

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**BRUCELLA ABORTUS, SUS CAUSAS Y SUS CONSECUENCIAS**

**POR**

**MIGUEL AGUILAR HERNANDEZ**

**MONOGRAFIA:**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARACIAL PARA**

**OBTENER EL TITULO DE**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREON, COAHUILA, MEXICO**

**DICIEMBRE 2010**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**BRUCELLA ABORTUS, SUS CAUSAS Y SUS CONSECUENCIAS**

**POR**

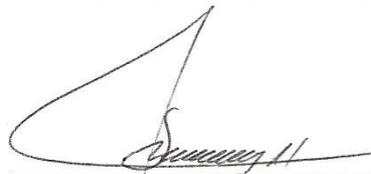
**MIGUEL AGUILAR HERNANDEZ**

**MONOGRAFIA:**

**PRESENTADA COMO REQUISISTO PARACIAL PARA**

**OBTENER EL TITULO DE**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**



**MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO**

**Asesor principal**



**Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal**

**TORREON, COAHUILA, MEXICO**

**DICIEMBRE 2010**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

BRUCELLA ABORTUS, SUS CAUSAS Y SUS CONSECUENCIAS

POR

MIGUEL AGUILAR HERNANDEZ

MONOGRAFIA:

ELABORADA BAJO LA SUPERVISION DEL COMITÉ DE ASESORIA Y  
APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO

DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO

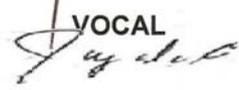
PRESIDENTE

  
\_\_\_\_\_  
IZ. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS

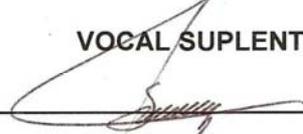
VOCAL

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. CUAUHEMOC FELIX ZORRILLA

VOCAL

  
\_\_\_\_\_  
MC. JOSE DE JESUS QUEZADA AGUIRRE

VOCAL SUPLENTE

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO

COORDINADOR REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TORREON, COAHUILA, MEXICO

DICIEMBRE 2010



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

## DEDICATORIAS

Este presente trabajo va dedicado a todas aquellas personas que brindaron su apoyo ya que con mucho esfuerzo y sacrificio me dieron el apoyo para poder terminar la carrera de medico veterinario zootecnista.

A mis abuelos, por haberme enseñado en la vida las cosas que debe de hacer uno para poder lograr sus metas y quedarse viendo la vida de diferente manera

A mi mama por haberme dado la vida primero y por apoyarme incondicionalmente haciendo esfuerzos y sacrificios para poder darme la tranquilidad de seguir adelante, por darme todo aquello que necesitaba y lo que no también, por que no, por darme los consejos que se necesitan en la vida para poder ser una gran persona, por esto y por muchas cosas mas te dedico este trabajo mama.

A mis hermanos que supieron ser pacientes y confiaron en mí para poder lograr esta meta.

También va dedicada para Marisol mi pareja que día con día me animo a seguir adelante y no dejo que quedara esto a medias.

También va dedicada a todas aquellas personas que no confiaron en mi pero con esfuerzos y sacrificios aquí esta este resultado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi “alma mater” por darme la oportunidad de haber realizado mis estudios en sus instalaciones y apoyarme con los instrumentos que se necesitan para poder lograr la carrera.

Agradezco a todos aquellos profesores que conocí en esta institución me enseñaron lo que ellos sabían para poder lograr esta meta.

Un agradecimiento especial para mi madre que me apoyo incondicionalmente dándome las herramientas para poder seguir adelante con la vida, por ser la mejor mama del mundo y por permitirme lograr esta meta por esta y por muchas cosas mas te digo GRACIAS MAMA.

A ti Marisol te agradezco que me apoyaras con tus palabras de aliento, diciéndome siempre que siga adelante para poder tener un mejor futuro te agradezco muchísimo gracias amor.

Agradezco a don Víctor mi padrastro por darme el apoyo moral para seguir adelante en este proyecto.

Agradezco a todos mis compañeros de trabajo que me apoyaron a realizar este trabajo.

|   |    |
|---|----|
| ➤ Dedicatorias  | I  |
| ➤ Agradecimientos                                     | II |
| ➤ Resumen   | 1  |
| ➤ Justificación                                       | 3  |
| ➤ Objetivo general                                    | 4  |
| ➤ Objetivos específicos                               | 4  |
| ➤ Historia de la enfermedad                           | 5  |
| ➤ Brucelosis en México                                | 9  |
| ➤ Brucelosis bovina en México                         | 11 |
| ➤ Etiología   | 14 |
| ➤ Resistencia, supervivencia                          | 15 |
| ➤ Brucelosis en el humano                             | 16 |
| ➤ Transmisión de la brucelosis bovina                 | 23 |
| ➤ Infección de un establecimiento                     | 25 |
| ➤ Latencia  | 26 |
| ➤ Discusión y permanencia de la enfermedad en un hato | 27 |
| ➤ Patogenia   | 28 |
| ➤ Diagnostico de la enfermedad                        | 29 |
| ➤ Prueba de rosa de bengala                           | 35 |
| ➤ Prueba de aglutinación estándar                     | 35 |
| ➤ Prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol         | 35 |
| ➤ Prueba de coombs indirecto                          | 36 |
| ➤ Prueba de inmunoenzayo enzimático( ELISA)           | 36 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| ➤ Prueba de anillo en leche           | 40 |
| ➤ Prueba molecular (PCR)              | 41 |
| ➤ Vacunas contra la brucelosis bovina | 44 |
| ➤ Cepa 19                             | 45 |
| ➤ Brúcella abortus cepa lisa 45/20    | 47 |
| ➤ Vacuna RB51                         | 48 |
| ➤ Eliminación del agente al medio     | 53 |
| ➤ Tratamiento y profilaxis            | 53 |
| ➤ Conclusiones                        | 54 |
| ➤ Recomendaciones                     | 56 |
| ➤ Referencias                         | 58 |

## 1. Resumen,

La brucelosis es una enfermedad infecciosa aguda de etiología bacteriana producida por microorganismos del género *Brúcella*. Existen siete especies de *Brúcella* que están asociadas a varios huéspedes principales, *B. abortus* al ganado bovino, *B. melitensis* al caprino, *B. ovis* a los ovinos, *B. suis* a los porcinos, *B. canis* a los caninos y *B. neotomae* a roedores salvajes, recientemente *Brúcella maris* asociada a mamíferos marinos. Esta se localiza principalmente en los órganos del tracto genital en el que producen abortos en las hembras y orquitis y epididimitis en los machos, procesos que todos ellos, pueden ser causa de esterilidad permanente, por lo que la repercusión socioeconómica de la brucelosis es grande en los países que no la han erradicado. En el hombre la enfermedad se conoce como fiebre ondulante, enfermedad grave que los incapacita físicamente y puede volverse crónica para producir una invalidez permanente. El hombre la contrae por contacto directo, durante el manejo de animales, o por ingestión de productos lácteos frescos contaminados.

A pesar de los esfuerzos que se están haciendo desde hace mucho tiempo para controlar y erradicar la brucelosis, esta infección sigue siendo una zoonosis importante en el mundo entero. Su persistencia se puede atribuir a la diversidad existente en el género *Brúcella*; a la gran variedad y a la distribución geográfica de los animales sensibles; y a la supervivencia y a los mecanismos de transporte de un hospedador a otro que presentan estas bacterias.

En la actualidad para la prevención y control de *Brúcella abortus* en bovinos se realizan vacunaciones controladas con la cepa 19 o la cepa RB51 y el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos en suero mediante pruebas

de aglutinación rápida Rosa de Bengala, fijación de Complemento, Elisa indirecta y Elisa competitiva, las cuales contribuirán a unificar criterios tendientes a lograr el control y finalmente la erradicación de la enfermedad. La comparación entre las diferentes técnicas de diagnóstico y entre las cepas 19 y RB51 utilizadas como vacunas ha sido realizada por varios investigadores con el fin de evaluar la utilidad de cada una de ellas en el diagnóstico y prevención de la brucelosis.

El presente trabajo tiene como objeto recopilar las últimas investigaciones realizadas sobre la patogenicidad, factores de virulencia y en general todos los mecanismos que utiliza *Brúcella abortus* para invadir a su huésped, además, de los avances realizados por distintos investigadores en otras posibles vacunas y en la eficiencia de las ya existentes y en los últimos métodos de diagnóstico utilizados con el fin de capacitar a los ganaderos, técnicos, médicos veterinarios y microbiólogos para reducir progresivamente la existencia de fuentes de infección y mejorar el proyecto de Prevención y Control de la Brucelosis bovina para disminuir de la misma forma la frecuencia de su presentación hasta alcanzar las condiciones adecuadas para su erradicación en los países que todavía se ven afectados por dicha enfermedad.

**Palabras clave:** brúcella ssp, enfermedad, zoonosis, vacunación, bacterias, patogenicidad, PCR .

## **Justificación**

Debido a que la brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica y que además representa grandes pérdidas económicas por los efectos que esta produce en el sector agropecuario en los países donde no ha sido erradicada, es fundamental conocer los últimos avances científicos sobre el tema, para contribuir a que las autoridades gubernamentales encargadas de la sanidad animal perfeccionen los proyectos de prevención y control de la brucelosis bovina y la utilización de un diagnóstico confiable para la determinación de la situación real, el establecimiento de hatos y áreas libres de la enfermedad y la disminución del riesgo de la enfermedad para el humano.

## **Objetivo General.**

A partir de la revisión Bibliográfica Evaluar las diferentes técnicas de diagnóstico y analizar las vacunas utilizadas contra la brucelosis bovina enfatizando sobre los estudios más recientes de *Brúcella abortus* con el fin de contribuir al perfeccionamiento de los programas de prevención y control en los países donde la enfermedad no ha sido erradicada.

## **Objetivos específicos.**

- a) realizar un recuento de la brúcella al paso del tiempo haciendo mención del descubridor de la bacteria así como las características propias.
- b) ofrecer información sobre las diferentes formas de contagio de la enfermedad en los animales como en el ser humano, también dar información sobre las diferentes formas de prevención y su eliminación.
- c) describir los signos y síntomas para que diferencien de otras enfermedades.
- d) dar a conocer las pérdidas económicas que llega a provocar la enfermedad.
- d) una vez obtenidas todas las bases y los conocimientos de dicha enfermedad, crear estrategias que logren el control y posteriormente a su erradicación y así evitar dichas pérdidas.

## Historia de la Enfermedad

Uno de los primeros registros que existen para llegar a conocer hoy en día la enfermedad conocida como brucelosis, fue una enfermedad que afectó la guerra de Crimea y los marineros a bordo de las naves. La Brucelosis entonces llamada fiebre de malta fue una enfermedad crónica debilitante con la complicación de reumatismo, por lo que muchos marineros fueron invalidados cada año (Wyatt, 1999). El capitán David Bruce fue enviado a Malta y condujo una investigación a partir de 1884. Él aisló un agente llamado *Micrococcus melitensis* de bazo humano de pacientes hospitalizados que habían consumido leche de cabra cruda. En 1905 se formó la Comisión Fiebre del Mediterráneo y varios miembros de esta comisión realizaron pruebas serológicas en cabras y encontraron aglutininas en el 50% de los animales. También se aisló la bacteria de la sangre y de la leche en por lo menos el 10% de las cabras. El profesor L.F. Benhard Bang, patólogo veterinario y bacteriólogo Danés, describió un organismo causante de abortos en ganado en 1895 llamado *Bacillus abortus*. Y en 1914 en Estados Unidos, fue aislada la especie *Brúcella* de un feto de cerdo abortado la cual fue llamada *B. suis*. La descripción de los aislamientos de ganado y cerdos condujo a un reconocimiento de la extensa distribución en otros países. El interés fue alto en bovinos en la primera parte del siglo XX, pues el aborto contagioso fue reconocido junto con la tuberculosis como causa seria de pérdidas económicas. La Oficina de Industria Animal (BAI) jugó un papel importante en la investigación sobre brucelosis en bovinos y porcinos y en el desarrollo de programas de erradicación. La investigación fue activa en pruebas diagnósticas

y vacunas. Varios comités y organizaciones consideraron el nombre de la enfermedad, asuntos de investigación, uniformidad de los métodos de prueba y control de metodologías. Antes de 1922, varios estados habían dictado leyes y regulaciones en tentativa de prevenir la introducción de la enfermedad en los bovinos comprados de otros estados. En 1930, el nombre de la enfermedad fue cambiado de aborto infeccioso de los bóvidos a la enfermedad de Bang. Las preocupaciones crecían sobre la relación entre la enfermedad en animales y los seres humanos. Un comité de la Asociación Médica Veterinaria de América recomendó una vacuna que fue desarrollada a partir de una cepa de baja virulencia llamada *B. abortus* cepa 19. Esta vacuna se ha utilizado por décadas como el principal agente inmunizante para el control de la brucelosis bovina. Se ha estudiado en una variedad de dosis y de métodos de administración. En 1934, un programa cooperativo de Erradicación de Brucelosis en Estados Unidos fue lanzado a nivel nacional como parte de un programa de emergencia para la reducción de la enfermedad en bovinos con previo análisis de sangre, el sacrificio de ganados seropositivos, e indemnizaciones federales. Sin embargo se presentaron muchos problemas incluyendo la estandarización de procedimientos para las pruebas. En 1941, la cepa 19 fue introducida y utilizada en más estados y todo el ganado vacunado era correctamente identificado. En 1952, la prueba de anillo en leche fue introducido en el programa, siendo el principal método de vigilancia en ganados lecheros con posible brucelosis. Sin embargo surgieron muchas dudas acerca del programa, dando como resultado una comisión especial, la cual recomendó muchos cambios en el programa. En 1953, Buddle y Boyes en Australia y Nueva Zelanda identificaron a *B. ovis* como causa de epididimitis en ovejas. Más

adelante, Carmichael aisló *B. canis* de fetos caninos abortados (Nicoletti, 2002). Desde ese entonces el género incluye seis especies, cada una de ellas muestra una preferencia por un huésped determinado aunque una especie puede infectar varias especies animales, así se tiene que: *B. abortus* infecta normalmente al ganado bovino, *B. melitensis* afecta cabras y ovejas, *B. suis* a cerdos, *B. canis* infecta perros, *B. ovis* causa infección específicamente a ovejas y *B. neotomae* a roedores. El hombre es susceptible a cualquiera de las cuatro primeras especies, ya que se considera que *B. ovis* y *B. neotomae* poseen una baja virulencia que las restringe solo a ciertos huéspedes. En años recientes, el espectro de huéspedes de *Brucella* se ha ampliado al incluir los mamíferos marinos. Se han realizado aislamientos de *Brucella* a partir de una gran variedad de focas, leones marinos, delfines y ballenas, en las costas de diferentes continentes. Estas cepas, claramente forman un grupo separado al que, de modo no oficial, han denominado *B. maris*. Dentro del grupo se distinguen dos tipos: el formado por cepas provenientes de cetáceos y el de las cepas aisladas provenientes de pinnípedos. Por lo que actualmente se conocen como *B. cetaceae* y *B. pinnipediae* (López & Contreras, 2004). Es importante recordar que la brucelosis es una verdadera zoonosis y el estímulo para su erradicación es primordial para la salud pública. Casi todos los casos de brucelosis en humanos, tienen origen animal y, por lo tanto, el control es sobre todo una responsabilidad veterinaria (Nicoletti, 2002). Las brucelas “sobreviven” en ambientes extracelulares e intracelulares. Las relaciones compatibles con los hospederos, incluyendo, períodos de incubación variables, portadores asintomáticos y resistencia a los tratamientos están entre algunos de los problemas más importantes, y además, factores como el comercio de animales,

nomadismo, hacinamiento y el aumento de la población asegura dificultades para el control de la enfermedad. La falta de inmunización de la población, ha conducido a importantes restricciones en el uso de las vacunas. En humanos, es muy difícil cambiar los hábitos alimenticios lo cuál asegura la presencia de muchos casos futuros de enfermedades producidas por los alimentos. Las investigaciones futuras estarán dirigidas al mejoramiento de métodos de diagnóstico, inmunización y tratamientos. Sin embargo, los factores extrínsecos e intrínsecos relacionados con la brucelosis humana y animal y su control seguirán siendo obstáculos en la continua evolución de la historia de la brucelosis (Nicoletti,2002).

## **BRUCELOSIS EN MÉXICO.**

En México se conoce la brucelosis desde 1906 y desde entonces son muchas las publicaciones que describen la presencia de la enfermedad en diferentes especies de animales y humanos.(Suarez,2003;Guemez,1994.)

De acuerdo a las investigaciones realizadas por los doctores Villela y Silva hace más de 50 años, fue el Dr. Carbajal en 1906 quien sospechó de la presencia de brucelosis en México al estudiar un caso de fiebre remitente de donde intentó el aislamiento del *M. melitensis*, refiriendo al Dr. Valenzuela quien un año antes había sospechado que sus enfermos de fiebres remitentes estuvieran enfermos de Fiebre de Malta. En 1912 el Dr. Resendiz, en Querétaro, relaciona la enfermedad con la importación de cabras murcianas en 1910.(Suarez,2003)

Otro valioso reporte fue realizado por el Dr. Recio en el año 1918 quien fue el primero en descubrir la brucelosis en el ganado bovino importado de los Estados Unidos. Se inician desde entonces los reportes de esta enfermedad en nuestro país de la cual no existían referencias durante la colonia española, aunque el aborto en vacas fue un signo conocido por los veterinarios de la época pero se atribuía a otras especies.

El Dr. Tomas Perrin fue el primero en intentar aislar el agente etiológico en México sin éxito, siendo el Dr. Manuel Vergara en 1921, quien aísla por primera vez al *M.melitensis*, exponiendo sus trabajos en el VI Congreso Médico Nacional, lo que fue confirmado en 1923 por Placeres, con estudios bacteriológicos y serológicos. Posteriores a estos informes se suscitaron gran cantidad de estudios encaminados a conocer la distribución de la enfermedad en el país, encontrándose que los estados más afectados eran del centro de la

república, mismos en donde la explotación del ganado caprino es importante. Es relevante el trabajo de una vida dedicada a la investigación del Dr. Maximiliano Ruiz Castañeda quien dedicó gran parte de su tarea científica al estudio de la Brucelosis en México, con contribuciones que le merecieron reconocimiento a nivel internacional. El Dr Castañeda publicó a nivel nacional e internacional artículos científicos, revisiones y libros en temas tan variados como Historia de la brucelosis, Estudios Epidemiológicos de patogenia, De relación Huésped- parásito, Métodos de aislamiento, Identificación e investigaciones sobre los antígenos de Brucella, su uso en diagnóstico y tratamiento, así como el uso de diferentes drogas en el tratamiento de pacientes Brucelosos.(Suarez,2003)

En nuestro país en el año de 1939 se creó un Comité Nacional con el objetivo de organizar la lucha contra la brucelosis, pero este nunca cumplió el reglamento elaborado. En el año de 1944 se designa una Comisión conjunta de los Ministerios de Salubridad y de Agricultura con el mismo destino.

Miranda en el año de 1953 e independientemente Stiner, propusieron planes para el control de la enfermedad en el país pero fracasaron en los intentos, entre otras causas por el reducido número de animales y el bajo nivel de diagnóstico existente. Durante varias décadas se realizaron esfuerzos para establecer programas oficiales para el control y la erradicación de la enfermedad, sin embargo los primeros programas oficiales se documentan en 1971, cuando el Diario Oficial de la Federación del 8 de agosto de ese año publicó el Reglamento que regiría sus actividades. Sin embargo después de varios años surgió la Comisión Nacional de Control de Tuberculosis y Brucelosis (CONATB), y se publicó la NORMA OFICIAL MEXICANA DE LA

CAMPAÑA DE ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS EN LOS ANIMALES (NOM.ZOO.041-1995), la cual continúa vigente hasta la fecha. En esta Norma se especifica que el control de la enfermedad lleva como fundamento el diagnóstico, el sacrificio o la segregación de los animales reactivos, así como la vacunación masiva. La Norma considera el uso de vacunas oficialmente reconocidas por la campaña para tal fin, incluyendo a las vacunas Cepa 19 y la RB51. Pero también pone énfasis a la aplicación de medidas sanitarias, un estricto control de la movilización y la ejecución de cuarentenas. (Suarez, 2003)

### **BRUCELOSIS BOVINA EN MÉXICO. (*B. abortus*)**

La brucelosis es todavía una de las enfermedades bacterianas más importantes en México. El alcance de la brucelosis se considera en pérdidas de producción obvias resultantes de la enfermedad clínica en ganado, restricciones aplicadas a los animales infectados, a sus productos agrícolas locales y mercados globales. Recientemente se ha puesto en ejecución una campaña nacional para la erradicación de brucelosis conducida por la Secretaría de Agricultura. Aunque se han logrado buenos progresos en muchas áreas, la brucelosis todavía está presente en ganado (lechero y de carne), cabras, ovejas y probablemente en cerdos. Como servicio médico público, cada año la Secretaría de Salud divulga los nuevos casos de brucelosis humana; éstos han hecho un promedio de más de 2000 casos en años pasados. La mayoría de los casos se registran en la gente sin actividades rurales relacionadas, y casi 20 muertes por año se relacionan directamente con la enfermedad. Es fácil entonces entender por qué la brucelosis es una de las más importantes zoonosis con un gran impacto en las poblaciones en riesgo.

La Comisión Nacional para la Erradicación de Tuberculosis Bovina y Brucelosis en México (CONETB) ha establecido pérdidas de \$2000 millones de pesos (casi US\$ 200 millones) por año (Luna & Mejía, 2002).

En México, cinco de las siete especies conocidas de *Brucella* han sido aisladas. Estas incluyen *B. melitensis* biovars 1-3; *B. abortus* biovars 1,2, 4-6; *B. suis* biovar 1; *B. canis* y *B. ovis*. Algunos de los aislamientos se han realizado en especies animales diferentes al blanco. Así, parece que el contacto animal a animal ayuda a la diseminación de la enfermedad.

La brucelosis animal está ampliamente diseminada en diferentes regiones del país. De hecho, el programa de erradicación nacional ha detectado rebaños positivos con diferentes niveles de prevalencia en casi todos los estados.

La brucelosis en ganado es causada casi exclusivamente por *B. abortus* y en algunas áreas donde coexisten los bovinos y pequeños rumiantes (principalmente cabras) se facilita la infección con *B. melitensis*.

Esta enfermedad se encuentra principalmente en rebaños lecheros donde los abortos y desordenes reproductivos están muy bien registrados. El riesgo de infección con la enfermedad está relacionado con la introducción de animales enfermos a rebaños libres de brucelosis. Además, han encontrado que el principal factor que contribuye al mantenimiento de la enfermedad en rebaños infectados incluye pobres prácticas en la asistencia y manejos de placentas y otras descargas relacionadas.

Otro factor importante en la zoonosis de esta enfermedad, son los hábitos alimenticios de la población. México produce entre 9000 y 1000 millones de litros de leche de vaca al año, de este volumen el 35% es consumido como

quesos o leche sin pasteurizar. Así, el riesgo de contraer enfermedades por alimentos, incluyendo la brucelosis, es demasiado alto(Luna & Mejía, 2002).

En cuanto al diagnóstico de brucelosis se realizan principalmente pruebas serológicas. El asilamiento no es una práctica común y se realiza sólo en algunas investigaciones epidemiológicas y en productos lácteos. Las pruebas serológicas oficiales usadas en ganado incluyen: prueba Rosa de Bengala, con una concentración de antígeno del 8% como una prueba tamiz; la prueba de Rivanol y Fijación del Complemento como pruebas complementarias y confirmativas. Recientemente se aprobó el uso de el Análisis de Polarización Fluorescente (FPA) como una sola prueba (tamiz y confirmatoria) para muestras de sueros bovinos. Simultáneamente, en algunos estados mexicanos, en casi todas las áreas asociadas con ganado lechero, la vigilancia está basada en el programa de la prueba de anillo en leche realizada por las industrias lecheras.

Para el control de la brucelosis bovina, en 1978 empezó el uso de dosis reducidas para la vacunación de bovinos adultos y produjo buenos logros en el control y erradicación de brucelosis en algunas áreas lecheras. Sin embargo, hubo una cierta resistencia en el uso generalizado de la vacuna, siendo el principal obstáculo del uso de la Cepa 19 la persistencia de títulos serológicos vacunales y el riesgo de abortos e infecciones permanentes en animales preñados o sexualmente maduros. Ya para 1997, fue oficialmente aprobado el uso de la vacuna RB51 y México es uno de los pocos países que está autorizado para producir esta vacuna. Actualmente, casi 1 millón de bovinos con fines cárnicos y lecheros son vacunados cada año; casi el 97% del ganado lechero está vacunado (Luna & Mejía, 2002)

## ETIOLOGIA

El género *Brúcella* está formado por bacilos gram negativos pequeños, inmóviles y aerobios, de crecimiento lento. Genéticamente, el género *Brúcella* parece mono específico. El agente causal de la brucelosis es la bacteria *Brucella* spp. Se trata de un cocobacilo, aeróbico, Gram negativo. Infecta en forma primaria a los animales.

Se conocen 7 especies: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* y *Brucella maris*. Los reservorios naturales principales para las distintas especies son: vacunos (*B. abortus*), caprinos (*B. melitensis*), porcinos (*B. suis*), ovinos (*B. ovis*), caninos (*B. canis*), roedores (*B. neotomae*) y, además, la recientemente hallada en mamíferos marinos (*B. maris*).

De las especies de *Brucella* caracterizadas hasta el presente, cinco son patógenas para el hombre. *Brucella melitensis* es la más virulenta, en tanto que *B. abortus* y *B. canis* producen infecciones leves. *B. suis* exhibe una virulencia intermedia. Recientemente se han identificado dos casos de infección humana por *B. maris*.

## **RESISTENCIA Y SUPERVIVENCIA.**

Las especies del género *Brúcella* a diferencia de otras bacterias patógenas posee una gran capacidad para sobrevivir y persistir en el ambiente bajo condiciones apropiadas, comparable a la resistencia de bacterias esporuladas. Bajo condiciones de baja temperatura, humedad moderada, Ph cercano a la neutralidad y protección contra el sol, las brúcelas pueden sobrevivir por largos períodos aunque no existe evidencia de que los organismos se repliquen significativamente bajo estas condiciones en el suelo, agua o estiércol. En los restos de animales congelados, las bacterias sobreviven por muchos años. En materiales desecados que contengan materia orgánica y protegidos de la luz solar, pueden retener su infectividad por muchos años (López & Contreras, 2004).

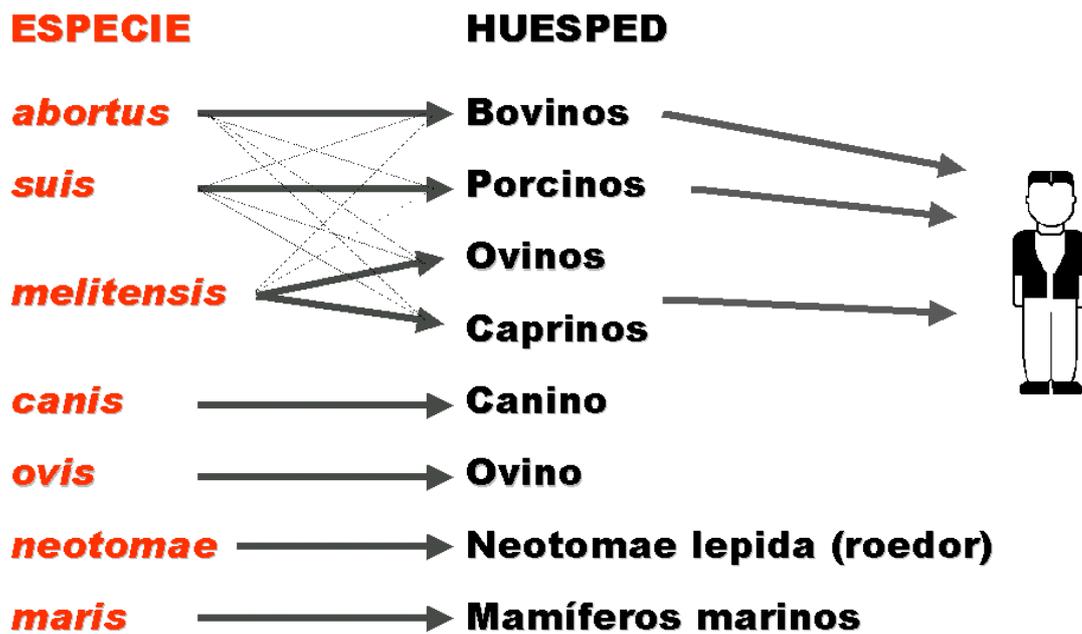
En contraste, son bastante sensibles al calor, así una suspensión diluida de brucelas, se destruye rápidamente al ser sometida a la pasteurización o al exponerla a temperaturas de 60°C por 30 minutos. Sin embargo, una suspensión densa es más difícil de inactivar y se debe prolongar el tiempo de exposición al calor o someterla a temperaturas mas elevadas. *Brucella* es muy sensible a la radiación ionizante y se muere con rapidez al exponerla a la luz ultravioleta (5 minutos). También son sensibles, a la mayoría de los desinfectantes de uso común, a las concentraciones recomendadas con excepción de las sales cuaternarias de amonio. Como sucede en otras bacterias, la susceptibilidad se reduce en presencia de materia orgánica o a bajas temperaturas. El etanol, isopropanol, iodóforos, hipoclorito diluido y el fenol al 1% son eficaces para desinfectar la piel expuesta a *Brúcella*.

En general, *Brúcella* es susceptible a la mayoría de los antibióticos, como lo muestran los trabajos publicados en los que se realizaron ensayos *in vitro* empleando diferentes métodos. Las sulfonamidas, los aminoglicósidos como la estreptomina, gentamicina, kanamicina, amikacina, tobramicina; las tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, novobiocina, rifampicina y quinolonas como norfloxacin, ciprofloxacina, esparfloxacina y moxifloxacina, todos ellos son activos contra *Brucella in vitro* a concentraciones mínimas inhibitorias bajas. Los antibióticos beta lactámicos son los menos efectivos. Las cepas muestran alguna variación en la susceptibilidad a los antibióticos en función de su origen geográfico (López & Contreras, 2004).

### **BRUCELOSIS EN EL HUMANO (ZONOSIS)**

Al ser la brucelosis una zoonosis, la fuente de infección la constituyen los animales infectados que, en su mayoría son aquellas especies productoras de alimento. *B. abortus* está más extendida en el mundo, sin embargo, se aísla poco de casos humanos. La infección en el hombre es a menudo subclínica, y cuando presenta alguna sintomatología es, en general, menos severa que la causada por *B. melitensis* o *B. suis*. Las vacas y sus productos son la fuente de infección más común, aunque los perros también pueden jugar un papel importante en la epizootología de la enfermedad en nuestro medio rural. *B. melitensis* es la que más se notifica como causa de enfermedad, se aísla con mayor frecuencia de los casos humanos, casi en un 90%. Es la especie más virulenta y está asociada a una enfermedad aguda severa. La bacteria infecta principalmente a cabras y ovejas, pero otras especies no quedan exentas.

Los huéspedes animales, excretan gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y otros productos del aborto; en menor cantidad por excreciones genitales, semen, orina que contaminan los sitios donde habitualmente se encuentran, en donde pernoctan o abrevan. En consecuencia, todas las especies mencionadas contribuyen en diferente medida a la contaminación del suelo, los traspatios, corrales, la paja de las camas, el agua de arroyos, canales pozos o bebederos. También *Brucella* se excreta en la leche y el calostro. En repercusión, el hombre puede adquirir la bacteria por: exposición ocupacional, contacto con medios ambientes contaminados, consumo de agua y alimentos contaminados, y menos frecuente por transmisión de persona a persona. El predominio de un mecanismo de infección u otro dependerá de las condiciones socioeconómicas y de los hábitos del individuo así como de las características del medio social que se considere. En los países que tienen un mejor nivel sanitario, la enfermedad es de carácter casi exclusivamente profesional, mientras que en los menos desarrollados, una parte importante de los casos corresponde a la población general, que adquiere la infección a través de la ingesta de productos lácteos no controlados, principalmente leche y queso fresco (Dornand, et al., 2002; López & Contreras, 2004; Richey & Harrel, 1997).



Las personas se infectan al inhalar polvo o pelo contaminado, por salpicaduras en la conjuntiva, por ingestión accidental, a través de abrasiones o cortaduras de piel o por auto inoculación accidental de sangre del animal infectado o de vacunas vivas.

Es difícil determinar hasta que grado el paso de los animales por ciertos caminos o rutas pobladas puede producir contaminación de calles, patios mercados, etc. *Brucella spp* puede sobrevivir por períodos prolongados en el polvo, estiércol, agua, fetos, suelo, vísceras y productos lácteos (Dornand et al., 2002) .

En otro contexto, al ser las brucelas eliminadas en forma intermitente con la leche, el alimento, se vuelve una fuente de infección para la población que la consume sin ningún tratamiento térmico preliminar. Tanto la población rural como la urbana se verán afectadas, la urbana con mayor capacidad de compra tendrá un riesgo al adquirir productos lácteos sin control sanitario. La manufactura de quesos concentra en buena medida a las bacterias que pueden

sobrevivir en esas condiciones algunos meses. Lo mismo sucede en el caso de la mantequilla, crema o helados preparados con leche contaminada. El consumo de carne cruda o mal cocida, proveniente de animales infectados, representa un riesgo menor, ya que el músculo contiene baja cantidad de brucelas. En cambio las vísceras, la ubre y los testículos contienen cantidades importantes de bacterias. La sangre fresca es potencialmente peligrosa para aquellos individuos que acostumbran consumirla natural o mezclada. La transmisión de persona a persona es muy rara, en los casos reportados solo existe evidencia circunstancial que sugiere que la transmisión se produjo por vía sexual. De mayor importancia es la infección como resultado de una transfusión de sangre o de un transplante de tejido, la médula ósea es la de mayor riesgo. Otra forma de transmisión es de la madre con brucelosis aguda al hijo a través de la leche materna o de la placenta produciendo aborto o brucelosis en el recién nacido. El periodo de incubación suele ser variable, en general, de 2 a 3 semanas, aunque puede prolongarse hasta algunos meses. De algún modo, éste depende de: la virulencia de la cepa de *Brucella*, la dosis y del estado nutricional e inmune del individuo (López & Contreras, 2004).

La brucelosis humana ha sido clasificada en forma arbitraria en varias categorías: subclínica, subaguda, bacterémica, aguda, recurrente, crónica, etc. Dichos términos reflejan el espectro de las manifestaciones clínicas pero complican el diagnóstico. La mayoría de los autores coinciden en considerar solo las fases aguda y crónica. Por otro lado, la brucelosis típica en la etapa aguda, no siempre se identifica con facilidad, ya que los signos y síntomas podrían ser la expresión de otras enfermedades febriles comunes en nuestro

medio. En consecuencia, se tienen que descartar enfermedades como: salmonelosis, tifoidea, dengue, paludismo, tuberculosis, leptospirosis y otras que sean prevalentes en las zonas donde se presenten los casos.

Las manifestaciones clínicas de la brucelosis son diversas y el curso de la enfermedad es variable. Pacientes con brucelosis pueden presentar una enfermedad febril aguda, sistémica; una infección crónica; o un proceso inflamatorio localizado (Rodríguez, et al., 2002).

Los pacientes se quejan de síntomas no específicos tales como fiebre, sudoración, fatiga, anorexia, y dolores musculares y articulares. Los síntomas neuropsiquiátricos, depresión, dolor de cabeza e irritabilidad, ocurren con frecuencia. Además, infecciones focales de huesos, articulaciones, o de la zona genitourinaria pueden dolor local. Tos, dolor de pecho, y dispepsia también pueden ser observados.

Los pacientes con infecciones crónicas pierden con frecuencia de peso. Los síntomas duran a menudo por 3 a 6 meses y de vez en cuando por un año o más. Los exámenes físicos son generalmente normales, aunque puede ocurrir hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía. La brucelosis no causa generalmente leucocitosis, y algunos pacientes pueden presentarse moderadamente neutropénicos. Aunque las manifestaciones de la enfermedad no se pueden relacionar terminantemente con la especie que causa la infección, *B. melitensis* tiende a causar una enfermedad más severa y más sistémica que las otras brucelas; *B. suis* causa principalmente una enfermedad supurativa localizada.

La infección con *B. melitensis* produce enfermedad ósea y articular en aproximadamente el 30% de pacientes; la sacroileitis se convierte en el 6% al 15%, particularmente en adultos jóvenes. La sacroileitis e infecciones comunes periféricas y la destrucción del hueso es inusual (Rodríguez, et al., 2002). La espondilitis, otra manifestación osteoarticular importante de la brucelosis, tiende a afectar a pacientes de mediana edad o mayores, causando dolor (generalmente lumbar) y de vez en cuando síntoma radicular.

Las infecciones del pulmón también se han descrito, particularmente antes del advenimiento de antibióticos eficaces. Aunque hasta un cuarto de pacientes puede quejarse de síntomas respiratorios, sobre todo de tos, disnea, dolor pleurítico, exámenes de rayos X del pecho son generalmente normales, aunque se pueden observar infiltraciones locales o difusas, efusión pleural, abscesos y granulomas. La hepatitis y, raramente, abscesos en el hígado pueden ocurrir. Elevaciones leves en suero de lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina son comunes. La biopsia puede demostrar granulomas bien formados o hepatitis no específica con colecciones de células mononucleares.

Otros sitios de infección incluyen el corazón, el sistema nervioso central y la piel. La endocarditis es rara, pero la complicación más temida, y es la causa del 80% de las muertes por brucelosis. La infección del sistema nervioso central se manifiesta generalmente como meningoencefalitis crónica, pero también se pueden presentar la hemorragia subaracnoide y mielitis (Rodríguez, et al., 2002; López & Contreras, 2004). Para un tratamiento efectivo, ya que *Brucella* es una bacteria intracelular facultativa, se recomienda seleccionar aquellos antibióticos, que tengan la propiedad de penetrar dentro de las células blanco y que la dosis y duración del tratamiento sean las más adecuadas. De acuerdo a

la Organización Mundial de la Salud se debe establecer un tratamiento con doxicilina 200 mg/día más rifampicina 600/900 mg/día por un periodo de seis semanas para lograr la eliminación de *Brucella* (López & Contreras, 2004).

El diagnóstico de la brucelosis en el humano debe considerar aspectos clínicos, y contar con una historia clínica detallada que incluya alguna información de tipo epidemiológico. Es muy recomendable practicar un estudio bacteriológico, complementado con la búsqueda de anticuerpos en el suero.

El cultivo de la bacteria es la única evidencia contundente de que se trata de una infección por *Brucella*. Aunque se puede aislar de varias fuentes, la sangre es el material que se emplea con mayor frecuencia para realizar el cultivo bacteriológico.

Existen algunas recomendaciones que deben tomarse en cuenta para lograr el cultivo con éxito, en primer lugar el paciente no debe encontrarse bajo terapia antibiótica al momento de tomar la muestra y de preferencia se debe practicar durante la fase aguda de la enfermedad, por la tarde, antes de que se alcance el pico febril. Una vez que se tenga el crecimiento de colonias sospechosas, se recomienda realizar una identificación presuntiva (López & Contreras, 2004; Rodríguez, et al., 2002).

En la actualidad existen otros sistemas de aislamiento y se cuenta también con métodos moleculares como el de PCR, que es otra forma para poner de manifiesto a *Brucella* spp en sangre, líquido cefalorraquídeo y otras muestras. La ventaja que presenta es su rapidez, sensibilidad y especificidad, además que permite identificar el DNA libre y procedente de bacterias muertas o dañadas por el sistema inmune o los antibióticos, que son incapaces de crecer.

También se realizan pruebas serológicas comunes como Rosa de Bengala, Fijación de Complemento y ELISA entre otras (López & Contreras, 2004).

### **TRANSMISIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA. (B.abortus)**

La forma principal de contagio es la vía digestiva, esta se produce cuando los animales lamen fetos abortados, terneros recién nacidos y/o los genitales de otros animales, y si estos están brucelosos se produce una ingestión masiva de bacterias.

También es importante la ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminados con secreciones vaginales y leche de hembras enfermas. Algunos autores consideran que el contagio por vía cutánea tiene por lo menos, la misma importancia, por ejemplo: se pueden producir infecciones mediante las camas infectadas, cuando haya lesiones en las tetillas o en los extremos de los miembros o en el espacio interdigital que faciliten la penetración del agente patógeno en capas profundas de la piel, al ordeñar, quizás puedan introducir *Brucella* en la piel de los pezones las manos humedecidas con leche infectada (Rodríguez et al., 2005). La vía genital puede ser importante solo si se realiza inseminación artificial con semen infectado, de lo contrario, la brucelosis bovina no es una enfermedad venérea. El semen de un toro infectado puede contener grandes cantidades pero sin embargo no contagia a la vaca. La razón es que la acidez de la vagina contribuye a destruir a las brúcelas.

La transmisión es menos frecuente por vía respiratoria, mediante la inhalación de polvo y partículas que transportan brúcelas, puede tener importancia durante el verano cuando se reúnen los animales en corrales y mangas para

realizar vacunaciones, desparasitaciones, etc. Esta enfermedad tiene un periodo de incubación variable pues la bacteria luego de ingresar al organismo se multiplica en ganglios y órganos del sistema retículo-endotelial y el tiempo del mismo varia de acuerdo al estado fisiológico del animal. El período de incubación siempre es más corto en el animal preñado. Las vacas inmaduras sexualmente son altamente resistentes a *B.abortus* y la susceptibilidad aumenta con el desarrollo sexual y con la gestación (Rodríguez, et al., 2002; Rodríguez, et al., 2005). El signo principal de la enfermedad es el aborto al final del tercio mes de la preñez. (5-7 meses). No es frecuente la presencia de mortinatos debido a esta enfermedad. La principal fuente de contagio son las secreciones vaginales que se producen desde aproximadamente 15 días antes del aborto o parto hasta 4 semanas siguientes al mismo. Algunos experimentos demostraron que se pueden eliminar hasta  $1 \times 10^{14}$  brúcelas por gramo de placenta. Lo que nos está indicando la gravedad del fenómeno que representa el aborto y más aún el parto de un animal bruceloso que confunde por que se puede pensar que está sano, sin embargo elimina tantas brúcelas como aquel que pare. Pueden infectarse en útero o cuando los terneros nacidos de madres sanas son alimentados con leche o calostro de hembras enfermas (Rodríguez, et al., 2005; Richey & Harrel, 1997 ).

De acuerdo a resultados obtenidos en experimentos de laboratorio controlados y cálculos estimativos de campo, alrededor del tercio de las hembras bovinas enfermas de brucelosis no abortan nunca, pero son igual o más peligrosas en cuanto al contagio para otros animales, especialmente cuando se produce el parto. El 80% de las vacas que abortan sólo lo hacen una vez. La retención de

placenta acompaña frecuentemente a los abortos y/o partos de animales brucelosos.

### **INFECCIÓN DE UN ESTABLECIMIENTO.**

La primera causa de infección de un establecimiento ocurre fundamentalmente por introducir animales infectados procedentes de compras de ferias u otros establecimientos. Puede ocurrir también que animales de un establecimiento concurren a alguna exposición o se trasladen a otros campos para engorde y vuelvan infectados. De este modo es altamente recomendable conocer el procedimiento de los animales y el estado sanitario del rodeo del que provienen. Por supuesto se debe hacer una sangría en el lugar de compra y descartar los animales en caso de encontrarse positivo. Es muy importante al detectar animales positivos en los animales de compra NO adquirir ningún integrante del lote, pues es frecuente el rechazo de los positivos y la compra de los restantes. Esto es debido a que, existe la alta probabilidad de que haya animales en fase de incubación que no fueron detectados todavía.

Además, se debe realizar una cuarentena en el establecimiento comprador antes de juntar los animales. De manera alternativa también contribuyen los perros, zorros u otros animales carnívoros que llevan los restos de fetos, placentas u otros materiales infectados (Samartino, 2003; Rodríguez, 2005; Rodríguez, 2002). A la infección de los establos puede contribuir también la leche, pues, aproximadamente la mitad de las vacas infectadas, después de abortar o parir, eliminan *Brucella* con la leche durante semanas, meses y años; sobre todo en aquellas salas de ordeño donde la higiene es muy deficiente y que al ordeñar, se dejen caer al piso los primeros chorros de leche (despunte) (Rodríguez et al., 2005)

## **LATENCIA.**

Se llama latencia en brucelosis, a una situación que se presenta con las hembras bovinas nacidas de madres vacunadas. La infección ocurre en forma intrauterina, y no puede detectarse de ninguna manera en terneros. El animal aborta entre el 5 y 7 mes de gestación. Para saber si está en un estado de latencia, se deben tener hatos negativos donde se ha erradicado la enfermedad o bien se han incorporado novillas o terneras hijas de madres infectadas a este tipo de hatos. Se debe aclarar que si este animal, se vacuna con Cepa 19, por su puesto se puede detectar serológicamente los anticuerpos correspondientes, pero esta vacuna no modifica el curso de la latencia. Para prevenir este fenómeno, lo ideal es no trabajar con hijas de madres infectadas de brucelosis, pero si no se puede se debe al menos identificar claramente estos animales y sangrarlos al llegar al 5 mes de gestación para poder prevenir el aborto. Sin embargo, el porcentaje de animales que manifiestan latencia es muy bajo y solo apreciables en hatos con ninguna y muy baja prevalencia (Samartino, 2003).

## **DIFUSIÓN Y PERMANENCIA DE LA ENFERMEDAD EN UN HATO.**

La Brucelosis al introducirse en un hato se disemina rápidamente, pudiendo alcanzar proporciones de epizootias. Si nuevos animales no son introducidos, pierde su severidad inicial pasando a una forma enzoótica, en la cual sino son aplicadas medidas severas permanece por varios años.

La Brucelosis tiene como característica epizootiológica que al introducirse en un rebaño nuevos animales se rompe el equilibrio y pueden aparecer no solamente animales seropositivos, sino también con clínica de la enfermedad (Fernández, 1982; Rodríguez, 2005). Después de uno o dos años hay una fase de estabilización de la enfermedad en la que disminuyen los abortos y en la que son las novillas no expuestas anteriormente a la infección las que se infectan y pueden abortar. Hay una última fase de declinación de la brucelosis en donde se reduce la infección sobre todo cuando el rebaño es pequeño y cerrado, las vacas pueden volver a sus funciones reproductivas normales y se estabiliza la producción de leche. Aquí pueden ocurrir nuevamente brotes de la enfermedad por generación de novillas o ingreso de animales nuevos que permiten la presencia permanente de susceptibles especialmente en fincas grandes (Moreno, Rentería & Searcy, 2002).

## **PATOGENIA.**

Las bacterias tienen afinidad por los órganos reproductivos de machos y hembras estando asociadas con la gestación y con la producción de eritritol en el útero (Rodríguez, et al., 2005; Gorvel & Moreno, 2002). Hay una reacción piogranulomatosa en la placenta afectada y el aborto ocurre en la segunda mitad de la gestación. En animales preñados, *Brucella* se replica preferencialmente en trofoblastos placentarios durante la mitad y la última etapa de gestación. Los trofoblastos infectados producen cortisol, una hormona esteroidea que normalmente no es generada por la placenta (Enright & Samartino, 1994). Niveles incrementados de prostaglandina F<sub>2α</sub> y disminución en la producción de progesterona, junto con aumento en la síntesis de estrógenos y cortisol en los trofoblastos infectados por *B. abortus* en la mitad y últimas etapas de gestación, son idénticos a los cambios hormonales que ocurren en ganados normales en la iniciación del parto. La *Brucella* intracelular probablemente induce la síntesis de esteroides y modifica el metabolismo de precursores de prostaglandina, como el ácido araquidónico ya que estas hormonas podrían ser usadas como factores de crecimiento de la bacteria.

Los signos clínicos clásicos son: aborto después del quinto mes de gestación, retención de placenta, metritis, infertilidad, orquitis y epididimitis. Se sabe que un porcentaje de las vacas y vaquillonas que se infectan durante la primera gestación abortan; si la infección es reciente pueden abortar hasta el 40%, mientras que si los animales conviven con la infección durante 2 años este síntoma es menos evidente.

Las bacterias se localizan también en otros órganos como mama, linfonódulos supramamarios siendo excretadas con la leche. Según experiencias realizadas

por distintos autores una vaca infectada produce un 20% menos de leche en relación con su potencial de producción (Gorvel & Moreno, 2002).

### **DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD.**

Los antígenos de mayor utilidad en el diagnóstico de la brucelosis son: el lipopolisacárido liso (S-LPS) que se encuentra en la membrana externa y las proteínas del citosol, que son internas. La respuesta inmune al ser determinado por una técnica de laboratorio para *Brucella*, está influenciada por muchos factores los cuales incluyen el prolongado y variable período de incubación durante el cual la prueba serológica resulta negativa (Mariño-Jannaut, -2000), el estado vacunal del animal, la naturaleza de la descarga, las variaciones en la respuesta serológica individual tanto a la vacuna como a la descarga y la etapa de gestación al momento de la exposición a la enfermedad. Además, las pruebas serológicas comprenden dos variables biológicas de importancia, el antígeno y el anticuerpo, en donde una se mantiene fija para poder evaluar la variación de la otra. En muchas de estas pruebas se presenta una gran dificultad en la interpretación y evaluación de la eficiencia, debido a que puede ocurrir reacciones falsas positivas y falsas negativas ya que su presentación varía de acuerdo con el valor diagnóstico mínimo establecido para una prueba en particular (Mariño-Jannaut, 2000). Como requisito previo a la utilización de una nueva técnica en un programa de diagnóstico, se requiere que la sensibilidad y especificidad sea comparada con pruebas de referencia (Mariño et al., 1998). La especificidad de una técnica se define como la probabilidad de dar un resultado negativo cuando ésta es aplicada a un animal no infectado. Un alto nivel de especificidad garantiza que la técnica no clasifica incorrectamente

animales no infectados, como positivos. La sensibilidad, es la probabilidad de dar un resultado positivo cuando la técnica se aplica en un animal infectado. Una prueba con alta sensibilidad previene que un número excesivo de animales infectados escapen a la determinación. La sensibilidad y especificidad de una técnica puede variar a medida que cambian las características de la población de animales, como es el caso de la vacunación contra brucelosis, razón por la cual se requiere conocer estos dos factores tanto en una población vacunada como en una libre.

La simplicidad, aceptabilidad y seguridad son cualidades definidas como importantes en la eficiencia de las pruebas biológicas. Sin embargo, los conceptos de eficiencia diagnóstica, pueden ser confusos si se sugiere que la sensibilidad y la especificidad son características constantes de una prueba, estos dos parámetros, pueden variar dentro de la población y más aún cambiarán con la prevalencia a medida que avanza el control o la eliminación de la enfermedad. En general, es común emplear una prueba rápida, económica y de alta sensibilidad como prueba tamiz o de detección y utilizar una o más pruebas adicionales como confirmatorias de los animales positivos.

En este caso es necesario conocer la sensibilidad y especificidad de las técnicas confirmatorias (Mariño-Jannaut, 2000). El diagnóstico de la brucelosis mediante la identificación de los anticuerpos producidos como respuesta a la infección o a la vacunación, puede ser realizado en suero sanguíneo, plasma seminal y leche, pero para poder realizar un diagnóstico correcto las muestras deben ser tomadas y conservadas adecuadamente hasta el momento del análisis (FAO/OMS, 1986). De acuerdo con lo anterior, es aconsejable tomar muestras de sangre a la edad de 18 a 22 meses, ya que para esta época los

animales que han sido vacunados entre los 4-9 meses no deben presentar títulos a la vacuna cepa 19.

Inmediatamente después de la vacunación con cepa 19 los anticuerpos aparecen en la mayoría de los animales, pero la presencia o ausencia de un título de anticuerpo, no asegura que el animal este protegido, ya que la verdadera protección es más de tipo celular que humoral. Lo más importante es confirmar la negatividad de un animal que vaya a entrar al servicio o bien determinar en caso de título serológico, si éste es postvacunal, condición que se constata con el certificado de vacunación o con el resultado negativo a la prueba diferencial.

Con relación al parto, debe tomarse una muestra de suero teniendo en cuenta que puede ser negativa o presentar un título bajo ocasionado por la transmisión pasiva de IgG al calostro y se requiere comparar el nivel de anticuerpos con una muestra posterior, 15 a 20 días después, facilitándose así la evaluación de la situación del animal. La muestra debe tomarse lo más asépticamente posible, ya que la contaminación interfiere con el diagnóstico por degradación de los anticuerpos (Mariño-Jannaut, 2000).

Se aconseja tomar la sangre en tubos al vacío, bien sea de la yugular o arteria caudal. Este procedimiento es costoso, pero asegura la esterilidad de la muestra y con un poco de práctica es el método que menos molestias le produce al animal, además que la conservación de la muestra es menos crítica. Una vez tomada la muestra se deja a temperatura ambiente o se lleva por 30 minutos a la estufa a 37°C hasta que se forme el coágulo y posteriormente se mantiene por 1 o 2 horas a 4°C para lograr su retracción. El proceso de extracción del suero se realiza asépticamente luego de centrifugación a

1500r.p.m. los sueros una vez obtenidos deben conservarse congelados a -20°C hasta el momento de realizar las pruebas. Si es necesario transportar las muestras con coágulo, es indispensable tener en cuenta que la agitación de las mismas produce hemólisis. Otro factor de hemólisis es la exposición de la muestra al sol cuando se está tomando, o al envasarlas en recipientes húmedos o contaminados con detergentes u otras sustancias hemolíticas. Igualmente, las muestras de leche deben tomarse de la forma más aséptica posible, los primeros chorros deben descartarse y esta debe recibirse en frascos o tubos estériles. Puede emplearse un recipiente para cada cuarto o hacer una mezcla de los cuartos. Las muestras de semen se toman mediante masaje, electroeyaculador o vagina artificial pudiendo emplearse un preservativo para evitar la contaminación. Todas estas muestras, al igual que el suero sanguíneo deben conservarse en refrigeración hasta su recibo en el laboratorio. El plasma seminal debe conservarse congelado (Mariño-Jannaut, 2000). El diagnóstico inequívoco de la brucelosis es el directo, por cultivo a partir de leche o tejidos del animal e identificación de la bacteria. Las brucelas son bacilos cortos Gram negativos de 0.5 X 0.5 hasta 1.5 mm de largo. Al emplear la tinción de Zielh- Neelsen modificada, las brucelas se tiñen de color rojo y se observa la misma morfología.

El asilamiento de *B. abortus* puede llevarse acabo en medios selectivos y enriquecidos, aunque *B. abortus* crece bien en Agar sangre, los contaminantes presentes en el medio pueden crecer más rápidamente y enmascarar la presencia de aquella. El medio de elección utilizado es Agar-Triptosa Suero (TSA) con adición de antibióticos. La bacteria es de lento crecimiento y normalmente las colonias características se ven después de 3-5 días de

incubación en microaerofilia (10% de CO<sub>2</sub>) (Lopez & Contreras, 2004; Rodríguez, et al., 2002).

En medio TSA, las cepas lisas (S) producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidas y coloración ámbar. A la luz reflejada son brillantes, ligeramente opalescentes y de color gris azulado. En gelosa sangre no produce hemólisis, en agar Mac Conkey crecen poco y no fermentan la lactosa. Las cepas rugosas (R), en TSA, producen colonias semejantes en la forma pero varían considerablemente en tamaño, color, consistencia y textura. En las cajas de TSA, se aconseja determinar la producción de catalasa y oxidasa, para las cuales las brucelas son positivas. Enseguida, se procede a aglutinar a las colonias sospechosas con suero polivalente anti *Brucella*. Se recomienda realizar la suspensión de brucelas en solución salina fenolada al 1.0% extremando las precauciones. Si hay aglutinación, muy probablemente se trate de bacterias del género *Brucella* (Rodríguez, et al., 2002).

También se realizan pruebas bioquímicas especiales para identificar la especie y el biovar. Inmediatamente después del primer aislamiento, la cepa en estudio se siembra por triplicado en tubos con agar soya tripticasa y extracto de levaduras inclinados. Se incuban dos tubos en atmósfera de CO<sub>2</sub> y el otro en atmósfera normal, a 36° C por 48 horas antes de que se desarrollen mutantes independientes de CO<sub>2</sub>. Con el crecimiento de uno de los tubos, se prepara una suspensión de bacterias para inocular el resto de medios de cultivo. En el medio TSI se observa ausencia de ácido y gas, en el medio Citrato de Simmons esta bacteria no emplea el substrato como fuente de carbono, por lo que no se modifica el color verde. En cuanto al medio de SIM, en este se puede observar la inmovilidad de las brucelas y la ausencia de indol y H<sub>2</sub>S. En

el medio de urea de Christensen se debe medir el tiempo en que vira el medio a rojo, debido a la producción de ureasa. *Brucella suis* produce la mayor cantidad de ureasa y en un tiempo muy corto comparada con las demás especies que producen menor cantidad.

Para el crecimiento en presencia de colorantes normalmente se utilizan: tionina y fucsina básica (López & Contreras, 2002).

Existen otras pruebas consideradas como especiales, debido a que sólo se realizan en laboratorios de referencia especializados en estas bacterias. Una de estas pruebas es la susceptibilidad a bacteriófagos las cuales se realizan sobre una capa de *Brucella* sembrada en forma masiva, en la que se coloca una gota pequeña de cada uno de los siguientes bacteriófagos: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wy) y Berkeley (Bk), y se observa la existencia de lisis en los sitios en donde se colocaron las gotas. Por lo anterior, se puede observar que el aislamiento es difícil, laborioso y con altos riesgos para quienes manipulan la bacteria, por lo que generalmente el diagnóstico se realiza por métodos indirectos de comprobación de la respuesta inmune ante la infección (MacMillan,1990). En nuestro medio, el objetivo de las pruebas serológicas no es solo el de identificar los animales que estan infectados, sino también el diferenciar los animales que han sido vacunados y están sanos, de aquellos que habiendo sido vacunados o no, estén infectados. Esto debido a que la vacunación no protege al ciento por ciento de los animales (López & contreras, 2004).

El método diagnóstico más antiguo y aún empleado es la **aglutinación**, para el cual se emplean suspensiones de células de *B. abortus* cepa 1119-3 o 99S, en fase lisa, que son las cepas recomendadas por los organismos internacionales

de referencia, para la elaboración de antígenos, tanto para uso humano como para animales.

Entre los métodos que emplean células completas como antígeno se puede mencionar:

- **Prueba de rosa de bengala\* (RB)** en la que el antígeno es una suspensión celular teñida con Rosa de Bengala y estandarizada a una concentración celular del 9 -10%. Es una prueba de escrutinio, rápida y sensible, sin embargo, cualquier resultado positivo deberá ser confirmado con el cultivo o en su defecto, con las pruebas serológicas complementarias que determinen el tipo de anticuerpo presente así como el título. Determina anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA aglutinantes, pero no cuantifica los anticuerpos, por lo que en forma aislada, no es de valor diagnóstico.

- **Prueba de aglutinación estándar (SAT).** Algunos autores consideran que es la prueba mas confiable por su simpleza y porque presenta un alto grado de correlación con RB, permite determinar la cantidad de aglutininas totales (IgM, IgG e IgA) anti-brucella en suero, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos, sobre todo si se emplea el micrométodo, que solo requiere de 10 ul de muestra (Young, 1990). .

- **Prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol (2-ME).** Es una variante de la anterior, que emplea un agente reductor para inactivar los anticuerpos IgM presentes en el suero u otros fluidos, pone de manifiesto aglutininas de los isotipos IgG e IgA. Títulos > 1/ 20 se consideran indicativos de brucelosis. Es una prueba que correlaciona bien con la evolución clínica de la enfermedad, de tal modo que, una vez concluida la terapia y en ausencia de síntomas se

esperaría que se torne negativa. En cambio, los pacientes (animales o humanos) con recaídas presentan incremento en el título, por lo que se considera un marcador de brucelosis activa. En la brucelosis crónica su utilidad es más limitada, por el tipo de anticuerpos que se inducen (Young, 1990).

- **prueba de coombs indirecto.** Se empleaba para detectar anticuerpos no aglutinantes de los isotipos IgG e IgA, sobre todo en los casos de brucelosis crónica. En la actualidad ha sido sustituida por el método de ELISA, que brinda mayores ventajas.

- **prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA).** Algunos autores han empleado el mismo antígeno de la prueba de SAT u otro semejante preparado con *B. melitensis*, para detectar los isotipos de anticuerpos característicos de una brucelosis aguda y crónica (López & Contreras, 2004).

La respuesta inmune inducida por *Brucella* en el hombre, se caracteriza por una producción inicial de anticuerpos del isotipo IgM, seguida de la secreción de anticuerpos del isotipo IgG e IgA sérica. La evolución de las inmunoglobulinas se puede medir empleando ELISA-IgM (con células enteras o LPS) o la prueba de aglutinación estándar, ya que se ha observado entre ellas una buena correlación. Igual se puede evaluar IgG, empleando la prueba de aglutinación con 2-ME o ELISA para IgG, entre estas dos pruebas no existe correlación. La diferencia se debe en gran medida a que la prueba ELISA IgG, cuantifica anticuerpos no aglutinantes, que no son cuantificados por la prueba del 2-ME, por lo tanto los títulos obtenidos con ELISA-G son de mayor

magnitud, que los obtenidos en la prueba de 2-ME. Esto en parte se debe al antígeno empleado para cada prueba, usualmente para ELISA IgG, se emplea LPS crudo o purificado, cadena O, extractos proteicos o proteína purificada (Baldi et al., 1996). Existen casos en los que no se observa una disminución en el título de anticuerpos IgG, una vez concluido el tratamiento. Por lo que se recomienda realizar una evaluación del paciente, en la que se incluyan estudios serológicos y bacteriológicos, ya que el paciente, puede presentar una recaída debida a la focalización de la bacteria en algún órgano. Esta situación puede desencadenar una brucelosis crónica.

Algunos pacientes, además desarrollan anticuerpos del isotipo IgA sérico e IgE, cuya función aún es desconocida, hasta ahora se les ha relacionado con algunos episodios alérgicos o de dermatitis por *Brucella* (Baldi et al., 1996). El método de ELISA a pesar de ser una prueba de gran utilidad para evaluar la evolución del paciente, tiene el inconveniente del costo y del antígeno, ya que cada laboratorio usa uno diferente y a la fecha no existe ningún consenso en cuanto a que antígeno es el más adecuado para ELISA, en consecuencia, no se pueden comparar los resultados obtenidos en un laboratorio con los de otro. Han sido múltiples las comparaciones de técnicas convencionales incluyendo técnicas inmunoenzimáticas (Bricker, 2002; Rivera, 2003; Mariño et al., 1990, 1992, 1998), la técnica Rosa de Bengala (RB), Rivanol y Fijación de complemento (FC) (Dájer- Abimerhi, et al., 2003; López et al., 1991; Diario Oficial, 1996) poseen características de elaboración y/o de sensibilidad y especificidad que hacen que se sigan buscando otras alternativas para el diagnóstico de la brucelosis bovina. La prueba de RB aunque tiene una alta sensibilidad relativa (100%) al compararla con FC, su baja especificidad la hace

solamente útil como prueba tamiz (López et al., 1991; Diario Oficial, 1996). En comparación, la prueba de Rivanol tiene una especificidad relativa alta (100%) comparada con FC, pero una sensibilidad relativa de 86%, lo que la hace útil como prueba complementaria (Dájer-Abimerhi, et al., 2003; Mejía & Luna, 1996). La prueba de FC es considerada de gran valor diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad (cerca al 99%); sin embargo, es de uso limitado debido al tiempo que se invierte en su estandarización, así como su complejidad técnica, que requiere de personal calificado (Dájer-Abimerhi, et al., 2003; Dájer et al., 1998; Dájer et al., 1995).

En la actualidad es necesario la implementación de pruebas serológicas sencillas y confiables que nos ayuden a discriminar los animales infectados con *B. abortus* de aquellos infectados con bacterias que reaccionan en forma cruzada y los vacunados con la cepa 19 de *B. abortus*, lo cual se ha logrado con diferentes sensibilidades y especificidades dependiendo del antígeno y anticuerpos monoclonales utilizados en diferentes pruebas de ELISA competitiva (Dájer-Abimerhi et al., 2003; Nielsen, 2002), ya que a pesar que esta cepa está descontinuada en algunos países para vacunar a los bovinos, todavía quedan en los hatos bovinos animales que fueron vacunados. La obtención de una prueba de estas características permitiría la implementación de medidas de control y erradicación más eficientes para esta enfermedad.

La especificidad de la ELISA competitiva comparada con FC es más alta para sueros provenientes de animales no vacunados en relación con los vacunados, lo que puede ser indicativo de que los anticuerpos vacunales por cepa 19 de algún modo sí pueden ser detectados por la ELISA competitiva; sin embargo, la capacidad de la ELISA competitiva para detectar a los verdaderos positivos y

negativos se incrementará conforme sean retirados los animales vacunados de la población (Nielsen et al., 2002; Dájer-Abimerhi, et al., 2003; Rodríguez, et al., 2002).

La mayoría de las investigaciones demuestran la utilidad de la ELISA indirecta como prueba tamiz de elevada sensibilidad con respecto a la Rosa de Bengala y la confirmación de positivos mediante ELISA competitiva con respecto a fijación de complemento, además de la utilidad de la prueba de ELISA competitiva como prueba confirmatoria diferencial de estatus de infección o vacunación de los animales reactores positivos en la prueba indirecta (Nielsen, 2002; Mariño et al., 2002) sugiriendo que su aplicación proporcionará un método más exacto y estandarizado para el diagnóstico y para la ayuda de las campañas de control y erradicación de la enfermedad (Mariño et al., 2002)

Para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis en ganado lechero, se cuenta con la prueba del anillo en leche. El incremento del número de animales en los hatos produce una mayor dilución de la cantidad de leche que produce cada vaca, lo cual reduce la sensibilidad de esta prueba; por lo tanto, es necesario evaluar pruebas más sensibles como la ELISA en leche para detectar bajos niveles de anticuerpos específicos.

En los últimos años, la prueba de ELISA indirecta, ha permitido reducir las limitaciones de sensibilidad de la prueba del anillo en leche, y ha mostrado ser relativamente sencilla de realizar y aplicable para una utilización masiva (Wright, 1998). Además, el empleo de protocolos de ejecución y lectura automática de placas mediante programas de computación (EDI) con análisis integrado, permite un extensivo control de la calidad interna de las pruebas y su fácil establecimiento en el trabajo de rutina. Además, algunos estudios indican

claramente que la prueba de ELISA es más específica y sensible que la prueba rápida del anillo en leche (Rivera et al., 2003).

Actualmente, el uso continuo de la prueba de ELISA indirecta en la vigilancia por sondeo de leches, ha demostrado eliminar o reducir la incidencia en hatos lecheros infectados por debajo del 1% (Vanzini et al., 1998) siempre y cuando se adopten las medidas sanitarias recomendadas por la autoridad competente.

**Prueba convencional del anillo en leche**, aplicada a este tipo de muestras, ha demostrado a través de los años, una serie de ventajas sobre las pruebas serológicas y ha sido de gran utilidad en países que han controlado o mantienen niveles muy bajos de infección (Jacobson, 1998). Sin embargo, se ha notificado que los hatos infectados pueden no ser detectados por esta prueba (al dar resultados falsos negativos), si se omite de incluir la muestra de leche o de crema, si la vaca infectada está en período seco en el momento del muestreo, si no existe infección a nivel de ubre o si la sensibilidad de la prueba es baja (Nielsen et al., 1998). Así mismo, pueden contribuir a este falso resultado, el factor de dilución en grandes hatos, la falla en la elevación de la crema en algunas leches o la influencia de las inadecuadas condiciones de almacenamiento o conservación de la muestra, sobre las inmunoglobulinas (Caffin, Poutrel & Rainard, 1983; Gallego, Mariño & García, 1993). En los animales procedentes de hatos con mastitis, también es posible obtener resultados falsos positivos (Rodríguez, 1994), debidos a altos niveles de este cuadro clínico en las fases iniciales o finales de la lactancia o por el daño físico sobre la leche por procesos de congelación.

### **Prueba molecular. (PCR)**

En cuanto a pruebas moleculares para el diagnóstico de brucelosis, el método de diagnóstico molecular rápido para la detección de *Brucella* spp en muestras de sangre mediante reacción en cadena de la polimerasa **(PCR)**, está basado en la ampliación selectiva del DNA del género *Brucella* en sangre periférica y otras muestras clínicas. Para ello, se utilizan dos iniciadores de 21 nucleótidos respectivamente denominados B4 y B5. Estos oligonucleótidos amplifican una señal 223 pares de bases del gen que codifica la síntesis de una proteína de membrana de la superficie externa de *Brucella abortus* de 31 kDa (BCSP31) específica del género *Brucella*. La técnica propuesta se ha mostrado mucho más sensible que los métodos bacteriológicos y más específicos que los métodos serológicos habituales permitiendo un fácil y rápido diagnóstico de la infección, la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de las recidivas evitando el riesgo de manipulación de la bacteria para el personal del laboratorio.

El uso de la PCR para el diagnóstico de la brucelosis facilitará la detección del patógeno, complementará los estudios, inmunológicos y epidemiológicos, además de apoyar, en el caso de los bovinos, la erradicación de la enfermedad emprendida por los programas nacionales de sanidad animal (Rivera et al., 2003). Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta prueba no reemplaza las pruebas serológicas por el elevado costo que implica su utilización y la falta de personal calificado para su realización, por lo que en la actualidad está ausente en los programas de erradicación y control de la brucelosis (Bricker, 2002).

La aplicación de los conocimientos expuestos sobre la enfermedad complementados con óptimas prácticas de manejo contribuirán al adecuado control de esta y otras enfermedades que afectan la producción. Es así que la práctica de bioseguridad se enfoca hacia la prevención de la introducción de patógenos al hato y estima los riesgos asociados con la introducción de ganado procedente de diferentes fuentes.

Además busca limitar la transmisión de los patógenos dentro de un hato infectado en especial dirigido hacia el manejo del animal enfermo, de las áreas de parición y el manejo de desechos. Así mismo debe contemplar los conceptos de eliminación de animales, administración de vacunas y evaluación del estado de las enfermedades en el hato. Hoy en día es importante incluir los conceptos de reducción de riesgos a otras especies en especial el hombre, para el caso de zoonosis y el de hatos libres de infecciones consideradas restrictivas en normas de comercio internacional como es el caso de la brucelosis. Desafortunadamente la mayoría de los hatos obtienen sus animales de reemplazo de fuentes en las que es difícil documentar las historias genéticas y sanitarias, muy pocos exigen o realizan pruebas serológicas al ganado que compran y aún menos efectúan cuarentena al ganado cuando éste llega al hato.

Las normas relativas a los intercambios internacionales establecidas a nivel mundial tienden a reemplazar las barreras arancelarias por barreras sanitarias y de calidad, que imponen cuatro criterios o parámetros tanto para la leche cruda como para los productos derivados; éstos son: cantidad mínima de microorganismos saprófitos, ausencia de microorganismos patógenos, concentraciones permitidas de residuos y concentraciones permitidas de

contaminantes (Blousson, 1994). Por consiguiente el uso de metodologías seguras es una prioridad, para avanzar en la entrega de productos alimenticios que cumplan con los estándares y que sean aplicables desde la primera fase de la cadena de producción, de manera que los hatos sean declarados libres de infecciones. El consumo de leche y productos lácteos de mala calidad puede generar diferentes tipos de enfermedades zoonóticas, por lo que la salud animal afecta directamente a la salud pública. La leche desde el sitio de producción hasta el consumo, puede sufrir contaminaciones y los agentes patógenos como *B. abortus* presentes en ella pueden transmitirse por varios mecanismos al ser humano, ya sea por consumo directo o de sus derivados o por ingestión de otros productos contaminados. La leche a su vez puede contaminarse con agentes patógenos presentes en el organismo del animal o agregados durante el proceso de transformación del producto. La brucelosis a nivel mundial, continúa generando grandes pérdidas económicas tanto en la industria pecuaria como en la salud pública, por lo que aunado a las campañas de vacunación en los animales, se deben establecer o incrementar medidas de prevención, de higiene personal y medidas sanitarias en la elaboración de los quesos y otros derivados lácteos, orientadas a evitar que la población general, que es la que se encuentra en mayor riesgo, siga consumiendo productos alimenticios que representan un riesgo para su salud.

Lo anterior, requiere de metodologías óptimas para la conservación de alimentos sanos, la realización oportuna de diagnósticos que permitan establecer medidas de control y corrección, el monitoreo y la evaluación del estado sanitario de los sitios de producción, lo que redundará en mayor eficacia. Es por ello que para asegurar la calidad de los alimentos debe estimularse al

productor a entregar un producto que cumpla con todas las normas exigidas que son hoy día respaldadas por diferentes entidades o empresas que promueven este sistema de control de calidad (Blousson, 1994; Cuellar, 1994).

### **VACUNAS CONTRA LA BRUCELOSIS BOVINA.**

Debido a las serias consecuencias médicas y económicas que deja la brucelosis, se han hecho muchos esfuerzos para prevenir la infección con el uso de vacunas (Nicoletti, 1990).

El lipopolisacárido (LPS) ha sido identificado como el principal inductor de las respuestas de anticuerpos. La cadena-O juega un papel central en el diagnóstico serológico de la brucelosis puesto que es un antígeno inmunodominante capaz de inducir respuestas de anticuerpos en la mayoría de animales expuestos a organismos de cepas lisas de *Brúcella* y la mayoría de pruebas diagnósticas serológicas están basadas en la detección de anticuerpos dirigidos contra la cadena-O. Su papel en la protección es menos decisivo pues puede estimular los anticuerpos que promueven el bloqueo de las bacterias en circulación. Sin embargo ellos también tienen pequeños efectos sobre organismos intracelulares y respuestas mediadas por células (CMI) implicando macrófagos activados y particularmente, células T citotóxicas (Pavlov et al., 1982; Zhan et al., 1993a; Murphy et al., 2001). Las respuestas CMI son más estimuladas por vacunas vivas o potencialmente por el uso de inyecciones múltiples de antígenos protectores apropiados en la presencia de adyuvantes que favorecen los mecanismos CMI. La dificultad es que hasta el momento se han identificado pocos antígenos eficaces. Numerosas células de superficie y componentes intracelulares se han determinado como antígenos protectores.

Hasta ahora, se ha identificado una actividad significativa en solamente algunos antígenos; la proteína ribosomal L7/L12 (Oliveira & Splitter, 1996a), Cu-Zn superóxido dismutasa (Tabatabai & Pugh, 1992), proteína 22.9 KDa (Céspedes et al., 2000), proteína citoplásmica p39 (Al-Mariri et al., 2001), lumazina sintetasa (Velikovskiy et al., 2002) y gliceraldehído deshidrogenasa (Rosinha et al., 2002). Todos éstos pueden inducir repuestas de células T involucrando macrófagos activados, y particularmente, células T CD8 citotóxicas. Los mecanismos precisos de eliminación de la *Brúcella* intracelular son todavía confusos, pero las perforinas, el interferón gamma (INFg) y el factor de necrosis tumoral (TNFa) juegan un papel importante en estos mecanismos (Pavlov et al., 1982; Zhan et al., 1993; Murphy et al., 2001). Evidentemente, una vacuna eficaz necesita activar estos factores.

Las vacunas más exitosas hasta ahora han sido las que emplean derivados atenuados vivos de *Brúcella* spp.

### **CEPA 19**

La vacuna que se ha usado principalmente para prevenir la brucelosis bovina es *B. abortus* **Cepa 19** (Nicoletti, 1990). Esta fue descrita por primera vez en 1930 y fue originalmente aislada de leche de una vaca Jersey como una cepa virulenta en 1923, pero después de ser mantenida en el laboratorio a temperatura ambiente durante un año, se convirtió en una cepa atenuada (Buck, 1930). Esta cepa fue capaz de inducir una inmunidad protectora en bovinos. La vacunación se realiza en terneros entre los 3 y 12 meses, según los programas de cada país. En algunos casos, dichos programas emplearon la vacunación controlada en animales adultos mediante la utilización de una dosis

reducida. Esta cepa produce una protección de aproximadamente el 70% pero su eficacia varía dependiendo de una variedad de variables incluyendo edad de vacunación, dosis, ruta y prevalencia de brucelosis en rebaños vacunados (Nicoletti, 1990). La Cepa 19 es un organismo atenuado de morfología lisa normalmente incapaz de crecer en presencia de eritritol (Jones et al., 1965). Aunque la Cepa 19 es de baja virulencia para bovinos, la vacunación de vacas preñadas puede resultar en abortos. Este evento es algo raro, sin embargo, puede presentarse < 1 hasta 2.5% en condiciones de campo (Schurig, Sriranganathan & Corbel, 2002; Beckett & Mc Diarmid, 1985).

La presencia de LPS con una cadena-O en la Cepa 19 explica la presencia y persistencia de anticuerpos en suero después de la administración de esta vacuna. Estos anticuerpos son detectados en los ensayos serológicos utilizados para el diagnóstico de la brucelosis y son el principal problema asociado con la vacunación de la Cepa 19 puesto que obstaculizan la diferenciación del ganado vacunado con el infectado. La presencia de estos anticuerpos depende de la edad, dosis y vía de vacunación (Nicoletti, 1990). Durante la vacunación con la cepa 19, los anticuerpos IgM aparecen hacia el día 5, alcanzando su pico a los 13 días post vacunación. Los anticuerpos IgG1 aparecen un poco más tarde o simultáneamente con la IgM, llegando a valores máximos entre los 28 y 42 días, momento en el cual se inicia su eliminación. Los mismos patrones generalmente se cumplen en la infección experimental con cepa virulenta y también en los casos crónicos de campo, excepto que la actividad de los anticuerpos IgM declina a valores bajos y la actividad residual permanece en IgG1 e IgG2 los cuales se mantienen en títulos elevados (Schurig, Sriranganathan & Corbel, 2002). En los animales vacunados con la

cepa 19, frecuentemente se presenta también una infección persistente con la producción de IgG durante un tiempo prolongado como se mencionó anteriormente. Esta situación ocasiona gran dificultad para la diferenciación de animales infectados y vacunados, incrementándose aún más el problema cuando los animales se vacunan varias veces o cuando se presentan combinaciones de infección de campo y vacuna. En términos generales, se puede hacer una diferenciación entre ambas condiciones, siempre y cuando exista una sola vacunación y ésta haya sido realizada en la edad más temprana posible. Por el contrario, cuanto mayor sea la edad y más numerosas las exposiciones vacunales, la posibilidad de diferenciación desaparece (Schurig, Sriranganathan & Corbel, 2002). De acuerdo a lo anterior, el mal uso de la vacuna interfiere con el buen resultado de las pruebas diagnósticas y por lo tanto, se pueden sacrificar animales aparentemente positivos pero que realmente se encuentran sanos. La persistencia de anticuerpos serológicos producto de la vacunación con la Cepa 19 interfirió con programas de erradicación y estimuló la búsqueda de nuevas vacunas para evitar este problema. Lógicamente, el uso de una cepa rugosa viva atenuada, podría evitar este problema si la cepa fuera estable y pudiera conferir inmunidad protectora sólida.

**B. ABORTUS CEPA LISA 45/20** fue aislada de una vaca en 1922 y un derivado rugoso fue obtenido después de 20 pases en cobayas; esta cepa llamada 45/20, fue capaz de proteger cobayos y bovinos de la infección por *Brucella* (McEwen & Priestley, 1938; McEwen, 1940). Desafortunadamente, cuando se utilizaba como vacuna viva, la cepa 45/20 no era estable y tendía a volver a la forma lisa virulenta (Schurig et al., 1984, 1991). Para superar la falta

de estabilidad de la vacuna viva de la cepa 45/20, fue utilizada una bacterina incorporada en los adyuvantes basada generalmente en emulsiones de agua y aceite y usándola de esta forma la vacuna no producía abortos. Sin embargo, la variabilidad de la protección, junto con efectos serológicos imprevisibles y la ocurrencia de varias reacciones locales en el sitio de la vacunación en algunos animales, motivó la suspensión de la vacunación con la cepa 45/20 (Schurig, Sriranganathan & Corbel, 2002).

El hecho de que *B. abortus* cepa 45/20, un organismo rugoso con poca o sin habilidad para inducir anticuerpos contra la cadena-O pudiera inducir una protección significativa contra la infección de *B. abortus*, indicó que los organismos rugosos se pueden utilizar para inducir inmuno respuestas protectoras mientras eliminen los problemas de diagnóstico que presentan las cepas lisas. La estrategia era encontrar un mutante rugoso que estuviera esencialmente desprovisto de la cadena-O, estable y suficientemente atenuado. La atenuación tuvo que ser limitada a un grado suficiente permitiendo la colonización por algunas semanas para inducir una respuesta protectora adecuada.

### **VACUNA RB 51**

Tal derivado fue producido de un mutante de la cepa *B. abortus* 2308 rifampicinaresistente y se denominó *B. abortus* RB51 (Schurig et al., 1991). “R” por rugoso y “B” por *Brucella*; 51 no está dado por el número de pases necesarios para seleccionar la cepa RB51, este se refiere a una nomenclatura interna del laboratorio que se utilizó cuando fue derivada. La cepa RB51 resultó ser esencialmente desprovista de la cadena-O, su rugosidad fue muy estable

después de pases múltiples in vitro e in vivo en varias especies animales (Schurig et al., 1991; Colby, 1997), aunque se ha divulgado más recientemente la síntesis de niveles bajos de la cadena-O (Clockaert, Zigmunt & Guilloteau, 2002). Debido a estas producciones mínimas de la cadena-O, generalmente, no se inducen anticuerpos de la cadena-O detectables por las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de la brucelosis sin importar la edad, dosis o frecuencia de aplicaciones, aunque se han divulgado evidentes respuestas anamnésicas (Olsen et al., 1996). Esta cepa se ha evaluado en estudios llevados a cabo en ratones, cobayos, cabras y ganado bovino, demostrando que las características abortivas no están presentes o se encuentran enormemente reducidas (Schurig et al., 1991; Palmer et al., 1996). Cuando se usa un solo protocolo de vacunación su efecto protector es similar al que induce la Cepa 19 (Cheville et al., 1992, 1996a,b). Los experimentos recientes llevados a cabo en campo bajo condiciones de alta y baja prevalencia de brucelosis indican que la inmunidad inducida por la cepa RB51 (por lo menos un año después de la vacunación) es similar o mejor que la inducida por la cepa 19 (Lord et al., 1998). Hasta la fecha, alrededor de 5.000.000 terneras se han vacunado por vía subcutánea con la dosis recomendada de  $1-3.4 \times 10^{10}$  organismos sin efectos indeseables. Sin embargo, se recomienda que la inmunización debe empezar en animales no menores de 4 meses. Las vacas preñadas pueden ser vacunadas con seguridad vía subcutánea con  $10^9$  organismos sin la inducción de abortos o placentitis (Palmer et al., 1997). La inoculación intravenosa de vacas preñadas con  $10^{10}$  organismos conduce a una infección placentaria y fetal, pero no al aborto (Palmer et al., 1996) sugiriendo que la vacunación de animales no preñados y ganado adulto con

una dosis completa si es seguro aunque es necesario confirmar esto con estudios controlados empleando la vía recomendada (subcutánea) y un número más grande de bovinos. El modelo del ratón indica que la inmunidad protectora inducida por la cepa RB51 está solamente mediada por células T puesto que la transferencia pasiva de anticuerpos inducidos por RB51 no protegen al huésped (Bagchi, 1990; Jiménez de Bagues et al., 1994). Estudios en progreso sugieren que las células T citotóxicas son capaces de eliminar las brucelas por medio de macrófagos inducidos por la vacunación con la cepa RB51. Estos resultados en ratones indican que la cepa RB51 es capaz de proteger contra infecciones de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis* (Winter et al., 1996).

Todas las especies examinadas han permanecido serológicamente negativas en todas las pruebas serológicas convencionales para brucelosis, después de la vacunación con la cepa RB51 (Olsen et al., 1996). Finalmente, aunque la cepa RB51 tiene un excelente registro de estabilidad, la naturaleza exacta de las mutaciones no se conoce. Es muy probable que la cepa RB51 altere la síntesis de la cadena-O y adicionalmente la mutación de algunos genes indefinidos que se ocupan del ensamblaje y transporte de la molécula LPS. El control y la erradicación de la brucelosis bovina se basa claramente en tres pilares: (1) la vacunación de las hembras bovinas, (2) el diagnóstico correcto de la enfermedad y (3) la rápida segregación de los animales positivos.

Algunas de las características ideales de una vacuna contra *Brucella* son (Saldarriaga & Rugeles, 2002): (1) No debe inducir anticuerpos que interfieran con el serodiagnóstico de la infección de campo, (2) no debe producir enfermedad ni infección persistente en los animales inmunizados; además no debería ser patogénica para los humanos, (3) una dosis vacunal debe inducir

una protección a largo término contra infecciones uterinas, sistémicas y prevenir el aborto. La vacuna no debería causar aborto si se administra a animales preñados, (4) debe ser estable y no producir reversiones virulentas *in vivo* o *in vitro*, (5) debe tener un bajo costo de producción. Además, la vacuna no debería contaminar la carne ni productos lácteos y debe ser estable biológicamente, es decir, libre de reversión *in vitro* e *in vivo*. Según la OMS (1997), una vacuna viva ideal debería tener marcadores fenotípicos o genéticos específicos que permitieran diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo. Según lo anterior, la vacuna que más se adapta a estas condiciones es la vacuna B. abortus RB51, ya que como se mencionó anteriormente esta vacuna no interfiere en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina debido a que carece de la cadena-O que es la que estimula la producción de anticuerpos que interfieren con el diagnóstico. De la misma forma al aplicar esta vacuna no se produce la infección y por lo tanto no produce abortos, lo cual si se ha observado en las vacunaciones con la Cepa 19. Entre otras Cosas la vacuna RB51 ha demostrado ser estable sin producir reversiones virulentas *in vivo* o *in vitro* y según los estudios realizados aunque se ha encontrado alguna residualidad en leche, ésta es mucho menor que la observada con la Cepa 19. Finalmente cabe recordar que la cepa RB51 se puede diferenciar de las cepas de campo ya que esta cepa es resistente a la rifampicina.

A pesar de que en la actualidad existen vacunas eficaces contra la brucelosis bovina, las investigaciones en este campo continúan. El uso de los inmunógenos de Brucella como antígenos recombinantes para inducir una inmuno respuesta protectora en animales está siendo investigado por varios grupos. La estrategia preferida es identificar esos antígenos de Brucella que

sean verdaderamente responsables de la inducción de una respuesta CMI protectora. Varios ensayos in vitro como la producción de citocinas (INF $\gamma$ , IL2, IL12 etc.) la proliferación de linfocitos específicos del antígeno, la citotoxicidad de la célula T hacia las células blanco infectadas con *Brucella* y los análisis in vivo (hipersensibilidad retrasada) se pueden utilizar para seleccionar los supuestos antígenos protectores, pero este acercamiento de ninguna manera es a toda prueba y no garantiza la selección de un antígeno protector. Algunas investigaciones han usado varios virus recombinantes vacunales que expresan una variedad de antígenos de *Brucella* incluyendo HtrA, GroEL, GroES, Cu-Zn SOD y YajC entre otros que inducen respuestas inmunes humoral y mediada por células en ratones. De estos estudios está claro que la vacuna recombinante puede expresar los antígenos de *Brucella* e inducir respuestas inmunes específicas a estos antígenos in vivo (Schurig, Sriranganathan & Corbel, 2002). Se necesitan más investigaciones en este campo para optimizar vectores y niveles de producción de antígeno recombinante para alcanzar una apropiada respuesta CMI protectora.

De igual forma, experimentos realizados en ratones han demostrado que los mutantes *bvrS*- y *bvrR*- protegen los ratones contra la cepa virulenta *B. abortus* 2308 en niveles  $\approx$  similares a los obtenidos con *B. abortus* cepa 19 y en niveles más altos que *B. abortus* RB51. Así mismo su baja virulencia y las bajas propiedades endotóxicas hacen de estas cepas mutantes *bvrS*- y *bvrR*- una atractiva posibilidad para el desarrollo de vacunas contra la brucelosis humana (López-Goñi et al, 2002).

## **ELIMINACIÓN DEL AGENTE AL MEDIO.**

La secreción de Brucella con la leche puede tener lugar a lo largo de todo el año, pudiendo proseguir hasta el final de la vida del animal. La cantidad de bacterias eliminadas es variable, pudiendo oscilar desde menos de 100 hasta 200.000 (sin precisar volumen). La cuantía más alta se registra después del parto y la más débil en la cima de la lactación. En este período pueden estar ausentes de la leche durante días o semanas, para luego de repente volver a aparecer. En el período de secado vuelve a reforzarse su actividad. El contenido de gérmenes de la fracción final del ordeño es más elevada que en las porciones inicial y media. En la leche y en secreciones vaginales se secretan alrededor de 10 bacterias/gramo, aún en los casos asintomáticos (Rodríguez et al., 2005; Samartino, 2003; Rodríguez, 2002).

## **TRATAMIENTO Y PROFILAXIS**

Dado a que la brucelosis es una zoonosis no tiene sentido desarrollar tratamientos terapéuticos para los animales pero si para el hombre. No obstante si se daignostica la enfermedad en algún animal deben tomarse una serie de medidas para evitar su difusión (Martines- Conde 1984).

En primer lugar se deben separa los animales enfermos de los sanos siendo lo mas adecuado, e incluso generalmente obligatorio proceder a su sacrificio. En la actualidad exixten programas de saneamiento dependientes de las diferentes administraciones publicas que contemplan el sacrificio de animales enfermos acompañada en algunas regiones de la vacunación de animales sanos.

En caso de abortos debe separarse el animal hasta diagnosticar la causa del mismo. Al mismo tiempo debe eliminarse el material infectante (placenta, secreciones vaginales, etc). Y desinfectar el area ya que las bacterias pueden permanecer viables en las camas durante periodos de tiempo prolongados.

Otra medida profiláctica de gran importancia es el control sanitario de los animales de nueva adquisicion, incluso si se refiere a secciones temporales como puede suceder con los sementales. En el caso de inseminación artificial deben exigirse garantías sanitarias del semen no solo zootécnicas ya que la trasmisión venérea de la brucelosis es mas frecuente en el caso de inseminación artificial que con la monta natural.

## **CONCLUSIONES**

- Se puede concluir de acuerdo al análisis de la revisión bibliográfica, dar destacar que el buen diagnóstico de la brucelosis bovina, depende del manejo adecuado de las muestras, los antecedentes clínicos de los animales, el total conocimiento de las características de la enfermedad y el uso adecuado de las vacunas reglamentado por los programas de control y erradicación de cada país, lo que implica un trabajo conjunto de ganaderos, veterinarios, técnicos, microbiólogos y entidades gubernamentales entre otros, que contribuyan con sus aportes y conocimientos a la total erradicación de la enfermedad, para que los países que aún la presentan dejen de verse afectados por las grandes pérdidas económicas que ésta representa y de igual forma la brucelosis bovina deje de ser un problema para la salud pública.

- En cuanto a las pruebas diagnósticas, se pudo observar que cada país realiza diferentes pruebas de acuerdo a su programa de control y erradicación de la brucelosis bovina. Sin embargo, según las investigaciones realizadas, el método molecular PCR es más sensible que los cultivos bacteriológicos y más específica que los métodos serológicos, lo cual facilita el diagnóstico. Sin embargo, es una prueba costosa que requiere de personal calificado por lo que su uso se ha limitado a humanos, además de que muchos países no cuentan con los recursos económicos para adoptar este tipo de métodos y esto implicaría más costos ocasionados por la enfermedad. Por esto, las pruebas más adecuadas para el diagnóstico de brucelosis en bovinos siguen siendo las serológicas, entre las cuales, la prueba ELISA indirecta presenta más sensibilidad que la prueba Rosa de Bengala y Anillo en leche para ser utilizada como prueba tamiz, mientras que como prueba confirmatoria ELISA competitiva tiene más sensibilidad y especificidad con respecto a Fijación de Complemento, además que tiene gran utilidad como prueba confirmatoria diferencial de estatus de infección o vacunación de los animales reactivos positivos en la prueba indirecta sugiriendo que su aplicación proporcionará un método más exacto y estandarizado. Además de ser pruebas sencillas y rápidas que facilitan el diagnóstico de la brucelosis bovina, aspecto fundamental para determinar la situación epidemiológica de un hato y por ende facilitar la certificación de hatos libres que contribuyan al control y erradicación de la enfermedad.

Finalmente , que la vacuna cepa RB51 por las características que presenta es la más adecuada para la prevención de la brucelosis bovina ya que según las

investigaciones que se han realizado, ésta otorga la misma protección que la vacuna cepa 19 sin interferir con las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad. Cabe recordar que la eficiencia de la vacuna, cualquiera que sea, depende del buen manejo que se le de y su aplicación se debe realizar por veterinarios acreditados que conozcan la situación epidemiológica del lugar para que según su criterio se adopten las medidas adecuadas. Ya que la vacunación es uno de los pilares fundamentales para el control y la erradicación de la brucelosis bovina, se deben continuar con las investigaciones en este campo ya que aunque en la actualidad las vacunas utilizadas previenen la enfermedad, éstas no son 100% efectivas.

### **RECOMENDACIONES.**

De acuerdo a ésta revisión bibliográfica de brucelosis bovina, podemos observar la importancia que implica el conocimiento del comportamiento de la enfermedad, además de los métodos diagnósticos, el control mediante el uso de vacunas y todos los parámetros que influyen en el manejo de la enfermedad, ya que ésta es una importante zoonosis y ocasiona grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario en todos los países que no la han logrado erradicar. Es recomendable que los ganaderos se capaciten y reconozcan la importancia que tiene el buen manejo de los animales y de todas las actividades relacionadas con el control de enfermedades, ya que en gran parte de ellos depende que las enfermedades importantes se logren erradicar. De la misma forma, la labor de los profesionales debe ser la de realizar las capacitaciones a ganaderos y técnicos y continuar con las investigaciones acerca de nuevos métodos diagnósticos y posibles vacunas futuras

para obtener nuevos logros con el fin de conseguir la tan anhelada erradicación de la enfermedad.

En cuanto a la población en general es importante que realicen un manejo adecuado de los alimentos, ya que éstos son la principal fuente de transmisión de enfermedades, además de la buena higiene en sus hogares y establecimientos que comercialicen productos alimenticios, ya que en gran parte de esto depende que muchas enfermedades zoonóticas dejen de ser un riesgo y un problema para la salud pública.

## Referencias

Wyatt. H. V., 1999. Royal Navy Surgeons and the transmission of brucellosis by goats' milk . R. Naval Med. Serv. 85, 112-117.

Nicoletti Paul. 2002. A short history of brucellosis. Veterinary microbiology Vol. 90: Pp 5-9.

López A, Contreras A. 2004. Brucella. Scand J Infect Dis Vol. 36: Pp 636-8.

Servicio Agrícola Ganadero (SAG). 1998. Introducción de la vacuna, cepa RB51 en el programa de erradicación de la brucelosis bovina en Chile. Erradicación de la Brucelosis. Boletín Informativo del Departamento de Protección Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero, Santiago de Chile. Pp 1-6.

SENACSA. 2000. Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina 2002-2004. Servicio Nacional de Salud Animal (SENACSA). Ministerio de Agricultura y Ganadería. República del Paraguay.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 1999. Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis bovina. Resolución 115/99. Mimeo Pp 62.

Suárez-Güemes F., Díaz Aparicio E., Mancera Martínez A., Vázquez Navarrete J., Flores Castro, R.: XXV Años de aportaciones al Estudio de la Brucelosis Animal en México. Premio CANIFARMA, 1994 (memorias).

Bang, B., The etiology of epizootic Abortion, J. Comp. Pathol. Ther. 10, 125, 1897.

Del Río Vargas, J.: Campaña Nacional Contra la Brucelosis en México, Antecedentes y Estrategias. Foro Nacional Sobre Brucelosis (memorias), INIFAP/UNAM, pp.:84-105, México, 1978.

Diario Oficial de la Federación. Agosto 8 del 1971.

Norma Oficial Mexicana de la Campaña de Erradicación de la Brucelosis en los Animales: NOM-ZOO-041-1995.

Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J., Liautard J.P. 2002. The innate immune response against *Brucella* in humans. Veterinary Microbiology Vol. 90: Pp 383-394.

Richey, E.J. & Harrel, C.D. 1997. Brucella abortus disease (Brucellosis) in beef cattle. Institute of Food and Agricultural Sciences Vol. 100: 1-6.

Rodríguez, A., Orduña, A., Ariza, X., Moriyón, I., Díaz, R., Blasco, J.M., Almaraz, A., Martínez, F., Ruiz, C., Abad, R. 2002. Manual de Brucelosis. 1ª edición. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar social (Eds), Catilla, España. Pp 139.

Rodríguez, Y., Ramírez, W., Antúnez, G., Pérez, s., Ramírez, Y., Igarza, A. 2005.

Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Revista Veterinaria REDVET Vol. 6: Pp 1-9.

Samartino Luis E. 2003. Aspectos Generales de la Brucelosis Bovina. Jornada de Actualización Técnica. INTA, Castelar. Argentina.

Fernández, A. 1982. Algunos aspectos epizootiológicos de la Brucelosis Bovina en las condiciones de la República de Cuba. Tesis para optar por el grado de candidato a doctor en ciencias veterinarias. Escuela Superior de Veterinaria de Brno. Checoslovaquia. Pp 15-38.

Moreno, R., Rentería, & E., Searcy, B. 2002. Seroprevalencia y factores de riesgos asociados a la Brucelosis Bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. Revista Técnica Pecuaria de México Vol. 40: Pp243-249.

Gorvel Jean Pierre, Moreno Edgardo.2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Veterinary microbiology Vol. 90: Pp 281-297.

Nicoletti, P. 1990. Vaccination. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds), Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton. Pp 284-299.

Pavlov, H., Hogarth, M., McKenzie, I.F.C., Cheers, C. 1982. In vivo and in vitro effects of monoclonal antibody to Ly antigen on immunity to infection. Cellular immunology Vol. 71: Pp 127-138.

Zhan, Y., Kelso, A. & Cheers, C. 1993. Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. Immunology Vol. 80: Pp 458-464.

Murphy, E.A., Sathiyaseelan, J., Parent, M.A., Zou, B., Baldwin, C.L. 2001. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. Immunology Vol. 103: Pp 511-

518.

Oliveira, S.C. & Splitter, G.A. 1996a. Immunization of mice with recombinant L7/12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. Vaccine Vol. 14: Pp 959-962.

- Tabatabai, L.B. & Pugh, Jr., G.W. 1992. Modulation of immune responses in BALB/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine* Vol. 12: Pp 919-924.
- Cespedes, S., Andrews, E., Folch, H., Onate, A. 2000. Identification and partial characterization of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *Journal of Medical microbiology* Vol. 49: Pp 165-170.
- Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michael, P., Godfroid, J., Walravens, K., Letesson, J.J. 2001. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P30 of *Brucella* spp. *Infection and immunity* Vol. 69: Pp 6264-6270.
- Roshina, G.S., Myiوشي, A., Azevedo V., Splitter, G.A., Oliveira, S.C. 2002. Molecular and immunological characterization of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-dehydrogenase, a T- and B- cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *Journal of Medical Microbiology* Vol. 51: Pp 1-11.
- Velikovskiy, C.A., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H., Goldbaum, F.A., Estein, S., VBowden, R.A., Bruno, L., Fossati, C.A., Spitz, M. 2002. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity* Vol. 70: Pp 2507-2511.
- Schurig Gerhardt, Sriranganathan Nammalwar, Corbel Michael. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary microbiology* Vol. 90: Pp 479-496.
- Beckett, F.W. & Diarmid, S.C. 1985. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *British Veterinary Journal* Vol. 141: Pp 507
- McEwen, A.D. & Priestley, F.W. 1938. Experiments on contagious abortion. Immunization studies with vaccines of graded virulence. *Veterinary Record* Vol. 50: Pp 1097.
- McEwen, A.D. 1940. Experiments on contagious abortion. The immunity of cattle inoculated with vaccines of graded virulence. *Veterinary Record* Vol. 52: Pp 815.
- Schurig, G.G., Roop, R.M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D., Sriranganathan, N. 1991. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* Vol.28: Pp 171-188.
- Colby, L.A. 1997. The humoral response of Elk (*Cervus elaphus nelsoni*) and mice to vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. M.Sc. thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.

CloECKaert, A., Zygmunt, M.S. & Guilloteau, L.A. 2002. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. *Vaccine* Vol. 20: Pp 1820-1822.

Cheville, N.F., Jensen, A.E., Halling, S.M., Tatum, F.M. 1992. Immunology: bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutants strains of *Brucella abortus*. *American Journal of Veterinary Research* Vol. 53: Pp 1881-1888.

Cheville, N.F., Olsen, S.C., Jensen, A.E., Stevens, M.G., Palmer, M.V., Florance, A.M. 1996a. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* RB51 to protect cattle against brucellosis. *American Journal Of Veterinary Research* Vol. 57: Pp 1153-1156.

Cheville, N.F., Olsen, S.C., Jensen, A.E., Stevens, M.G., Florance, A.M., Houg, H.H., Drazec, Z.E., Warren, R.L., Hadfield, T.L., Hoover, D.L. 1996b. Bacterial persistence and immunity in goats vaccinated with a pure deletion mutant or the parental 16M strain of *Brucella melitensis*. *Infection and immunity* Vol. 64: Pp 2431- 2439.

CloECKaert, A., Kerkhofs, P. & Limet, J.N. 1992. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 30: Pp 3168-3174.

CloECKaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Grepinet, O. 1996. Polymorphism at the *dnaK* locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. *Journal of Medical Microbiology* Vol. 45: Pp 200-205.

CloECKaert, A., Grayon, M., Grepinet, O. 2000a. An IS711 elements downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* Vol. 7: Pp 835-839.

CloECKaert, A., Grayon, M., Veger, J.M., Letesson, J.J., Godfroid, F. 2000b. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Research in Microbiology* Vol. 151: Pp 209-216.

CloECKaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., Godfroid, J. 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes and Infection* Vol. 3: Pp 729-738.

CloECKaert, A., Zygmunt, M.S. & Guilloteau, L.A. 2002. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. *Vaccine* Vol. 20: Pp 1820-1822.

Cloekaert Axel, Vizcaíno Nieves, Paquet Jean-Yves, Bowden Raúl, Elzer Philip.2002. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. Veterinary microbiology Vol. 90: Pp 229-245.