

Aparicio *et al*, (2003), al probar la especificidad de IDR, utilizando 40 becerras vacunadas con la S19 a dosis clásica por vía subcutánea, se observó que dos meses después de la vacunación, no hubo presencia de animales positivos a la prueba de IDR. (41)

Leal-Hernández *et al* (2005), en un grupo de 35 vacas preñadas que fueron vacunadas de becerras con 1×10^{10} UFC de SRB51 y revacunadas de adultas con dosis reducida de SRB51 posteriormente fueron introducidas a un hato con una prevalencia del 38% de brucelosis, 17 de las 35 vacas resultaron positivas a la prueba de Tarjeta, 2 fueron positivas a Tarjeta y Rivanol, y de estas dos fue aislada la cepa virulenta, ninguna de las vacas abortaron y concluyeron satisfactoriamente la gestación. (20) El que un animal de positivo a la prueba de tarjeta después de ser revacunado con SRB51 (respuesta pos-vacunal transitoria) se presentó en el grupo 4 formado por animales seropositivos residentes en un hato con una elevada prevalencia de brucelosis, tres de los animales del primer muestreo fueron positivos a Tarjeta y Rivanol pero negativos a IDR y en los muestreos posteriores algunas veces fueron positivos a tarjeta, en una ocasión dos presentaron títulos de 1:25 en la prueba de Rivanol, estos tres animales nunca fueron positivos a IDR, para el último muestreo estos animales fueron negativos a todas estas pruebas. De la misma forma se observó en el grupo 3 al cual pertenecían animales seronegativos del hato con alta prevalencia de brucelosis cuatro animales mostraron una respuesta post-vacunal transitoria la cual consistió en que después de la revacunación estos animales fueron positivos a la prueba de tarjeta durante uno a tres meses pos-revacunación.

Díaz-Aparicio *et al* (2006) explican que la respuesta post-vacunal transitoria es dada por la estimulación primaria con RB51 que desencadena la respuesta inmune primaria contra *B. abortus* y posteriormente debido a la extensiva diseminación de las cepas de campo en las zonas endémicas las vacas desarrollan una respuesta secundaria cuando entran en contacto con las cepas de campo. La presencia de estos anticuerpos demuestra que los animales tuvieron contacto con la cepa de campo, pero su sistema inmune fue capaz de controlar la infección. (31)

9. CONCLUSIONES

Se comprobó que la presencia de anticuerpos del isótopo IgG1 frente al LPS liso, es directamente proporcional a la prevalencia de brucelosis de los hatos.

La respuesta posvacunal transitoria se presenta en los hatos con alta prevalencia, donde las vacas son vacunadas y revacunadas con la RB51.

La prueba de IDR tuvo un excelente comportamiento, durante el desarrollo de este trabajo en comparación con la prueba de Tarjeta, ya que discriminó animales con respuesta pos-vacunal transitoria, por lo que se aconseja su uso como prueba confirmatoria.

11. ANEXOS

Anexo 1: Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2 (PBS)

Para preparar 1 L de PBS

- Cloruro de Sodio 8 g
- Cloruro de Potasio 1.2 g
- Fosfato Bibásico de Sodio 1.44 g
- Fosfato Monobásico de Potasio 1.024 g

Anexo 2: Soluciones y preparación del gel para la prueba de IDR

Solución **A** (amortiguador de glicina pH 7.8)

- Glicina 7.3g
- Cloruro de sodio 5.73g
- Agua destilada 450 ml

Llevar el pH a 7.8 con NaOH 1N (4g/100 ml de agua) y aforar con agua destilada hasta 500ml.

Solución **B** (Agarosa)

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

Calentar el agua, añadir la azida y la agarosa agitando y calentar en baño maría a 100 ° C hasta que se torne transparente y desaparezcan los grumos.

Solución **C** (Stock HN)

- 1 mg de Hapteno Nativo en 1ml de agua destilada.

Preparación del gel.

- Se disuelve 1g de NaCl. en 5 ml de solución A.
- Añadir 200 µl de la solución C a 5 ml de la solución A+NaCl y mezclar.
- Se calienta la mezcla anterior en baño María a 60 ° C.
- Añadir 5 ml de solución B, previamente fundida y mezclar.
- Verter la mezcla (con pipeta caliente) en las placas (adicionar la cantidad necesaria que proporcione un espesor de gel de 2 mm).
- Se deja solidificar 15 min, esperar 24 h antes de emplearlas.
- Las placas se pueden almacenar en refrigeración en un recipiente cerrado con humedad durante 15 días.
- Perforar pocillos con sacabocados a una distancia mínima de 4mm entre ellos y extraer el gel con agujas o pipeta Pasteur conectada al vacío.
- Llenar los pozos con 10 a 15 µl de suero e incubar las placas en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante 24 h.

Anexo 3: Solución de PBS Tween

Se utilizó el detergente Tween 20 a una concentración de 0.5%, esto es 0.5 ml por litro de PBS.

Anexo 4: Amortiguador de Citrato-Fosfato 0.05 M con un pH 5.0

Solución A

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| • Ácido Cítrico Monohidratado 0.1 M | 10.5 g |
| • Agua destilada | 500 ml |

Solución B

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| • Fosfato de Sodio Bibásico 0.2 M | 28.5 g |
| • Agua destilada | 500 ml |

Para obtener el amortiguador se mezclan 24.3 ml de la solución A con 25.7 ml de la solución B y se afora con agua destilada a 100 ml.

Cada pastilla de 10 µg de ABTS se disuelve al momento de usarse en 100 ml de este amortiguador, una vez disuelto se le agrega 25 µl de peróxido de hidrógeno al 30 %.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial animals (mammals, birds and bees) 2004: Vol. 1. Paris Francia.
2. FAO-OIE-WHO. Anuarios de Sanidad Animal. 1993-1995. Sanidad Animal.
3. Luna-Martínez J. E, Suárez-Güemes F. Introducción. En: Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México (Acapulco) 1998:3-11.
4. Suárez-Güemes F. Introducción. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis, INIFAP, SAGAR. México. 2001:1-8
5. Luna-Martínez J. E, Mejía-Terán C. Brucelosis in México: current, status and trends. Veterinary Microbiology. 2002:90:19-30.
6. Moriyón I, López-Goni I. Estructura, Genética y Fisiología del Género *Brucella*. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001:17-27
7. Marin-Alcalá C.M, Blasco-Martínez J.M. Diagnostico bacteriológico de la brucelosis animal. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001:28-46
8. Díaz-Aparicio E., Suárez-Güemes F. Diagnostico de Brucelosis. En: Curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México. 1995:221-226
9. Lapaque N, Moriyón I, Moreno E, Gorvel J. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Current Opinion in Microbiology. 2005:8:60-66.
10. Sánchez CY, Piedra PL, Gonzáles SM. Inmunológica de la *Brucella abortus*. UAM. Departamento de producción agrícola y animal, México 1998. www.intramed.uam.mx/brucc-content.htm.

11. Bustamante-Sánchez J, Salazar-Hernández F. I, Díaz-Aparicio E. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. Técnica Pecuaria México. 2000:38(1)34-42.
12. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
13. Rodríguez-Heres G. Vacunación vs Brucelosis, vacunas C-19 y REV-1. En: Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México (Acapulco) 1998:117-134.
14. Luna-Martínez J. E., Mateos-Poumian A. Campaña de control de la Brucelosis. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México 2001:213-216.
15. Schuring G.G., Roop R.M. Biological properties of RB51; a stable rouge strain of *Brucella abortus*. Veterinary Microbiology. 1991:28:171-188.
16. Blanch-Castel H. Experiencias en México con la vacunación con RB51 vs brucelosis. En: Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México (Acapulco) 1998:175-179
17. Samartino L.E., Fort M., Gregoret R., Schuring G.G. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhoo vaccination with strain 19 in Argentina. Preventive Veterinary Medicine 2000:45:193-199.
18. Uzal F.A., Samartino L., Schurig G. Effect of Vaccination with *Brucella abortus* Strain RB51 on Heifers and Pregnant Cattle. Veterinary Research Communications. 2000:24(3)143-151.
19. Leal-Hernández M., Díaz-Aparicio E., Pérez-González R. Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced in a herd with active Brucellosis, with presence of atypical humoral response. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 2005:28:63-70.
20. Susana Mendoza, Antonio Morilla. Evolución de las Enfermedades. Ed. FES-UNAM. 2006. In Press.
21. Martin-Roop R., Bellaire B.H. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. Molecular Microbiology. 2004:52(3):621-630.

22. Wyckoff III J. H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* 2002:90:395-415.
23. Golding B, Scott D, Scharf O. Immunity protection against *B. abortus*. *Microbes and infection*. 2001:3:43-48.
24. Mancera-Martínez A. Prueba de Antígeno Brucelar o de Tarjeta. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México 2001:80-86.
25. Leal-Hernández M., Martínez- Martínez O. L. Prueba de Rivanol. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México 2001:82-86.
26. López-Merino A. Elaboración de antígenos para diagnóstico, uso e interpretación. En: Curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México 1995:179-183.
27. Cobos-Marín L., *et al.* Fijación de Complemento. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México 2001:56-79.
28. Mancera-Martínez A., Velásquez-Quezada F., Ontiveros-Corpus M. de L. Prueba de Anillo en Leche. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México 2001:87-88.
29. Hernández-Andrade L., Díaz-Aparicio E. Prueba de Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo para el Diagnóstico de Brucelosis. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México 2001:100-102.
30. Mark G. Stevens, Steven C. Olsen. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. *Infection and Immunity*. 1996:64(3)1030-1034.

31. Díaz-Aparicio E., Arellano-Reynoso B., Herrera-López. Caracterización de la respuesta inmune transitoria en vacas inmunizadas con RB51 y su implicación en el diagnostico en zonas endémicas de brucelosis. En: Memorias: 2^{do}. Simposio Internacional de Brucelosis. Tabasco México 2003:19-20.
32. Leal Hernández M. Respuesta inmune en bovinos vacunados con RB51, a la exposición natural con *Brucella abortus* y eliminación de la cepa vacunal en leche y exudado vaginal. (Tesis de Maestría). Distrito Federal México: Universidad Nacional Autónoma de México 2003.
33. Díaz R., Toyos J., Salvo M. D., Pardo M. L. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use n the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. Annuary of Research Veterinary. 1981:12:35-39.
34. Díaz-Aparicio E., Marin B., Alonso-Urmeneta B. Evaluation of serological test for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. Journal of Microbiology. 1994:32(5):1159-1165.
35. Bautista-Ortiz M., Ochoa-Díaz V. Técnicas de Inmunoenzayo Ligadas a Enzimas. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México 2001:92-95.
36. Alastair MacMillan. Convencional Serological Test. En: Klaus Nielsen., Duncan J.R. Animal Brucelosis. Boca Raton. CRC Press. 1990:153-197
37. Álvarez-Martínez M., Rodríguez-Ferri E. F. Zoonosis. II Curso sobre enfermedades transmisibles entre los animales y el hombre. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Secretaria de Publicaciones y Medios Audiovisuales. León España 2002.
38. Nicoletti P. Immune Responses and Vaccination. En: Monir Madkur M. Brucelosis. Great Britain at the University Press. Cambridge 1989. 263-269.
39. Nielsen Klaus., Duncan J.R. Antibody Isotype in Adult Cattle Vaccinated with *Brucella abortus* S19. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1988:19:205-214.

40. Lord V.R., Schurig G.G., Cherwonogrodzky J.W. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51 an 19 under high and low disease prevalence. *Journal of Veterinary Research*. 1998;59:1016-1020.
41. Aparicio-Bahena A., Díaz-Aparicio E., Hernández-Andrade L. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Técnica Pecuaria México*. 2003;41(2):129-140.
42. González-Miranda E., Hernández-Andrade L., Díaz-Aparicio E. Prueba de Inmunodifusión radial con Hapteno nativo para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*. *Técnica Pecuaria México*. 2006;44(2):269-276.