752.3

GENERALIDADES EN BRUCELOSIS BOVINA Y CONTROL

Germán I. Mendoza Puche. MVZ.

TAXONOMIA DEL GENERO BRUCELLA

En el año 1920 se estableció el género Brucella con las especies B. melitensis y B. abortus. Posteriormente en 1963 se añadió B. Suis, más tarde B. neotomae, B. ovis y B. canis.

Las B. abortus, B. suis, B. melitensis y B. neotomae son consideradas como especies clásicas mientras la B. ovis y B. canis son mutante, pero se les considera un ancestro común para todos los biotipos.

El miembro del género más capacitado para desempeñar el papel es la B. abortus biotipo 2 debido a que las demandas ambientales son las más estrictas de todas. A partir del anterior biotipo se derivan los demás biotipos de b. abortus debido a la pérdida progresiva en los requerimientos y demandas medio ambientales y en su patogenicidad. Considerando desde luego el biotipo 5 como el final de la linea evolucionaria. A su vez la B. melitensis se considera derivada de este último biotipo de B. abortus.

La B. suis se asemeja a los primeros pasos de derivación de B. neotomae y los biotipos de B. abortus. Por otra parte y según evidencias, la B. canis es una especie que parece ser derivada de la B. suis biotipo 3.

La B. ovis es considerada como mutante de la B. abortus biotipo 2 ocasionada por la influencia de hormonas esteroides.

Existe la tendencia de cambiar la nomenclatura del género Brucella pero la idea no ha sido bien recibida entre los investigadores.

La **Brucelosis** es una enfermedad de características zoonóticas y de repercución socioeconómica, que afecta principalmente al ganado bovino, ovino, caprino, porcino y equinos. En los animales causa aborto, aumento de mortalidad perinatal e infertilidad existiendo diversas vías de transmisión intra e interespecíficas, el hombre contrae la enfermedad por contacto directo, durante el manejo de animales, o por ingestión de productos lacteos frescos y contaminados.

El diagnóstico de la **Brucelosis** es en forma directa, por cultivo de la leche, tejido del animal e identificación de la bacteria, sin embargo, el aislamiento es muy dificil y laborioso, razón por la cual este se realiza por métodos indirectos con relación a la respuesta inmune, pero la multiplicidad de las metodologías desarrolladas para el diagnóstico, frente a animal reaccionante y a las condiciones sanitarias del hato, manifiestan en el profesional una serie de controversias en la interpretación de los resultados, que se debe unificar para hacer un mejor control de la enfermedad.

TOMA DE MUESTRAS PARA EXAMENES SEROLOGICOS

El diagnóstico de la brucelosis mediante la identificación de los anticuerpos producidas como respuesta a la infección o en 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; se aconseja tomar la sangre en tubos al vacio.

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 lo constituye el colocar las muestras al sol cuando se están 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 mas aséptica posible, los primeros chorros deben descartarse y esta debe recibirse en frascos o tubos estériles. Puede emplearse un recipiente para cada cuarto o relizarse una mezcla de los cuartos. Las muestras de semen se toman mediante masaje con electroeyaculador o vagina artificial pudiendo emplearse un preservativo para evitar la contaminación.

Todas estas muestras, al igual que el suero sanguineo deben conservarse en refrigeración hasta su recibo en el laboratorio. El plasma seminal debe conservarse congelado.

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO EN BRUCELOSIS BOVINA

En nuestro medio, el objetivo de las pruebas serológicas no es solamente identificar los animales que han estado en contacto con el agente, sino que es preciso poder diferenciar los animales que han sido vacunados y están sanos, de aquellos que habiendo sido vacunados o nó, estén infectados. Esto es debido a que la vacunación, no protege al ciento por ciento de los animales.

La diferenciación entre infectados y vacunados, se intenta realizar interpretando las pruebas serológicas existente en función de tipo de inmunoglobulina, el antígeno empleado y el estado del animal, tanto en los animales infectados como en los vacunados con cepa 19, la respuesta humoral incluye anticuerpos IgM e IgG.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN PLACA

Como su nombre lo indica, ésta técnica tiene la ventaja de requerir poco tiempo para su realización, además de ser económica, se pueden procesar muchos sueros en el mismo día. Sin embargo, es una técnica sujeta a errores del operador por lo que en programas de erradicación, diagnóstico en humanos o en actividades de investigación es poco recomendable. Esta prueba es más aconsejable para exámenes en los se requiere expedir certificados de movilización de animales o como técnica de muestreo en masa, pero su sensibilidad y especificidad son bajas. Una modificación empleando antígeno buferado (pH 3.6) sería recomendable.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN LENTA O EN TUBO

En comparación con la prueba rápida o en placa, ésta es una técnica más eficiente porque está sujeta a menos errores de caracter humano y técnico.

No obstante, algunos investigadores encontraron que la prueba no identificaba el 39% de los bovinos bacteriológicamente positivos y alertaron sobre la falta de sensibilidad del método, especialmente en áreas con tasa de muy baja infección y en hatos problema; además puede dar reacción negativa en casos crónicos y no se justifica emplearla en lugares donde la vacunación con cepa 19 es extensa.

Sin embargo, la utilización de dos pruebas de seroaglutinación lenta practicada a todos los animales de rebaño infectados con un intervalo de 30 a 60 días, permite identificar 99.5% de los animales infectados.

Ahora bien, en ciertos niveles de los programas de control de la infección por B. abortus, cuando la prevalencia se ha reducido, las reacciones no específicas adquieren importancia diagnóstica. Se ha demostrado que una gran proporción de reacciones de aglutinación en tubo, positivas a Brucela, dadas por sueros de animales no infectados, son sensibles a la acción del EDTA. Se cree que estos sueros contienen moléculas de IgM que causan aglutinación del antígeno de B. abortus en forma no inmune, básicamente por unión a través de la región Fc. Esta unión inespecífica es inhibida por quelantes catiónicos divalentes como el EDTA estructuralmente parecidos, mientras que la unión inmune específica de la región Fab de la IgM no se afecta.

Debido a la necesidad de tratamientos del antígeno con EDTA, esta metodología se recomienda sólo para situaciones especiales de duda cuando la prevalencia en el hato es muy baja.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN CON ANTÍGENO ROSA DE BENGALA (RB)

Las pruebas de la tarjeta, con atígeno tamponado y coloreado con rosa de bengala comprenden un procedimiento cualitativo y rápido de aglutinación macroscópica, el cual se efectúa con una sola dilución y establece principalmente los anticuerpos IgG1.

La aglutinación inespecífica de las brucelas lisas desaparece a pH 3.6, mientras que en estas condiciones se mantiene la actividad de los anticuerpos específicos razón por la cual se emplea en esta prueba de aglutinación antígeno celular teñido con el colorante RB, tamponado a pH 3.6. La técnica ha sido evaluada por diversos autores y ha demostrado elevada sensibilidad aunque requiere prueba confirmatoria debido a su especificidad relativamente baja. Se recomienda como sustituto de la prueba de tamiz, aglutinación rápida en plata, ya que esta última es considerada de poco valor diagnóstico en la actualidad.

La mayor utilidad de la técnica está en su empleo como prueba tamiz en campañas de erradicación. En zonas o fincas donde no se emplea la vacunación de bovinos es muy útil en el establecimiento de animales positivos; sin embargo, cuando se siguen programas de vacunación, existe la tendencia a

dar resultados falsos positivos debido a su mayor sensibilidad, siendo necesario la comprobación de los suelos positivos mediante otras técnicas.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN CON 2-MERCAPTOETANOL (2-ME)

Esta técnica se basa en la inactivación de la IgM por el 2-Mecarcaptoetanol sin que afecten las inmunoglobulinas G. Si la técnica del 2-ME es negativa y la de tubo positiva, significa que los anticuerpos son del tipo IgM. Si los resultados son positivos para las pruebas lenta o rápida y para el 2-ME significa que predominan las inmunoglobulinas G. Como las IgG se consideran indicativas de infección activa, la comprobación de estos anticuerpos es de mucha importancia y esta técnica se debe incorporar en el diagnóstico de rutina. A nivel del animal, ésta se debe emplear para procesar sueros sospechosos o positivos a las técnicas ordinarias de aglutinación con el fin de corroborar el estado de infección.

Otra ventaja de esta técnica es la de poder establecer la presencia de animales infectados crónicamente, con títulos bajos en las técnicas ordinarias de aglutinación. Los sueros que presentan inmunoglobulinas inespecíficas pueden ser descartados mediante el tratamietno con el reactivo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la respuesta serológica inicial en la infección está dada por anticuerpos IgM específicos los cuales son atacados por el 2-Mercaptoetanol con resultado negativo a la prueba. También es necesario señalar que en humanos, algunos pacientes en especial los que son tratados precozmente desarrollan anticuerpos IgG resistentes al 2-ME y en ellos la reacción es negativa al 2-ME pese a sufrir de enfermedad activa

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN CON RIVANOL

Esta técnica tiene el mismo fundamento que la Prueba de 2-ME y como es el de dejar en libertad las IgG para que reaccionen con el antígeno y su interpretación sigue el mismo criterio esbozado para la técnica de 2-M.E.

TÉCNICA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (FC)

Es la prueba considerada como referencia, debido a su sensibilidad y especificidad elevadas, pues dentro de las pruebas clásicas presenta el más

alto grado de sensibilidad analítica en la determinación de la IgG1. La IgG1 bovina fija complemento y en consecuencia, la prueba es de gran valor confirmatorio cuando se aplica al menos seis meses después de la vacunación en la edad juvenil. Lo anterior, debido a que también las IgM bovinas fijan complemento y entonces los animales recién vacunas serían positivos. En la realización de esta prueba puede utilizarse antígeno completo o LPS purificado.

La principal desventaja de esta técnica es su complejidad, ya que requiere de condiciones de laboratorio especiales y de un entrenamiento muy cuidadoso por parte de la persona que la va a realizar.

TÉCNICA DEL ANILLO EN LECHE

Esta técnica tiene como característica importante, el que pone de manifiesto las Igs presentes en la leche originadas en el sistema sanguineo, las cuales presentan un paso selectivo a la glándula mamaria en la época del parto al igual que las originadas en la misma glándula mamaria como respuesta a la infección local.

La técnica tiene la ventaja práctica de ser muy sencilla y rápida. Puede realizarse además en muestras tomadas en recipientes con leche procedentes de uno o varios animales, en la leche de cada cuarto o en una mezcla de los diferentes cuartos. Al realizarse en recipientes con leche procedente de varios animales, es necesario examinar posteriormente, en caso de positividad, cada una de las vacas para identificar las reaccionantes. En estas condiciones, la técnica repetida con un intervalo de 90 días provee una eficiencia superior al 95% para localizar los hatos infectados. También se tiene la información de que el 97% de los hatos con tres puebas negativas pueden considerarse libres de la infección. Se ha calculado además que la probabilidad de obtener una prueba de anillo positivo mezclando leche de 25 vacas de las cuales solo dos son reaccionantes a la seroaglutinación, es del 96% y cuando hay tres vacas positivas es del 99%.

TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)

Las técnicas de inmunoprecipitación han sido empleadas para estudiar nuevos antígenos. Estas han incluído mezclas complejas de antígenos, así como antígenos seleccionados como el poli-B y el A2. Las principales ventajas diagnósticas de estas técnicas son: 1. La determinación rápida de animales que están eliminando activamente brucela con la técnica IDR con antígeno Poli-B y 2. La demostración de respuesta a antígenos diferentes al LPS, lo cual provee evidencia diagnóstica adicional. La presencia de anticuerpos precipitantes a estos antígenos puede indicar infección activa reciente y es consistente con su aparción tardía y regresión temprana luego de vacunación con cepa viva.

La prueba empleada el antígeno poli-B o hapteno nativo (HN) extraído de la B. melitensis, hoy más conocido como cadena-O la cual al ser evaluada ha demostrado ser específica en la diferenciación entre animales vacunados e infectados. Basados en la reactividad del polisacárido de la cadena-O en la prueba de inmunodifusión radial, puede también proponerse que los epítopes inmunodominantes pueden ser univalentes, ocurriendo posiblemente en la porción terminal de la cadena y son incapaces de participar en una reacción de precipitación. En situaciones desfavorables, como vacunación de adultos con cepa 19, su especificidad puede ser superior a la fijación del complemento, pero las infecciones persistentes de nuevo complican el diagnóstico.

TÉCNICA DE ELISA

A causa de su sensibilidad extrema, relativa sencillez, seguridad para el empleo de rutina y estabilidad de los reactivos utilizados, las técnicas inmunoenzimáticas presentan también grandes ventajas para el diagnóstico de brucelosis. Son múltiples las publicaciones existentes sobre la explicación de algún tipo de **ELISA** a esta enfermedad. Como aplicación al diagnóstico serológico, la **ELISA** indirecta

es la que más ventajas prácticas ha presentado tanto para determinación de anticuerpos séricos como en leche. Evidentemente, el antígeno empleado es determinante en la funcionalidad de la prueba y con fines diagnósticos se considera que el LPS parece ser el más indicado dada su inmunogenicidad y su excelente capacidad de adsorción al poliestireno. La utilización de anticuerpos monoclonales a IgG1 bovina aaumenta aún más su especificidad diagnóstica sin comprometer su elevada sensibilidad.

En la búsqueda de la diferenciación entre animales infectados y vacunados, se ha utilizado la **ELISA** competitiva con antígeno polisacárido (cadena-O) y anticuerpo monoclonal a un epítope lineal específico de la cadena -O. Bundle y colaboradores, 1984, han sugerido que existen epítopes únicos y comúnes sobre la respectiva cadena -O, algunos de los cuales son univalentes mientras que otros son multivalentes. Se cree que los multivalentes residen a lo largo del polímero, mientras que los univalentes están localizados en la porción terminal de la cadena. Un anticuerpo monoclonal en particular (YsT9-2), el cual fue obtenido contra Y.enterocolitica 0:9 es capaz de reaccionar con la cadena O purificada de Y.enteropolitica, B. abortus y B. mellitensis. Se piensa que esta monoclonal tiene especificidad por un epítope común multivalente definido por una serie corta de enlaces 1,2 descritos por la B. melitensis.

Como se ha anotado anteriormente, el LPS es el antígeno inmunodominante en la respuesta tanto a cepas de campo como vacunales de Cepa 19; sinembargo, este epítope común multivalente parece ser débilmente inmunogénico y los anticuerpos a este epítope solamente son producidos en cantidades apreciables

luego de una exposición prolongada o crónica de una dosis tal como la presentada bajo la inspección de campo. Ganado vacunado parece producir tan sólo respuesta transitoria a este epítope, excepto bajo circunstancias en la que se ha establecido la infección persistente por cepa vacunal. La prueba competitiva ofrece varias ventajas, entre ellas, es más rápida, no requiere conjugado antiespecie, es fácil de automatizar y es capaz de diferenciar por lo menos el 85% de los animales vacunados con respecto a infectados.

Como regla general se debe tener en cuenta que para el diagnóstico de la brucelosis es necesario hacer una prueba rápida, económica y de alta sensibilidad como prueba tamiz y utilizar una o más pruebas adicionales como confirmatorias de los animales POSITIVOS.

EFICIENCIA DIAGNOSTICA Y CORRELACION DE LAS TECNICAS SEROLOGICAS

La respuesta inmune al ser determinada por una técnica de laboratorio para brucela, está influenciada por muchos factores los cuales incluyen el prolongado y variable período de incubación durante el cual la prueba serológica es negativa, 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 pueden ocurrir reacciones falsas positivas y negativas, y a que su presentación varía de acuerdo con el valor diagnóstico mínimo establecido para una prueba en particular.

La comparación entre las diferentes técnicas ha sido realizada por diferentes investigadores con el fin de evaluar la utilidad de cada una de ellas en el diagnóstico de la brucelosis.

Como requisito previo a la utilización de una nueva técnica en un programa de diagnóstico, se requiere que la sensibilidad y especicifidad sea comparada con pruebas estandar. 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 a 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 a 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 especificidad son características constantes de una prueba, estos dos parámetros, pueden variar dentro de la población y más cambiarán con la prevalencia a medida que avanza el control o la eliminación de la enfermedad.

Con respecto a pruebas convencionales y como ejemplo de lo anterior, uno de los estudios más conocidos es el de Stemshorn y col., en el cual se compararon técnicas de aglutinación y fijación del complemento con respecto a especificidad y sensibilidad relativa al diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. En una muestra de 167 cultivos positivos, la sensibilidades de las pruebas fueron: fijación del complemento 79.0%; técnica en placa con antígeno buferado 75.4; técnica con antígeno rosa de bengala 74.9%; prueba de la tarjeta 74.3%, prueba de aglutinación en placa 73.1%; prueba de aglutinación en tubo 68.9% y técnica de aglutinación con 2-ME 59.9%. Todas las técnicas combinadas detectarian solo el 82% de los animales infectados.

En el mismo estudio, la especificidad en 1051 sueros de hatos libres de brucelosis fue la siguiente: técnica en placa con antígeno buferado 98.9%; técnica de aglutinación en tubo 99.2%; técnica de aglutinación en placa 99.3; técnica de aglutinación con 2-ME 99.8%. En este estudio las técnicas de rosa de bengala, prueba de la tarjeta y de fijación del complemento clasificaron correctamente todos los sueros negativos. Por lo anterior, se recomienda el empleo de la técnica con antígeno buferado como prueba de tamiz, ya que tiene alta especificidad y sensibilidad y la fijación del complemento como técnica confirmatoria.

Posteriormente, han sido mUltiples las comparaciones de técnicas realizadas, las cuales incluyen a las técnicas inmunoenzimáticas, recomendando la mayoría de ellas, la utilización de la **ELISA** indirecta monoclonal como prueba tamiz de elevada sensibilidad y especificidad con respecto a fijación de complemento.

DIAGNOSTICO SEROLOGICO INDIVIDUAL

El diagnóstico individual correcto basado únicamente en pruebas serológicas, motivo por el cual para poder llegar a una conclusión, en ocasiones es necesario tener en cuenta varios criterios.

Para facilitar la interpretación de este tipo de diagnóstico, se pueden suponer varias situaciones de común ocuerrencia en la práctica: en primer lugar, se consideran arbitrariamente como terneras, a las hembras desde el nacimiento hasta aproximadamente los nueve meses de edad; novillas, de los 9 a los 22 meses y como vacas, a las hembras que han tenido cría.

Como regla general, en brucelosis para la interpretación de las pruebas de aglutinación en animales adultos, es necesario saber previamente si se trata de animales vacunados o no a la edad recomendada, es decir, entre los tres y los nueve meses de edad. Por ejemplo: con un título de 1:100 ó más (Tabla 1), no vacunado o con historia de vacunación desconocida, se debe considerar como infectado, para evitar dar una interpretación errónea a aquellos animales infectados que se vacunan para justificar su positividad.

Si la conclusión es que se trata de un animal sospechoso se procede de la forma siguiente: se practica una prueba suplementaria que determine IgG1 como es el caso de la prueba de 2-Mercaptoetanol, de rivanol o de fijación de complemento. Si esta prueba da resultado positivo, se considera que el animal tiene una infección activa; si el resultado es negativo, se recomienda tomar una segunda muesta pasados por lo menos quince días y se repiten los exámenes. Si los títulos de aglutinación disminuyen y la prueba complementaria permanece negativa, el animal se considera negativo, por el contrario si los títulos aumentan o permanecen constantes y la prueba complementaria determina títulos de anticuerpos el animal puede considerarse infectado. En la actualidad se considera que un animal está infectado, cuando presenta un resultado positivo en pruebas de ELISA indirecta y cuando éste es confirmado con ELISA competitiva o IDR. En general, las pruebas convencionales podrían ser remplazadas por una aglutinación con rosa de bengala y complementada por las pruebas de ELISA e IDR, lo cual proporcionaría un diagnóstico más sensible y específico.

TABLA 1. INTERPRETACION DE LAS REACCIONES DE AGLUTINACION EN LAS PRUEBAS DE PLACA Y TUBO PARA DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA EN ANIMALES ADULTOS

TITULOS DE ANTICUERPOS	INTERPRETACION
	1 :25
	1 :50
	1 :00
	1 :200
	No vacunado
Vacunado	
	-
	-
	-
	-

	Negativo
Negativo	
	1*
	-
	-
	-
	Negativo
Negativo	
	+
	-
	-
	-
	Negativo
Negativo	
	+
	1*
	-
	-
	Sospechoso
	Negativo
	+
	+
	-
	-
	Sospechoso
Negativo	
	+
	+
	1*
	-
	Sospechoso
Sospechoso	
	+
	+
	+
	+
	Positivo
Sospechoso	
	+
	+
	+
	1*

	Positivo
Sospechoso	
	+
	+
	+
	+
	Positivo
Sospechoso	

1* Reacción imcompleta.

DIAGNOSTICO EN TERNERAS HIJAS DE VACAS INFECTADAS

Una ternera hija de una vaca infectada al ingerir brucelas con el calostro se convierte en un animal infectado y serológicamente positivo.

Los anticuerpos calostrales de la ternera caen a niveles no determinables aproximadamente en seis meses y la infección es eliminada del organismo en un tiempo aproximadamente similar, de tal manera que al llegar a la edad del primer servicio, la novilla debe estar serológicamente negativa y susceptible a la enfermedad. Sin embargo, en algunos casos, las terneras, hijas de vacas infectadas, desarrollan una infección latente con niveles no determinables de anticuerpos, pero que al llegar a su primera gestación abortan y se comportan como si recién hubieran adquirido la infección. Estos animales, son los responsables de los hatos problemas, en los cuales a pesar de las medidas de control empleadas continúan apareciendo casos positivos de la enfermedad. El porcentaje de animales con infecciones latentes es aproximadamente del 2.5%.

Las pruebas inmunoenzimáticas permiten establecer más rápidamente situaciones como las descritas y son por consiguiente altamente recomendables.

DIAGNOSTICO DE TERNERAS HIJAS DE VACAS SANAS

Estos animales nacen sin oportunidad de infectarse en forma intrauterina, no reciben anticuerpos calostrales y por lo tanto son susceptibles a la infección debiendo por consiguiente protegerse mediante la vacunación. Las pruebas serológicas en estos animales son usualmente negativas.

DIAGNOSTICO EN TERNERAS INFECTADAS O VACUNADAS

Si la ternera recibe una infección de campo o es vacunada, los gérmenes pueden ser eliminados y al llegar a los 22 meses los anticuerpos aglutinantes no son determinables; sin embargo, la novilla conserva todos sus mecanismos de resistencia celular a la infección. Si este animal recibe varias vacunaciones hay tendencia a que los títulos persistan mayor tiempo. Lo mismo si además de la vacuna recibe infecciones de campo. Lógicamente, existen casos en los cuales el nivel de anticuerpos

desaparece antes o se prolonga después del tiempo antes mencionado. Por lo regular, las pruebas ordinaraias de aglutinación dan títulos bajos acompañados de pruebas complementarias negativas.

Algunas experiencias indican que las pruebas de RB e IDR, se hacen negativas aproximadamente a los tres meses. Sin embargo, la técnica de ELISA por su mayor sensibilidad puede dar como positivo algunos animales, pero al hacer la técnica competitiva estos se descartan. La IDR no da reacción positiva en ninguna etapa siempre y cuando se trate de animales de hatos no infectados y vacunados a la edad reglamentaria.

DIAGNOSTICO EN VACAS INFECTADAS O VACUNADAS

Después de los 10 meses de edad y mientras más adulto sea el animal, la infección de campo o vacunal tiende a persistir indefinidamente, esto provoca un desafío antigénico permanente con la producción contínua de anticuerpos especialmente inmunoglobulinas G1, lo cual se traduce en pruebas serológicas positivas. En el caso que ocurran reinfecciones o revacunaciones o una combinación de éstas, la persistencia de anticuerpos tiende a ser mayor y los títulos serológicos a ser más altos. Además, los microorganismos tienden a eliminarse a través de la leche, la cual se convierte en fuente de contagio especialmente para el hombre. Estas son razones por las cuales no deben vacunarse los animales adultos.

En un hato se encuentran animales reaccionantes y con sintomatología de tipo reproductivo con mortalidad embrionaria, abortos, metritis, retención de placenta, mastitis, etc. puede pensarse entonces que el origen de estos síntomas obedece a una infección por Brucella abortus.

Si no se encuentran síntomas como los mencionados anteriormente, el origen de los títulos serológicos puede ser atribuídos a una respuesta post-vacunal o a una reacción anamnésica, por infección de campo o vacunal.

Em ambas situaciones, debe intentarse el aislamiento del microorganismo, con el fin de determinar si se trata de una infección por cepa vacunal o de campo. La definición de situaciones como la mencionada podrá ser proporcionada por la utilización de serologías inmunoenzimáticas; ELISA indirecta y competitiva y pruebas de inmunodifusión radial, siendo en especial éstas dos últimas las más eficientes para diferenciar entre vacunado e infectado.

INTERPRETACION DE PRUEBAS SEROLOGICAS EN CASOS COLECTIVOS

Para una mejor interpretación de las pruebas serológicas debe realizarse un análisis de los resultados encontrados a nivel de hato pero en grupos de animales que hayan tenido el mismo manejo. Este análisis no se puede realizar con bovinos de diverso origen los cuales han sido sometidos a planes de vacunación desconocidos o diferentes.

En la Tabla 2, se presentan dos ejemplos de resultados serológicos probables en un hato libre de la enfermedad y en un hato donde existe la infección.

Este caso hace relación a un hato en que los animales presentan títulos de aglutinación bajos o ausentes y pruebas de Rivanol o 2-ME negativas.

Tratándose de un grupo homogéneo de animales adultos lo más presumible es que los niveles de anticuerpos encontrados sean títulos residuales post-vacunales. Las pruebas de Rivanol o 2-ME indican que no hay infección activa e igualmente lo indicarán las pruebas de IDR y ELISA. El bovino que presenta un título por aglutinación lenta de 1:100, puede considerarse sospechoso y debe ser reexaminado posteriormente, preferiblemente por IDR o ELISA, si no se puede clarificar su situación es mejor eliminarlo.

TABLA 2. RESULTADOS SEROLOGICOS PROBABLES EN UNA FINCA CON DIEZ VACAS LIBRES DE BRUCELOSIS Y EN UNA FINCA SIMILAR DONDE EXISTE LA INFECCION

FINCA "A" (LIBRE)	FINCA "B" (INFECTADA)
Animal Prueba de Aglutinación	Animal Prueba de Aglutinación
Prueba de Rivanol ó 2-ME	Prueba de Rivanol ó 2-ME
	1
	1 :25
	Negativa
	1
	1 :25
Negativa	
	2
	-
	Negativa
	2
	1 :100
Positiva	
	3
FINCA "A" (LIBRE)	FINCA "B" (INFECTADA)
Animal Prueba de Aglutinación	Animal Prueba de Aglutinación
Prueba de Rivanol ó 2-ME	Prueba de Rivanol ó 2-ME
	-
	Negativa
	3
	1 :50
	Negativa
	4
	1 :50
	Negativa
	4
	-
Negativa	

	5 1 :25 Negativa	
	5 1 :25	Negativa
	6 - Negativa	
	6 -	Negativa
	7 - Negativa	
	7 1 :200	Positiva
	8 - Negativa	
	8 1 :100	Positiva
	9 1 :10 Negativa	
	9 1 :50	Negativa
	10 - Negativa	
	10 1 :20	Positiva

FINCA A.

En este ejemplo, es necesario considerar además en relación a los aspectos clínicos lo siguiente: Si en la finca o en el hato existe una sintomatología evidente de problemas reproductivos tales como mortalidad embrionaria, abortos, retención de placenta, metritis, ètc., evidentemente es necesario buscar otra etiología del problema, ya que con la serología presentada en esta situación no debe manifestarse problemas reproductivos en lo que a brucelosis se refiere.

FINCA B

En este hato se encuentran animales reaccionates a las pruebas ordinarias y además presentan pruebas complementarias de Rivanol o 2-ME positivas. En este caso, la técnica de ELISA podría detectar más animales positivos al igual que la de IDR y además de las reacciones serológicas se presentan abortos, repetición de servicos, metritis, etc., puede pensarse con seguridad en brucelosis. Si no existe sintomatología evidente, puede suponerse que hubo una vacunación o revacunación, o que los animales están en período de incubación durante el cual aún no se han presentado pérdidas gestacionales. En este último caso, inclusive los animales con títulos serológicamente negativos deben considerarse como positivos y las serologías confirmativas deberán realizarse en corto tiempo para confirmar la infección por el aumento de títulos.

DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE BRUCELOSIS EN TOROS

En toros, la interpretación de las pruebas de seoaglutinación se realiza siguiendo las pautas establecidas para las hembras ya que el Comité mixto FAO-OMS de expertos en brucelosis (FAO/OMS, 1986) no hace distinción entre machos y hembras para la interpretación de las pruebas de seroaglutinación.

Además, en los toros para un corecto diagnóstico deben practicarse exámenes bacteriológicos del semen y de espermoaglutinación, los cuales deben ser negativos.

Los toros que den títulos en la seroaglutinación, deben ser examinados repetidamente, a las dos y cuatro semanas utilizando todo el grupo de exámenes posibles e incluyendo el bacteriológico.

EVALUACION DEL DIAGNOSTICO SEROLOGICO CON RELACION AL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO

En los bovinos, los porcentajes de fertilización se encuentran alrededor del 90%, mientras que el promedio de partos esta entre el 50% y 60%. La muerte embrionaria (dentro de los 20 días post-fertilización) parece ser responsable del 75-80% de todas las pérdidas gestacionales, en tanto que el 10%-15% corresponde hasta el momento de la implantación y el 5-8% de las pérdidas restantes se presenta entre la implantación y el nacimiento del ternero.

Dentro del grupo de entidades infecciosas responsables de estas pérdidas gestacionales figura la Brucella abortus, razón por la cual la evaluación serológica de la enfermedad debe efectuarse en forma paralela al diagnóstico del comportamiento reproductivo de los animales.

Usualmente, se considera al aborto o a sus consecuencias como el único síntoma atribuíble a la enfermedad. Sin embargo, las vacas, por lo general abortan una sola vez, si bien en las gestaciones posteriores hay una nueva invasión del útero y se excretan microorganismos con las membranas y líquidos. En las vacas preñadas expuestas a cantidades pequeñas de microorganismos, pueden producirse infecciones inmunizantes autolimitantes o el animal puede convertirse en portador latente.

En un hato infectado, además de producirse una reducción de un 20% en el potencial de producción de leche, el 15% de las vacas reactoras abortan y una de cada cinco vacas reaccionantes debe ser reemplazada por infertilidad temporal o permanente.

Como se mencionó anteriormente en un hato que presente animales reaccionantes no siempre se va a encontrar sintomatología clínica de la enfermedad, debido a que ésta puede ser por ejemplo, el resultado de una vacunación de adultos o de una infección inmunizante autolimitante. Sin embargo, el pronóstico de la situación cambia completamente si además existe un conjunto de síntomas que evidencian una infección activa de campo.

Por otra parte, el resultado de un programa de control debe evaluarse teniendo también en cuenta la medición de diferentes parámetros reproductivos antes y después de las medidas establecidas.

Existe una gan cantidad de indicadores de la situación reproductiva de los animales, algunos de los cuales son más complejos que otros, dependiendo de la calidad de los registros que se llevan en la finca. El índice de más fácil evaluación es el intervalo entre partos o de días abiertos, el cual se puede calcular en forma individual, obteniéndose así el promedio para el hato.

Cuando existe problema reproductivo atribuible a brucelosis puede observarse que el promedio de días abiertos aumenta a medida que aumenta el título de los animales. Los animales que presentan un promedio de días abiertos mayor presentan a su vez un promedio mayor de título serológico y a medida que el control de la enfermedad va teniendo éxito estas cifras se reducen, lógicamente si no existe un problema diferente concomitante.

DIAGNOSTICO SEROLOGICO EN BRUCELOSIS CON RELACION A OTROS FACTORES DE INFERTILIDAD

Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico serológico en brucelosis es un proceso completo que requiere la valoración de múltiples variables; sin embargo, es necesario tener en cuenta otros factores responsables de infertilidad en los bovinos, los cuales pueden influir en el comportamiento serológico de los animales a las diferentes pruebas de diagnóstico sobre todo en los programas de control de la enfermedad.

La supervivencia del ternero depende de la manera como el feto completa la organogénesis funcional necesaria para la vida extrauterina y de la forma como afronta el conjunto de factores responsables de mortalidad embrionaria y gestacional.

Dentro de éstos se mencionan factores genéticos, endrocrinos, estresantes, factores de edad traumáticos, tóxicos, nutricionales, y factores de manejo e infecciosos ocupando la brucelosis un papel importante en esta problemática.

Por lo tanto, el enfoque que se asuma con relación al diagnóstico y control de la enfermedad depende de los factores que pueden influir en la patogenésis de la enfermedad y sobre todo en el éxito que se espera de un mecanismo de control. Así por ejemplo se menciona que bajos niveles nutricionales afectan directamente la función ovárica, reduciendo la capacidad de respuesta a los estímulos

hormonales, y limitando la síntesis de esteroides por el cuerpo lúteo. Por otra parte, la sobrealimentación y el exceso de proteín en la dieta pueden afectar la reproducción debido a alterciones de la función hepática, lo cual produce una mayor predisposición a la endometritis post parto.

Existen otras enfermedades como la diarrea viral bovina y la leucemia, en las que entre otras características, los virus presentan predilección para multiplicarse y lesionar el tejido linforeticular, lo cual puede resultar en una supresión significativa de los mecanismos de defensa del animal, tanto específicos como inespecíficos, hacia otros microorganismos como la brucela, los cuales bajo estas circunstancias adquirirían una patogenicidad que *puede ser grave en un momento determinado*. Así mismo, otras investigaciones sugieren que la liberación de endotoxinas por bacterias Gram negativas inducen un incremento en las concentraciones de cortisol durante el período preovulataorio del ciclo estral previniendo la ovulación por un bloqueo de la liberación de hormona luteinizante preovulatoria.

Los ejemplos anteriores, ilustran la responsabilidad que tienen otros factores en el desarrollo de patogénesis de la brucelosis, lo cual repercute en el diagnóstico serológico de esta entidad ya que predispone al animal a presentar variaciones en los niveles de anticuerpos de acuerdo con el grado en que se manifiestan en un cuerpo de animales o en forma individual. Por estas razones, es necesario tener en cuenta estos factores para una correcta interpretación del diagnóstico y un pronóstico acertadó de las medidas o campañas de control de la enfermedad.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL Y ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN COLOMBIA

Una gran cantidad de países afectados por la brucelosis consideran necesario organizar sistemas de lucha para enfrentar esta enfermedad que les produce pérdidas económicas y afecta su población humana.

La brucelosis está dispersa en América Latina con estimativos anuales de 20.000 personas enfermas económicamente activas, y de pérdidas directas en la especie bovina por más de 270 millones de dólares cad año.

Esta zoonosis genera pérdidas directas por abortos, ampliación de intervalo entre partos, retención placentaria, disminución en la producción de leche, costos adicionales por reemplazos, reducción de índices productivos, y por los costos indirectos generados por los programas de control.

Existen análisis de costo/beneficio que demostraron la rentabilidad de los programas de reducción oerradicación de la enfermedad, y Canadá por ejemplo, al final de sus acciones de eradicación, por cada dólar invertido redutuaba cinco dólares como beneficio.

Se ha desarrollado tecnología para reducir la prevalencia de la enfermedad, y aún, erradicarla combinando diferentes estrategias, tal como ocurrió en Cuba que logró su eliminación y en Uruguay que después de 20 años de vacunación redujo su prevalencia a un nivel tal (0.5%), que puede pensar en la erradicación.

Todo programa debe tener en cuenta que los procesos son largos y costosos y que por ejemplo Canadá invirtió 29 años y 260 millones de dólares en su erradicación, Holanda la elimin´+o en 7 años a un costo de 160 millones de dólares y Estados Unidos, iniciando su trabajo en 1918, con prevalencias de 0.00062% tiene prevista la erradicación para 1997, con un costo de 58 millones de dólares, incluyendo vacunación de terneras en algunas áreas.

El control y la erradicación de la brucelosis debe obedecer a la necesidad sentida del estado y de los ganaderos, ser de carácter regional amparado en programas nacionales basados en la coordinación intersectorial, en la participación de los ganaderos y la comunidad y en la disposición de recursos económicos; igualmente, debe estar bajo la responsabilidad del ejercicio privado de la veterinaria y de los productores, coordinadores y supervisados por autoridades oficiales.

Los programas de lecha contra la brucelosis están fundamentados en el conocimiento de sus epidemiología, de su impacato económico, en la adopción de tecnología y en la decisión de enfrentarla en forma organizada, en períodos de tiempo determinados, con evaluaciones permanentes y con ajuste basados en la información generada.

EL PROGRAMA EN COLOMBIA

En Colombia, la enfermedad se diagnosticó inicialmente en 1924 en sueros bovinos procedentes de Cundinamarca analizados en los Estados Unidos, el rpimer aislamiento del germen (Instituto Samper Martinez) se hizo en 1927 y las primeras serologías en 1928.

En la especie humana, las primeras serologías positivas se registraron en operarios del matadero de Bogotá en 1935 y se hicieron aislamiento de **B. abortus** en funcionarios de mataderos y de explotaciones del Valle del Cauca en 1973 y permanentemente el Sistema de Información de Sanidad Animal, registra serologías positivas en diferentes regiones del país.

La **B. suis** fue aislada en 1968 y además, hay serologías positivas a brucelosis bovina en búfalos, equinos, ovinos, caninos y cérvidos lo cual refleja la gravedad del problema. En Colombia no se ha aislado **B. melitensis.**

En 1949 el Ministyerio de Agricultura y Ganadería (Resolución 0750), implementó las primeras medidas para el control de erradicación de la brucelosis; en 1970, se dictaron normas sanitarias (Resolución 673) que se complementaron en 1973 con un Manual de Normas y Procedimientos; en 1977 se modificó parcialmente el anterior mandato (Resolución 261) y en 1988, el Ministerio de Agricultura (Resolución 0354), confirma al Instituto Colombiano Agropecuario ICA, para organizar, dirigir y ejecutar el Programa; esta última legislación ministerial fue reglamentada por el ICA (Resolución 3193) y las dos rigen actualmente las acciones del programa.

El programa está planteado para luchar contra la enfermedad en los bovinos porque la información esxistente hace pensar que la B. abortus es la que con mayor frecuencia se presenta y la que más pérdidas causa.

OBJETIVOS

Lograr el control de la enfermedad con miras a la erradicación, a la disminución de pérdidas económicas y a la reducción del riesgo para la especie humana.

ESTRATEGIAS DEL PROGRAMA

Las activiades están fundamentadas e la importancia gandera de las diferentes áreas, en los sistemas de explotación, en la densidad de población, en los flujos de movilización y en la clasificación cualitativa del paáis en zonas de prevalencia alta, ,edia y baja, con base en la información generada por los centros de diagnóstico y algunos estudios puntuales.

METODOLOGIAS DE TRABAJO A NIVEL DE CAMPO

Las actividades que se desarrollan a nivel de campo tienden a reducir los factores de riesgo de presencia y difusión de la enfermedad y en general son los utilizados por los países que tienen programas de control.

ZONIFICACION DE AREAS Y ACCIONES DEL PROGRAMA

ZONAS DE PREVALENCIA BAJA: 0 A 3% DE REACTORES

Departamentos: Meta, Quindio, Caldas, Cauca, Tolima, Antioquia, Chocoó y Casanare.

Acciones: Vacunación de terneras, eliminación sistemática y controlada de reactores para certificación de hatos y áreas libres.

ZONAS DE PREVALENCIA MEDIA: 3 A 5 % DE REACTORES

Departamentos: Huila, Riralda, Valle, Norte de Santander, Atlántico, Caquetá, y Santander.

Acciones: Vacunación obligatoria y sistemática de terneras y reducción de los índices de afección, mediante la eliminación de reactores.

ZONAS DE PREVALENCIA ALTA : MAYOR DE 5 % DE REACTORES

Departamentos: Bolívar, Boyacá, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, La Guajira, Magdalena, Nariño, Sucre y Arauca.

Acciones: Vacunación obligatoria y masiva de terneras y organización de programas de control a nivel de hato.

DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD

En Colombia el diagnóstaico de la enfermedad se ha hecho con base en las pruebas de Aglutinación Rápida en Placa, Lenta en Tubo y espóradicamente con la del Anillo en Leche, todas con baja sensibilidad y especificidad; como prueba complementaria s eha utilizado la de Aglutinación con 2-Mercapto-Etanol ; actualmente con la implementación y validación de la prueba de Antígeno Buferado (Rosa de Bengala) se inicia su uso a nivel de campo.

CAPACITACION DEL RECURSO HUMANO

El programa tiene recurso humano capacitado en aspectos de diagnóstico bacteriológico y serológico, manejo de muestras, interprtetación de resultados, metodologías de control y erradicación, epidemiología de la enfermedad y análisis y uso de la información generada.

VACUNACIÓN COMO MEDIDA PREVENTIVA

Por legislación nacional, el praograma solo autoriza la aplicación de vacuna a base de **B. abortus** cepa 19, en terneras entre 3 y 6 meses de edad, por una sola vez. Un estimativo de vacuna aplicada entre 1990 y 1991 indica que sólo se cubrió un bajo porcentaje de las terneras en edad de vacunar.

DECLARACION DE HATOS Y AREAS LIBRES

Esta actividad pretende la eliminación total de la enfermedad a nivel de predios y de áreas determindas y ha obtenido algunos logros a nivel de hatos pero no de áreas.

CONTROL DE MOVILIZACION DE ANIMALES

El objetivo de esta actividad es el evitar la difusión de la enfermedad y para esto exige solo el traslado de animales negativos a zonas en donde se desarrollan programas organizados de control y erradicación, a exposiciones ganaderas, a zonas de baja prevalencia, libres o negativas a brucelosis y a los mercados para exportación. Los animaleas importados no deben tener signos de la enfermedad, ser-sero negativos si son mayores de 20 meses, y acreditar certificado de vacunación entre 3 y 6 meses si son menores de esa edad. Cuando se importa semen, los toros donantes deben ser sero negativos y el semen negativo a las pruebas bacteriológicas,

DECOMISOS A NIVEL DE MATADEROS

En el sacrificio de animales positivos con destino al consumo humano, se deben decomisar fetos completos, úteros, glándulas mamarias, tertículos y los principales ganglios linfáticos.

CONVENIOS COOPERATIVOS

Existen convenios coperativos con Ecuador y Venezuela basicamente para la unificación de procedimientos de lucha, intercambio de información y evaluación anual de actividades.

VACUNACIÓN

El punto más importante en la investigación de una enfermedad infecciosa es la **prevención** de la *misma y la vacunación* de los huéspedes susceptibles es le mejor método empleado hasta ahora.

Desde el descubrimiento del agente etiológico de la Brucelosis en 1906 se ha buscado la manera de proteger animales contra la enfermedad.

El primer método recomendado fue el empleo de suspurimas de **B. abortus** inoculadas anteas del servicio. Este procedimiento lógicamente causaba la enfermedad en muchos animales.

Como consecuencia, la tendencia fue posteriormente desarrollar cepas de virulencia reducida para ser empleadas como vacunas o utilizar vacunas muertas que evitarían los problemas del empleo de cepas vivas.

Los avances en el conocimiento inmunológico y en la genética bacteriana ha suministrado nuevas perspectivas en el desarrollo de vacunas más seguras y efectivas.

Estos avances han permitido explorar las posibilidades para la elaboración de inmunógenos, insertando información genética de antígenas protectivos en vectores, y el desarrollo de mutantes genéticamente estables que eliminen en la práctica el problema de la revisión de virulencia de cepas vacunales atenuadas.

VACUNAS VIVAS

La primera vacuna viva fue creada en 1923 por John Buck, quien aisló la cepa de la leche de una vaca Jersey llamada Victors Lady Matilda. Esta cepa fue llamada cepa 19, que fue el número de la cepa de varias en las cuales estaban trabajando. Esta cepa fue dejada al medio ambiente por un año, después de lo cual quedó inactiva y estabilizada genéticamente.

Empleando esta cepa, se hicieron diversas investigaciones variando dosis y vías de inoculaciones demostrándose que este biológico suministra una inmunidad de larga duración y no revertía su virulencia. Con el fin de reducir los títulos persistentes, la dosis fue reducida paulatinamente y se

aplicación limitada a animales sexualmente inmaduros, sin embargo, poseía y posee muchas desventajas como son:

a. Anticuerpos residualeas en la leche y suero que complican la interpretación del diagnósatico.
b. Infección persistente en los animales vacunados.
c. El estigma de los animales de quedar como vacunados.
d. Infecciosidad para el hombre.
e. Restricciones para su empleo por la edad y sexo.
f. La dificultad en administrar dosis reducida.
g. Presentación ocasional de artritis y shock endotóxico.
h. Manejo muy cuidadoso para evgitar la aparición de variantes mucoides y de utilización de eritritol.

En 1929 McEwan, aisló una cepa, rotulada N° 45, de un bovino la cual encontró que era relativamente avirulente pero inducía protección en cobayos y que el pasaje 20 conserva estas características; por este motivo fue denominada cepa 45/20. Esta cepa era relativamente inestable y a pesar de sus ventajas relativas para ovinos y caprinos era patógena para los bovinos donde revertía a la forma mucosa.

En 1957 Elberg y Fance, reportaron el aislamienato de una forma lisa atenuada de **B. melitensis** llamada Cepa Rev 1, a partir de una población estreptomicina dependiente cultivada en un medio deficiente de antibiótico.

Esta vacuna ofreció buena protección, no presentaba reversión a formas virulentas aunque podía esporádicamente producir abortos, niveles de anticuerpos y ser excretada en leche. Comparativamente con la cepa 19, la cepa Rev 1 es mucho mejor inmunógeno para esta especie de lo que es la C 19. También es prometedora la utilización de esta vacuna en bovinos.

A partir de 1971 se empezaron a apalicar millones de dosis de **B. suis** biotipo 1 cepa 2 como vacuna oral para la prevención de brucelosis en ovejas, cabras, bovinos y cerdos en dosis de 5 - 50 x 10^9 UFC estimulando seroglutíninas y anticuerpos fijadores del complemento hasta por nueve meses y una duración de inmunidad de 4 - 5 años en ovejas. Extrañamente al inyectarla subcutánea o instramuscularmente producía aborto en ovejas y cabras.

Esta cepa (B. suis) es muy segura y solo esporádicamente se ha comprobado eliminación por la leche y descargas vaginales, y tan solo el 2.2% mostraba anticuerpos glutinantes postvacunales.

Desafortunadamente su empleo en bovinos no es tan seguro, ya que estudios han demostrado que esta cepa no protege bovinos frente a B. abortus ; ni que la C19 proteja a esta misna especie frente a la infección por B. suis.

En relación con las vacunas vivas se ha demostrado que las cepas homólogas de Brucella sp. son usualmente más protectoras que las cepas hetérologas dentro de una especie, pero en algunos casos las cepas hetérologas pueden inducir igual protección a la conferida por las homólogas.

Se ha propuesto la jerarquía inmunogénica de vacunas o cepas de campo para bovinos, cabras y ovejas ; B. melitensis (B. neotomae ò B. suis > B abortus. En cerdas la jerarquía inmunogénica es aprentemente B. suis ò B. mulitensis > B. abortus.

Se ha visto también que todas las cepas lisas son generalmente más protectivas que las cepas nucoides.

REQUISITOS DE BIOSEGURIDAD Y EFICACIA PARA LAS VACUNAS VIVAS DE BRUCELLA

a. No producir enfermedad en animales vacunados.
b. Prevenir la enfermedad en ambos sexos y en cualquie edad.
c. Prevenir aborto y esterilidad.
d. Suministrar protección a largo plazo contra la infección y el aborto con una sola dosis.
e. No producir anticuerpos persistentes que interfieran con el diagnóstico de infecciones de campo
f. No trasmitirse a otros animales en el caso de infecciones persistentes latrentes.
g. Ser biológicamente estables tanto invitro como invivo.
h. No ser patógenas para el hombre.
i. No contaminar leche, carne y productos derivados.
j. Ser susceptibles de crecimiento abundante mediante tecnologías de fermentación.

Hasta el momento ninguna de las vacunas desarrolladas cumplen en forma absoluta con todos los requisitos mencionados.

VACUNAS MUERTAS

Solo hasta la introducción de adjunvantes oleosos por Freund en 1944, todos los intentos realizados para la producción de vacunas muertas resultaron infructuosos.

Con el nuevo concepto adjuvanticida (capacidad de los cnstituyentes bacterianos suspendidos en una mezcla de agua-aceite de aumentar tanto la respuesta humoral como celular) se pudieron desarrollar dos tipos de vacuna contra la brucelosis.

La cepa rugosa 45/20 empleada in vivo a pesar de no ser aglutinogénica tenía, el inconveniente que podía recuperar su patogenicidad en animales vacunados. Los ensayos realizados en esta cepa muerta por calor, no resistieron la competencia de la cepa 19 en cuanto a niveles de protección y otros problemas en relación principalmente con el manejo de los animales.

Se hicieron otros ensayos por parte de Renoux, con una cepa de **B. militensis** H38 muerta por formalina. Esta vacuna fue utilizada primero en cabras y posteriormente contra la brucelosis en bovinos y sus desventajas además las de la 45/30 radicaba en reacciones desfavorables en el sitio de inyección y la respuesta a las lipopolisaráridos bacterianos y persistentes de anticuerpos después de dos vacunaciones.

EVALUACION DE EFICACIA DE LAS VACUNAS

La evaluación de la eficacia de una vacuna se basa en las siguientes etapas: evaluación en animales de laboratorio, evaluación de huéspedes natruales experimentalmente inoculadas y evaluación en condiciones naturales.

En relación con la evaluación en huéspedes naturales es el que tiene mayor importancia.

En el caso de la cepa 19 el método de desafío más corriente es la inoculación por vía conjuntival después de lo cual se espera que el 90-100% de los animales se infecten.

El nivel de protección ofrecida por la vacuna en ensayo se realiza frente a un producto biológico corriente que sirva como control y frente a un grupo no vacunado.

Los factores a tener en cuenta para la evaluación son :

a. Exámen bacteriológicos hechos al parto y sacrificio realizados uno o dos meses después de la carga.
b. En vez del aborto se utiliza el porcentaje de supervivencia de los terneros de las vacas inoculadas.
c. Indice de infección.
d. Rata de infección en novillas no preñadas.
e. Respuestas serológicas.

En la evaluación de vacunas pueden presentarse dos problemas:

El primero de ellos radica en las comparaciones de los grupos de animales inoculados y vacunados. Si no se emplean grupos muy grandes los análisis estadísticos pueden no ser significativos, siendo necesario realizar varias réplicas de los experimentos e inexplicablemente al hacerlo suelen encontrarse diferencias muy notables

El otro problema en relación con estos esnsayos radica en la falta de una uniformidad en las dosis que deben ser empleadas en los inóculos. Esto ha inducido a variaciones en los resultados que publican diferentes autores. Por ejemplo para una cepa en particular una dosis de desafío muy alta puede sobrepasar la protección ofrecida por una vacuna, mientras que una dosis baja puede ofrecer resultados muy buenos frente a la misma vacuna

Una vez realizada la inoculación se establece la competencia entre los mecanismos de defensa y el inóculo. Si la respuesta es rápida y fuerte el gérmen es neutralizado localmente antes de una diseminación sistémica.

En condiciones naturales de contaminación, cuando la exposición no es el 10% la dosis infectiva, pueden suceder estímulos infectantes pequeños los cuales pueden provocar unos niveles de protección altos.

En tales cndiciones pueden hallarse diferencias sutiles entre experimentos sucesivos contra una descarga experimental.

PERSPECTIVAS EN NUEVAS VACUNAS MUERTAS

El mejoramiento de vacunas a base de células muertas ha sido infructuoso a pesar de los esfuerzos hechos con diferentes cepas adjuvantes, dosis, refuerzos, etc. mientras no se conozcan exactamente los mecanismos involucrados en la protección vacunal que deben ser específicamente estimulados.

En términos generales las vacunas muertas inducen respuesta celular y humoral. Dependiendo de la vacuna los anticuerpos están dirigidos contra los antígenos superficiales **S-LPS o R-LPS** y proteínas de membrana externa.

Las respuestas celulares a vacunas muertas han sido estudiadas in vivo e in vitro. Los resultados obtenidos no parecen estar relacionados con la protección, lo cual daebe investigarse en el futuro.

ELABORACION DE VACUNAS A PARTIR DE FRACCONES ANTIGENICAS

En vista de los inconvenientes que presentan tanto las vacunas vivas como las muertas, se realizan actualmente investigaciones para desarrollar una vacuna superior poniendo énfasis en aquellas subunidades de la célula que poseen una mayor antigenicidad. Los resultados obtenidos hasta el momento son muy prometedores a nivel de animales de laboratorio, siendo necesario vacunaciones rigurosas a nivel de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alton C.G. 1996. Duration of the imnunity produced by Rev. 1 Brucella melitensis vaccine. L. Comp. Pathol 76:241-253.

2. Boletín Anual de Sanidad Animal. Subgerencia de Prevención y Control, División de Sanidad Animal, Unidad de Información y Vigilancia Epidemiológica, Informe Técnico, Bogotá, 1990-1993.

3. Forero de LL.G. Rueda de C.E., Mariño O., Delevis L.S. 1991.Purificación ycaracterización de proteínas de membrana externa de Brucella abortus. Networking in Brucellosis Vaccine.

4. Gómez G., Moreno L.A., Umaña G. 1991. Elaboración de vacunas a partir de fracciones antigénicas de Brucella abortus. Networking in Brucella suis. Reseach the United Nations university. Pags. 33-47..

5. Nicoletti P., Jones L.M., Berman D.T. 1978. Comparison of the subcutaneus and conjuntival route of vaccinations with Brucella abortus strain, 19 Vaccine in adult cattle J. Am. Vet. Med. Assoc. 73 :1450-1456.

6. Principios generales de brucelosis, bases para la prevención y control en los humanos. Miniesterio de Salud, Dirección de Saneamiento Ambiental, Sección Zoonosis, Bogotá, Marzo 1987.

7. BLOOD, D.E ; RADOSTIS, O.M.; HENDERSON, J.A. 1987. Medicina Veterinaria. sexta Edición, México, D.F. 1987. P. 662-673.

8. GALLEGO, M.I. 1994. Taxonomia del Género **Brucella**. Curso Teórico Práctico de Actualización en Bacteriología Veterinaria: Diagnóstico e Investigación. Bogotá, D.C. 1994.

9. GALLEGO, M.I.; MARIÑO, J.O.C.; RUEDA, L.E.; GARCIA, C.C. 1994. Interpretación del Diagnóstico Serológico en Brucelosis Bovina. Curso Teórico Práctico de Actualización en Bacteriología Veterinaria: Diagnóstico e Investigación. Bogotá, D.C. 1994.