



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETRINARIA

**BRUCELOSIS BOVINA: ACTUALIZACIÓN SOBRE LA
ENFERMEDAD Y LA CAMPAÑA SANITARIA EN EL URUGUAY**

Por

BERRUETA WILKINS, Yarbel Jacinto



TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias

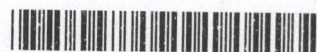
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Revisión Monográfica

MONTEVIDEO

URUGUAY

2012



FV-29626

PÁGINA DE APROBACIÓN

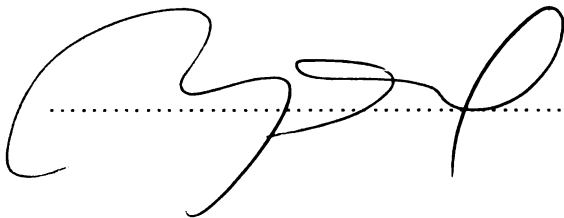
Presidente de mesa:

Dr. Julián Bermúdez


.....

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Rodrigo Puentes


.....

Tercer miembro:

Dr. Alfredo Garín


Cuarto miembro (Co Tutor):

Dr. Milton Cattáneo

Fecha: 15 de agosto, 2012.

Autor:

Yarbel Berrueta Wilkins


.....

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres, quienes siempre encaminaron mi vida y les doy las infinitas gracias por el esfuerzo que realizaron durante toda mi carrera estudiantil.

A mi novia y su familia por estar siempre presente, su apoyo, su confianza, su amor y la gran ayuda en la elaboración del trabajo.

Al Dr. Rodrigo Puentes, Tutor de la tesis, un inmenso reconocimiento por todo el apoyo brindado, pero sobretodo porque confió en mí, gracias por sus enseñanzas, y por su guía.

Al Dr. Milton Cattáneo, Co Tutor de la tesis, por su tiempo, dedicación y orientación.

A los Dres. Raúl Casas, Julián Bermúdez y Eduardo Bagnat, por su pronta respuesta a mis inquietudes, otorgarme información científica de alto valor académico y manifestar gran interés y disposición por el tema.

A los Dres Andrés Sosa, Patricia Mesa, Eduardo Rosso, Jorge Moraes, Alfredo Garín, Andrés Gil, al Ing. Agr. Manuel Béttega y demás profesionales por su tiempo y aportes que ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

A la SMVU (Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay), y en particular al Dr. Carlos Morón.

A docentes, compañeros y amigos de estudio, por las vivencias y recuerdos que no se olvidarán jamás.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN	- 2 -
AGRADECIMIENTOS	- 3 -
LISTAS DE CUADROS, GRAFICOS Y FIGURAS	- 4 -
1 RESUMEN	- 6 -
1 SUMMARY	- 7 -
2 OBJETIVOS	- 8 -
2.1 OBJETIVO GENERAL	- 8 -
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	- 8 -
3 INTRODUCCIÓN	- 9 -
4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	- 11 -
4.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD	- 11 -
4.2 SINONIMIAS	- 12 -
4.3 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO	- 13 -
4.3.1 Estructura y composición química externa	- 15 -
4.3.2 Estructura y composición química interna	- 16 -
4.3.3 Resistencia química y supervivencia en el ambiente.....	- 17 -
4.4 EPIDEMIOLOGÍA.....	- 19 -
4.4.1 Infección de un establecimiento.....	- 19 -
4.4.2 Excreción del agente al medio en los animales infectados.....	- 20 -
4.4.3 Difusión y permanencia de la enfermedad en el rodeo.....	- 21 -
4.5 SITUACIÓN EN URUGUAY	- 22 -
4.6 IMPORTANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA	- 31 -
4.7 ENFERMEDAD EN LOS HUMANOS.....	- 33 -
4.8 TRANSMISIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA	- 36 -
4.9 PATOGENIA Y SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD EN BOVINOS.....	- 38 -

4.10	RESPUESTA INMUNE PRODUCIDA EN BOVINOS POR LA INFECCIÓN CON <i>B. ABORTUS</i>	- 42 -
4.11	DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD.....	- 50 -
4.11.1	Diagnóstico Directo.....	- 50 -
4.11.1.1	Aislamiento	- 50 -
4.11.1.2	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	- 52 -
4.11.1.3	ELISA (Inmunoanálisis enzimático) Directo	- 53 -
4.11.2	Diagnóstico indirecto	- 54 -
4.11.2.1	Prueba de Aglutinación lenta en Tubo (SAT).....	- 54 -
4.11.2.2	Prueba de aglutinación con 2 - mercaptoetanol (2-ME)	- 54 -
4.11.2.3	ELISA (Inmunoanálisis enzimático)	- 54 -
4.11.2.4	Rosa de Bengala	- 55 -
4.11.2.5	Rivanol.....	- 56 -
4.11.2.6	Fijación de Complemento (FC)	- 56 -
4.11.2.7	Prueba del anillo en leche o "Milk ring test"	- 58 -
4.11.2.8	Polarización fluorescente (FPA).....	- 58 -
4.12	TRATAMIENTO	- 61 -
4.13	PRINCIPALES ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA LA INMUNIZACIÓN CONTRA BRUCELOSIS BOVINA	- 61 -
4.13.1	Bacterias atenuadas.....	- 61 -
4.13.1.1	<i>Brucella abortus</i> S19.....	- 61 -
4.13.1.2	<i>Brucella abortus</i> 45/20	- 62 -
4.13.1.3	<i>Brucella abortus</i> RB51	- 62 -
4.13.2	Vacunas subcelulares.....	- 63 -
4.13.2.1	Vacunas ADN	- 64 -
4.13.2.2	Vacunas ARN	- 65 -
4.14	RESPUESTA INMUNE PRODUCIDA POR LA VACUNACIÓN (CEPA 19 Y RB51).....	- 66 -

4.14.1	Características de la vacuna cepa 19.....	- 66 -
4.14.2	Características de la vacuna RB51.....	- 71 -
4.14.3	Eficacia comparativa de las vacunas con las cepas RB51 y Cepa 19	- 75 -
4.14.3.1	Efecto de la Edad de Vacunación en la eficacia de cepa 19 y RB51... ..	- 75 -
4.14.3.2	Prueba de eficacia de las vacunas antibrucélicas cepa 19 y RB51 en bovinos	- 77 -
4.15	RESULTADOS DE LAS CAMPAÑAS SANITARIAS EN PAISES DE LA REGIÓN.....	- 78 -
4.15.1	Brucelosis Bovina en Argentina	- 79 -
4.15.2	Brucelosis Bovina en Brasil	- 79 -
4.15.3	Brucelosis Bovina en Chile	- 80 -
4.15.4	Brucelosis Bovina en Paraguay	- 81 -
4.15.5	Brucelosis Bovina en Estados Unidos	- 82 -
5	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	- 83 -
6	BIBLIOGRAFÍA	- 90 -

LISTAS DE CUADROS, GRAFICOS Y FIGURAS

CUADROS

- Cuadro 1.** Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas. - 14 -
- Cuadro 2** Supervivencia de *Brucella* en el medio ambiente - 19 -
- Cuadro 3.** Focos nuevos, cerrados y activos (2002-2011). - 23 -
- Cuadro 4.** Prevalencia (%) anual de brucelosis por establecimiento. - 26 -
- Cuadro 5.** Prevalencia (%) anual de brucelosis por animal. - 26 -
- Cuadro 6.** Nómina de seccionales policiales, por departamento, caracterizadas como de riesgo para brucelosis bovina (al 31/10/2011). - 28 -
- Cuadro 7.** Técnicas serológicas en algunos países de la región. - 60 -
- Cuadro 8.** Comparación entre la respuesta de las vacunas Cepa 19 y RB51 contra brucelosis bovina. - 74 -
- Cuadro 9.** Eficacia de la vacuna RB51 y la cepa 19 utilizada en diferentes edades. - 76 -
- Cuadro 10.** Protección contra el aborto conferido por la vacuna RB51 y la cepa 19 en diferentes edades. - 76 -

GRAFICOS

Gráfico 1. Focos nuevos, cerrados y activos (2002-2011).	- 24 -
Gráfico 2. Bovinos indemnizados por brucelosis bovina (2004-2011).....	- 30 -
Gráfico 3. Número de sueros analizados por foco detectado por año (2005-2011).	- 31 -
Gráfico 4. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con cepa 19 entre 4 y 6 meses de edad.	- 68 -
Gráfico 5. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con la vacuna cepa 19 a los 8 meses de edad.....	- 68 -

FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de Brucella. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena O, o está reducida a muy pocos residuos. P: proteína.....	- 15 -
Figura 2. Sistema de Vigilancia Epidemiológica 2002-2010.	- 24 -
Figura 3. Mapa de Uruguay, seccionales policiales en riesgo (focos activos, o cesados hace menos de 12 meses) de Brucelosis bovina. En amarillo se muestran las seccionales policiales que se realizan sangrado previo movimiento.....	- 27 -

1 RESUMEN

Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta al hombre y diferentes especies animales, especialmente al bovino, constituyendo una zoonosis de importancia económica y de gran impacto para la salud pública mundial. La especie *Brucella abortus*, causante de la enfermedad en bovinos, es la que ha producido mayores pérdidas económicas en la ganadería a nivel mundial y se caracteriza por producir abortos en el último tercio de la gestación, con retención de placenta, cifras elevadas de infertilidad, nacimientos de terneros débiles y orquitis en machos. En el Uruguay la enfermedad está presente desde hace mucho tiempo, pero en los últimos años ha tenido un interés creciente, debido al hecho de que luego de varias décadas implementando la campaña sanitaria basada en la vacunación con Cepa 19, y la baja prevalencia lograda, la enfermedad re emergió en el año 2001 en Rocha y actualmente está presente en prácticamente todos los departamentos del país. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar una actualización de la situación de la enfermedad, describiendo la evolución de la misma en el país, y los resultados obtenidos de la campaña sanitaria implementada luego de la re emergencia en el año 2001.

1 SUMMARY



Brucellosis is an infectious disease caused by a gram-negative bacterium *Brucella abortus* that affects man and different species of animals, especially bovines, being a zoonotic disease of economic importance and of great impact for public health around the world. The disease in cattle has produced great economic losses in livestock all over the world, and is characterized by producing abortions in the last third of gestation, with retained placenta, elevated infertility, birth of weak calves and orchitis in males. The disease in Uruguay has been present for many years, but recently a growing interest developed due to the fact that after several decades of implementing a campaign based on vaccination with strain 19, and the low prevalence achieved, it re-emerged in 2001 in Rocha and is now present in almost all the departments. Therefore, this study aims to describe the evolution of the the disease in the country, and the results of the health campaign implemented after the re emergence in 2001.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre la Brucelosis bovina, que permita generar un juicio fundamentado sobre la situación actual de la enfermedad en el Uruguay.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1 Describir la situación epidemiológica actual de la Brucelosis bovina en el Uruguay y en la región.

2.2.2 Describir la Respuesta inmune adquirida generada por la infección natural de *Brucella abortus* en bovinos.

2.2.3 Describir la Respuesta inmune generada por la utilización de vacunas con la Cepa 19 y comparar con la generada por la RB51.

2.2.4 Analizar y generar un juicio sobre la campaña sanitaria implementada por Uruguay, comparando con estrategias utilizadas por países de la región.

3 INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina, causada por *Brucella abortus*, es una enfermedad zoonótica, que causa considerables pérdidas económicas a nivel mundial. Las mismas están vinculadas principalmente a una menor producción de terneros por abortos, infertilidad, aumento del intervalo interparto, menor producción de leche, alta tasa de reemplazos y pérdidas de peso en canales de carne (Nicoletti, 1994).

Se reconocen actualmente siete especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* del grupo S y *B. ovis*, *B. canis* y *B. maris* del grupo R (Corbel y Brinley-Morgam, 1984). Las cepas de *Brucella* de una misma especie difieren en algunas características, lo que ha permitido clasificarlas en biotipos para estudios epidemiológicos (Mayer, 1990).

B. abortus fue aislada por primera vez en Dinamarca por Bang en 1897 y es el agente causal de la Brucelosis bovina. Es un patógeno intracelular, facultativo, capaz de multiplicarse y sobrevivir en una variedad de células del huésped, en particular, las células fagocíticas o macrófagos (Villamil y col., 1995). Las cepas lisas del género *Brucella*, poseen en su pared celular lipopolisacáridos (LPS), los cuales mediante su porción lipídica son responsables de la endotoxicidad del germen, en tanto que la porción sacárida está constituida por dos fracciones, una corta y otra larga denominada cadena O, que corresponde al antígeno inmunodominante que provoca la formación de anticuerpos (Rojas y Contreras, 1997).

Actualmente para el diagnóstico de la brucelosis bovina existen diversos métodos, que varían en sensibilidad y especificidad (Mac Millan, 1990; Díaz y Blasco, 1994). De éstos, los más utilizados en suero sanguíneo son Seroaglutinación Estándar (SAE), Fijación del Complemento (FC), Rosa Bengala (RB) y Rivanol (Riv). En leche, el más utilizado es el Ring test (RT). Últimamente se han incorporado métodos inmunoenzimáticos o ELISA, tanto en suero sanguíneo como en leche (Nielsen y col., 1988, 1989; Nielsen, 1990).

B. abortus RB51 es la vacuna para la Brucelosis usada actualmente en el país. Es una cepa mutante de la cepa lisa de *B. abortus* 2308, virulenta, que se atenuó por sucesivos pasajes en medios conteniendo Rifampicina. De esta manera se logró obtener una cepa rugosa (ausencia de cadena O), atenuada y estable. Por no poseer en su pared celular la cadena O, que es el epítipo inmunodominante contra el cual se generan los anticuerpos detectables con las pruebas rutinarias más utilizadas en diagnóstico, los animales inmunizados con esta vacuna, dan resultados negativos en las pruebas serológicas. La vacunación con cepa de *B. abortus* RB51 genera una respuesta inmune fundamentalmente celular. En cambio, una cepa lisa de *B. abortus* como la Cepa 19, genera los dos tipos de respuesta principales (humoral y celular) en el animal vacunado, con altos títulos de anticuerpos contra la cadena O del LPS. Estos anticuerpos generados, son capaces de interferir con el diagnóstico serológico cuando se quiere diferenciar animales vacunados de infectados naturalmente (Oliveira y Splitter, 1996; WHO, 1997; Olsen, 2000).

La brucelosis bovina en Uruguay fue diagnosticada por primera vez en 1926 y recién en 1964 se inicia una campaña sanitaria basada en la vacunación con cepa 19. En 1996 se suspende la vacunación y en 2001 tras la reemergencia de focos de la enfermedad, se implementa una campaña sanitaria basada en prueba-sacrificio de animales positivos, interdicción y sangrado de focos, linderos y predios relacionados epidemiológicamente, sangrado previo movimiento de seccionales policiales de riesgo, serología en planta de faena, vacunación y revacunación con la cepa RB51. Al cierre de 2011, la prevalencia nacional estuvo cercana al 1%, con un total de 315 focos activos en todo el país (Fernández, 2011).

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 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 a los combatientes en la guerra de Crimea (1854-1856) y los marineros a bordo. 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. Aisló un agente llamado *Micrococcus melitensis* de bazos humanos de pacientes hospitalizados que habían consumido leche de cabra cruda.

El profesor L.F. Benhard Bang, patólogo veterinario y bacteriólogo Danés, describió un microorganismo causante de abortos en ganado en 1895 llamado *Bacillus abortus*. Y en 1914 en Estados Unidos, fue aislada la especie *Brucella* 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~~ bovinos en la primera parte del siglo XX, pues el aborto contagioso fue reconocido junto con la tuberculosis como causa seria de pérdidas económicas.

En 1930, el nombre de la enfermedad fue cambiado de aborto infeccioso de los bóvidos a la enfermedad de Bang. El 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.

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. Luego, en 1952, la prueba de anillo en leche fue introducida en el programa, siendo el principal método de vigilancia en ganados lecheros con posible brucelosis.

Por otro lado en Australia y Nueva Zelanda en el año 1953, Buddle y Boyes identificaron a *B. ovis* como causa de epididimitis en carneros. Más adelante, Carmichael aisló *B. canis* de fetos caninos abortados (Nicoletti, 2002).

Desde ese entonces el género incluye siete 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 caprinos y ovinos, *B. suis* a suinos, *B. canis* infecta caninos, *B. ovis* causa infección específicamente a ovinos 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 (Castro y col., 2005).

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 han sido denominadas *B. maris* (López y Contreras, 2004).

4.2 SINONIMIAS

La brucelosis bovina es también conocida como: Melitococia, Fiebre de Malta, Fiebre ondulante, Fiebre del Mediterráneo (en el humano). Enfermedad de Bang, Aborto contagioso, Aborto epizoótico, Aborto epidémico, y Aborto infeccioso (Acha y Szyfres, 2001).

4.3 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO

El género *Brucella* está constituido por bacilos gram negativos pequeños, inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos (Michaux-Charachon y col., 1997). Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares (Wilfert, 1986). El género *Brucella* incluye siete especies diferentes: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris* (Cloeckert y col., 2001). De ellas, las cuatro primeras pueden infectar al hombre. En el Cuadro 1 se detallan las especies de *Brucella*, sus hospedadores conocidos y las características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades.

Cuadro 1. Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.

Especie	Hospedador	Biovariedad	Producción de H ₂ S	Necesidad de CO ₂	Sensibilidad a los colorantes		Aglutinación con sueros monoespecíficos		
					Tionina	Fucsina	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovino, cánidos, hombre	1	-	-	+	+	-	+	-
		2	-	-	+	+	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	Bovinos, cánidos, hombre	1	+	+	-	+	+	-	-
		2	+	+	-	-	+	-	-
		3	+	+	+	+	+	-	-
		4	+	+	-	+	-	+	-
		5	-	-	+	+	-	+	-
		6	-	-	+	+	+	-	-
		7	+	-	+	+	+	+	-
		8	-	+	+	+	+	+	-
		9	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos, hombre	1	-	-	+	-	+	-	-
		2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	-	+	+	-
		5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre		-	-	+	-	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	Roedores		+	-	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	Ovinos		-	+	+	-	-	-	+
<i>B. maris</i>	Focas, leones marinos, delfines, ballenas.								

Extraído de Castro y col (2005).

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS (Ariza, 1995).

Las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas y su ultraestructura es semejante a la de algunas enterobacterias (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella landau*, *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli*) (Corbel, 1983),

aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa (ME).

4.3.1 Estructura y composición química externa

La ME de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina.

Su componente más abundante y mejor estudiado es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R (Fig 1).

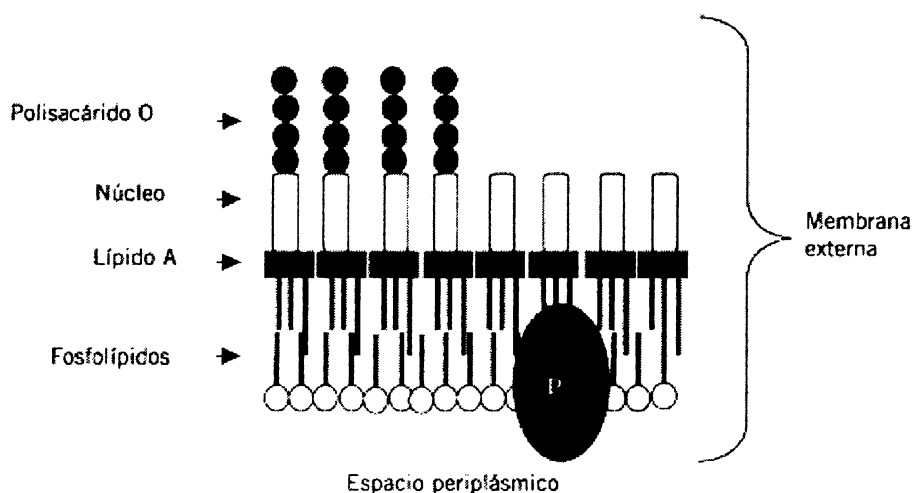


Figura 1. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena O, o está reducida a muy pocos residuos. P: proteína.

Fuente: Extraído de Castro y col., (2005).

El lípido A es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilos presenta sustituciones por ácidos grasos de variada longitud de cadena. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO) y no contiene ni heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS-S pero no en el del LPS-R. El PSO es la porción más distal del LPS. Es un homopolímero lineal compuesto por n-residuos de N-formil perosamina (4,6 dideoxi-4-formamido-a-D-manopiranosilo). La unión entre estos residuos puede ser de dos tipos: α 1-2 o α 1-3, lo que permite diferenciar dos configuraciones alternativas, la A y la M, de mucha importancia en la determinación de las biovariedades, y que se establecen a partir de la alternancia de las uniones entre residuos en el PSO (Tabla I).

Las *Brucellas* contienen otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O, pero no está unido al núcleo (Moreno y col., 1981). Se ha descrito un tercer polisacárido conocido como poli B, que se obtiene a partir de la cepa mutante en fase rugosa de *B. melitensis* 115, por tratamiento con ácido tricloroacético 0,2 M y que para algunos autores sería químicamente equivalente al HN (Argón y col., 1996).

Las proteínas de membrana externa (PME u OMPs) se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) (Salhi y col., 2003; Cloeckart y col., 1999) y se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del LPS de las primeras. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se han identificado otras proteínas de membrana menos abundantes que se denominan proteínas menores, siendo algunas de ellas lipoproteínas (Cloeckart y col., 1999).

4.3.2 Estructura y composición química interna

Las proteínas citoplasmáticas de las bacterias del género *Brucella* son específicas de ese género y la mayoría son compartidas por todas las especies

(Baldi y col., 1994). Algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico, como por ejemplo la glicoproteína A2 termo resistente (Stemshorn y Nielsen, 1981), una proteína de 17 kDa, involucrada en la síntesis de riboflavina, que aparece en la fase activa de la infección (Goldbaum y col., 1999) y la proteína periplásmica BP26 (Seco-Mediavilla y col., 2003). Todas estas proteínas forman parte de un antígeno denominado CP, empleado en pruebas de ELISA.

El ADN de las bacterias del género *Brucella* contiene un 58-59% de G + C (guanina y citosina) y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente $2,5 \times 10^6$ pares de bases (Allardent-Servent y col., 1988); este tamaño es menor al de *Escherichia coli* ($4,7 \times 10^6$ pares de bases). Dos características genéticas de *Brucella* llaman especialmente la atención, en primer lugar, la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos, y en segundo lugar, la ausencia de plásmidos. Esta última característica refleja probablemente la adaptación a un nicho ecológico (el ambiente intracelular) estable y sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que se deriva de los plásmidos y que es propia de ambientes con gran cantidad de microbios (intestino, tierra, etc.). El género *Brucella* tiene siete especies reconocidas, las que exhiben distintas preferencias por su huésped (Mayer, 1964) y muestran más de 94% de homología en su genoma (Halling y col., 2005), lo que apoya la proposición de que las especies clásicas de *Brucella* son cepas de *Brucella melitensis* (Verger y col., 1995). Sin embargo, se ha encontrado polimorfismo en determinadas secuencias genómicas que coinciden con las especies clásicas e incluso con las biovariedades. Se estima además, que el 8% del genoma de *Brucella* se destina a funciones necesarias para la sobrevivencia y la virulencia, en comparación al estimado para *Salmonella* que es sólo el 3-4% (Hong y col., 2000).

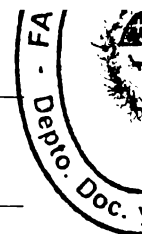
4.3.3 Resistencia química y supervivencia en el ambiente

Las especies del género *Brucella* 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 *Brucellas* 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 protegida de la luz solar, pueden retener su infectividad por mucho tiempo (Cuadro 2) (López y Contreras, 2004).

En contraste, son bastante sensibles al calor. Así una suspensión diluida de *Brucellas*, 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 más 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 *Brucella* (López y Contreras, 2004).

En cuanto a la resistencia a los antibióticos, en general esta bacteria 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 aminoglucósidos 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 y Contreras, 2004)



Material	Tiempo de Supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15 – 40 días
Leche a temperatura ambiente	2 -4 días
Fluidos y secreciones	10 - 30 minutos
Agua a 37°C y pH 7.5	Menos de 1 día
Agua a 8°C y pH 6.5	Más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6 – 8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Paja	29 días
Fetos abortados	6 -8 meses
Heces bovinas	1 – 100 días
Tierra húmeda	66 días
Tierra seca	4 días

Extraído de Castro y col. (2005)

4.4 EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia y prevalencia de la brucelosis a nivel mundial tienen importantes variaciones geográficas. Las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América (México, Brasil, Perú, Colombia, Paraguay y Argentina), siendo *B. abortus* es la especie más difundida, luego *B. melitensis* y *B. suis* (Acha y Szyfres, 2001).

Algunos países del norte y del centro de Europa, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda se consideran libres de brucelosis bovina (OIE, 2010).

4.4.1 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 se trasladen a otros establecimientos y vuelvan infectados. De este modo es altamente recomendable conocer el origen de los animales y el estado sanitario del rodeo del que provienen. Se debe hacer un sangrado en el lugar de compra, previo al movimiento de los animales para descartar la enfermedad. Sin embargo, existe alta probabilidad de que haya animales en fase de incubación que no son detectados por las pruebas rutinarias (Rodríguez, 2002; Samartino, 2003; Rodríguez, 2005).

Además, se debe realizar una cuarentena en el establecimiento comprador antes de incorporar los animales “nuevos” con el resto del rodeo. De forma paralela también contribuyen los perros, zorros u otros animales carnívoros que llevan los restos de fetos, placentas u otros materiales infectados (Rodríguez, 2002; Samartino, 2003; Rodríguez, 2005). La diseminación de la infección en los rodeos lecheros, puede contribuir también la leche, pues, aproximadamente la mitad de las vacas infectadas, después de abortar o parir, eliminan *Brucellas* 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 (Rodríguez y col., 2005).

4.4.2 Excreción del agente al medio en los animales infectados

El 80% de las *Brucellas* se eliminan en el momento del aborto o parición, siendo esta la forma más importante de transmisión de la enfermedad (García, 2003). Las descargas uterinas de vacas infectadas se producen desde aproximadamente 15 días antes del aborto o parto hasta 4 semanas después del mismo, eliminándose 1×10^{14} gérmenes por gramo de placenta (Samartino, 2003).

La secreción de *Brucellas* con la leche puede tener lugar a lo largo de todo el año, pudiendo persistir hasta el final de la vida del animal. La cantidad de bacterias eliminadas es variable, pudiendo oscilar desde menos de 100 hasta 200.000 (independiente del volumen de leche producido) (Rodríguez, 2002;

Samartino, 2003; Rodríguez, 2005). La mayor cantidad se registra después del parto y la menor en el pico de la lactación. En este período las bacterias 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, 2002; Samartino, 2003; Rodríguez, 2005).

4.4.3 Difusión y permanencia de la enfermedad en el rodeo

La Brucelosis al introducirse en un rodeo se disemina rápidamente, pudiendo alcanzar proporciones de epizootia. Si nuevos animales no son introducidos, pierde su severidad inicial pasando a una forma enzootica, en la cual si no son aplicadas medidas severas permanece por varios años. La Brucelosis tiene como característica epizootiológica que al introducirse en un rodeo, nuevos animales, se rompe el equilibrio y pueden aparecer no solamente animales seropositivos, sino también con manifestaciones clínicas 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 cual las vacas no expuestas anteriormente a la infección, se infectan y pueden abortar. Hay una última fase de declinación de la brucelosis en donde se reduce la infección sobre todo cuando el rodeo es pequeño y/o 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 porque las generaciones de vaquillonas o el ingreso de animales nuevos, permiten la presencia permanente de animales susceptibles, especialmente en rodeos grandes (Acha y Szyfres, 2001; Moreno y col., 2002). Este desarrollo ocurre en forma natural cuando no se toman estrictas medidas de control.

4.5 SITUACIÓN EN URUGUAY

El primer aislamiento de *Brucella abortus* en nuestro país se realizó en 1926 por parte del Dr. A. Cassamagnaghi a partir de sangre bovina en tambos de San José y Canelones. En 1931 Nin, Silva y Murguía comprobaron el primer caso humano en personal de frigorífico (Gil, 2012).

El Uruguay tiene una larga historia en el control de la Brucelosis bovina y ha tenido diferentes etapas en su estrategia de control y erradicación. La primera etapa incluye el periodo entre los años 1926 a 1961 considerada de profilaxis libre.

La segunda etapa de lucha obligatoria fue a partir de 1961 (ley 12.937) y en el año 1964 se incluye la vacunación obligatoria de las terneras con la vacuna Cepa 19 a todas las hembras bovinas entre los 3 y 6 meses de edad. Esta vacuna solo podía ser administrada por Médicos Veterinarios privados habilitados, y cada animal inmunizado debía ser identificado por medio de un tatuaje y una muesca en la oreja. Los animales no vacunados, eran marcados a fuego con la letra "V" en la grupa del lado derecho, y su comercialización era exclusivamente a frigoríficos (ley 13.892). A partir del año 1984 se agrega a la legislación el sacrificio sanitario de los animales que a las pruebas diagnósticas confirmatorias fueran positivos (Decretos 79/984 y 607/985). Hasta este año la prueba serológica utilizada era Huddleson, realizada por veterinarios privados de campo, pasándose a utilizar como prueba presuntiva Rosa de Bengala, por parte de laboratorios privados habilitados y como confirmatoria las pruebas Fijación de Complemento, Rivanol, y 2-Mercaptoetanol, por parte de laboratorios oficiales (Decreto 20/998).

El cese de la vacunación se decreta en el año 1996, luego de 32 años de aplicación se suspende la vacunación con Cepa 19 (Decreto 522/996).

La tercera etapa se inicia en el año 1998, donde se aplican medidas para erradicar la enfermedad mediante un programa de predios libres según lo establece la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). En ese momento la prevalencia estimada en el Uruguay era menor al 1% del stock bovino

(animales de exportación, exposición, de envío a remates-ferias, y tambos leche industria) (Garín, 2003). Una vez suspendida la vacunación, la serología se realizaba a las siguientes edades: 2 años para hembras vacunadas, 1 año para hembras sin vacunar y 1 año para machos enteros.

La cuarta etapa comienza a partir del año 2001, con la reaparición de brotes de la enfermedad en el departamento de Rocha. De ese momento a la fecha se han ido diagnosticando focos en todos los departamentos del país, con el aumento de la vigilancia epidemiológica. (Cuadro 3; Gráfico 1).

Cuadro 3. Focos nuevos, cerrados y activos (2002-2011).

Año	Nuevos	Cerrados	Activos
2002	110	0	110
2003	77	10	177
2004	57	37	197
2005	160	98	259
2006	88	116	231
2007	95	119	207
2008	182	121	268
2009	199	131	336
2010	194	148	382
2011	131	198	315
TOTAL	1293	978	

Fuente: Fernández, (2011).

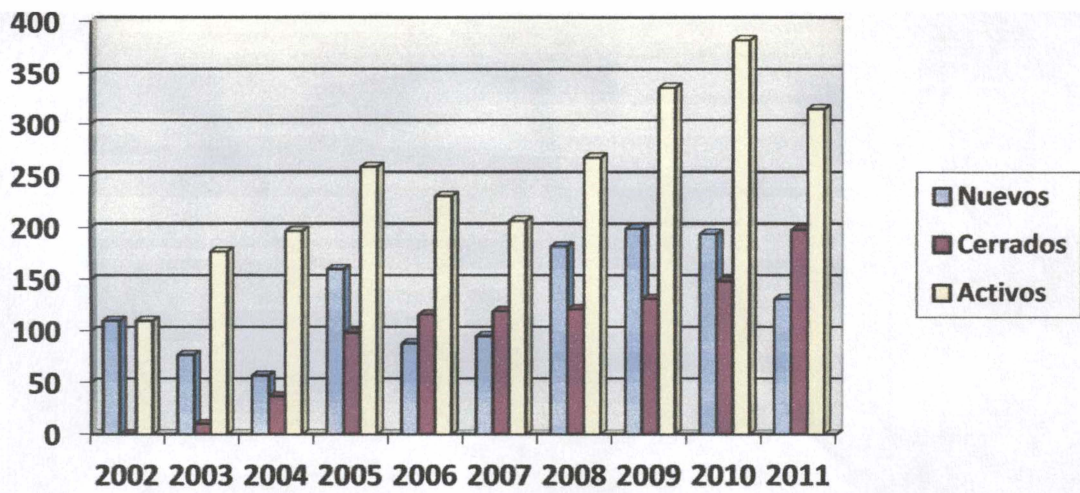


Gráfico 1. Focos nuevos, cerrados y activos (2002-2011).

Fuente: Datos extraídos de Fernández, (2011).

A partir del año 2002, hasta la fecha se han ido implementando una serie de medidas de vigilancia epidemiológica a fin de disminuir la prevalencia y detectar focos ocultos (Figura 2).

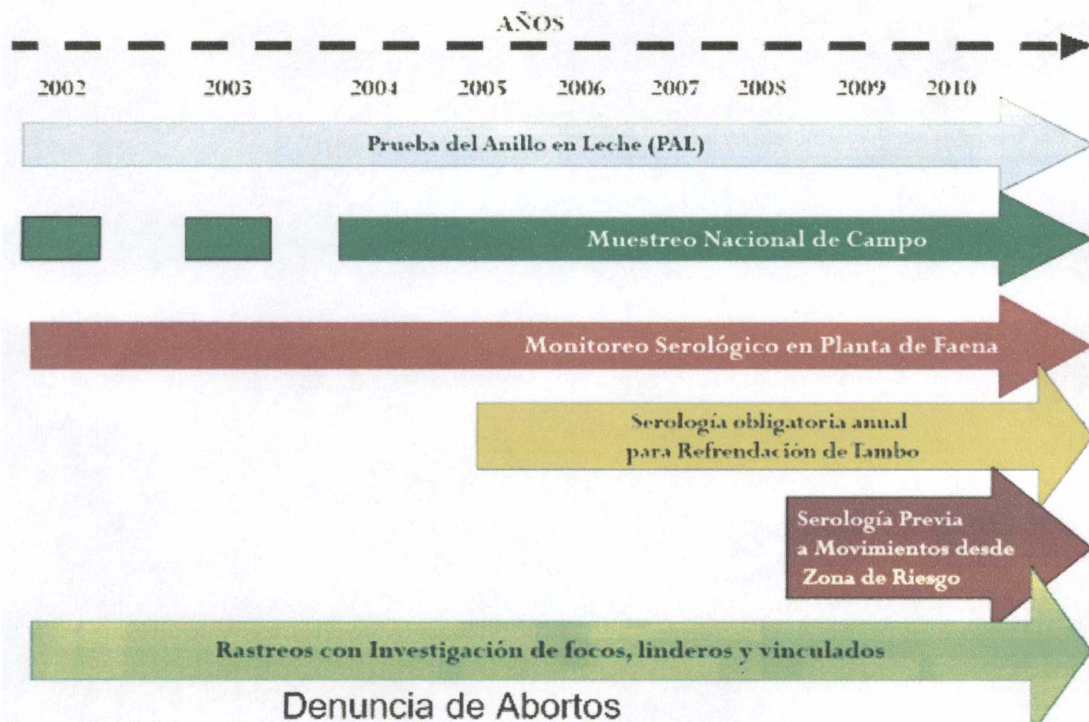


Figura 2. Sistema de Vigilancia Epidemiológica 2002-2010.

Fuente: Gil, (2012).

La estrategia de la campaña sanitaria actual se basa en el esquema prueba-sacrificio, acompañado de interdicción e investigación de los focos, perifocos, proveedores, compradores del rodeo problema, control del movimiento de bovinos desde zonas de riesgo, indemnización a propietarios de bovinos positivos enviados a faena obligatoria, vacunación y revacunación con cepa RB51 (Decreto 135/005).

La vacuna es una herramienta en la actual campaña de erradicación y se la utiliza debido a que no genera interferencia con el diagnóstico serológico independientemente de la edad de vacunación (Dr. Alfredo Garín, comunicación personal).

Una vez detectado un foco, la seccional policial que corresponde a dicho foco es declarada seccional policial de riesgo y permanece con tal condición hasta 12 meses del cese del último foco (Resolución de la DGSG 41/008). Para los movimientos de animales desde estas seccionales policiales debe realizarse serología a todos los bovinos hembra y machos enteros mayores de un año.

Los animales seropositivos a la prueba confirmatoria son enviados a faena (Decretos 79/984 y 607/985)). Es críticamente importante eliminar animales reactores positivos tan pronto como sea posible (Ragan y Ragan, 2012). Los retrasos excesivos en retirar los animales positivos de algunas zonas, muchos de ellos dentro de ecosistemas altamente favorables para la transmisión de la enfermedad, provocaron no sólo el aumento de prevalencia, sino además la posibilidad de diseminación (SMVU, 2011). Hay situaciones en la cuales es engorroso el envío a faena de los animales positivos, debido a que las plantas habilitadas no tienen interés en la compra, y las que compran en muchas situaciones están trasmano. En el país existen 16 plantas frigoríficas habilitadas para faena de animales positivos a la prueba confirmatoria de brucelosis bovina, según DSA, pero en la actualidad un número muy reducido realiza la faena de los animales positivos.

En los focos (Resolución de la DGSG 25/001), perifocos y zonas problema (Resolución del MGAP 883/010) se vacunan y revacunan a todas las hembras no preñadas mayores de cuatro meses (con la cepa RB51), por parte de veterinarios privados habilitados, por la división sanidad animal (DIA).

En el año 2011, la prevalencia predial de brucelosis era de 0.71% (Cuadro 4) y la prevalencia animal 0.03% (Cuadro 5), existían 315 focos activos, fueron detectados 131 focos nuevos, se cerraron 198, y la media para sanearlo fue de 721 días, con un desvío estándar de 432 días (Gil, 2012). Históricamente 1932-1960 la prevalencia predial en ganado de leche, era de 50%, y menos de 20% de animales reactores positivos y en ganado de carne 20-30% de predios positivos y 8-10% de animales con serología positiva. En 1983, la prevalencia de brucelosis fue de menos de 1% por animal, tras 18 años de utilización de la vacuna Cepa 19, con una cobertura vacunal de 90% (Bermúdez y Barriola, 1983).

Cuadro 4. Prevalencia (%) anual de brucelosis por establecimiento.

Años/Est.	2002	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Carne	2.04	0.92	2.20	1.45	1.30	1.42	0.23	0.79
Leche	0.25	4.50	-----	0.69	-----	2.24	0.30	-----
Total	1.70	1.06	2.02	1.39	1.10	1.62	0.24	0.71

Fuente: Gil, (2012).

Cuadro 5. Prevalencia (%) anual de brucelosis por animal.

Años/Bov.	2002	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Carne	0.24	0.16	0.23	0.05	0.30	0.27	0.04	0.03
Leche	0.02	0.42	-----	0.04	-----	0.13	0.60	-----
Total	0.22	0.17	0.22	0.05	0.26	0.25	0.10	0.03

Fuente: Gil, (2012).

De un total de 249 seccionales policiales, en todo el país (excepto Montevideo), 125 están en riesgo de Brucelosis Bovina (Cuadro 6; Figura 3). De esto se desprende que más del 50% de los productores realiza sangrado previo a los movimientos de animales susceptibles. Hay que considerar que este 50% está subestimado, debido a que se toman en cuenta seccionales policiales urbanas que no cuentan en su jurisdicción con establecimientos agropecuarios.

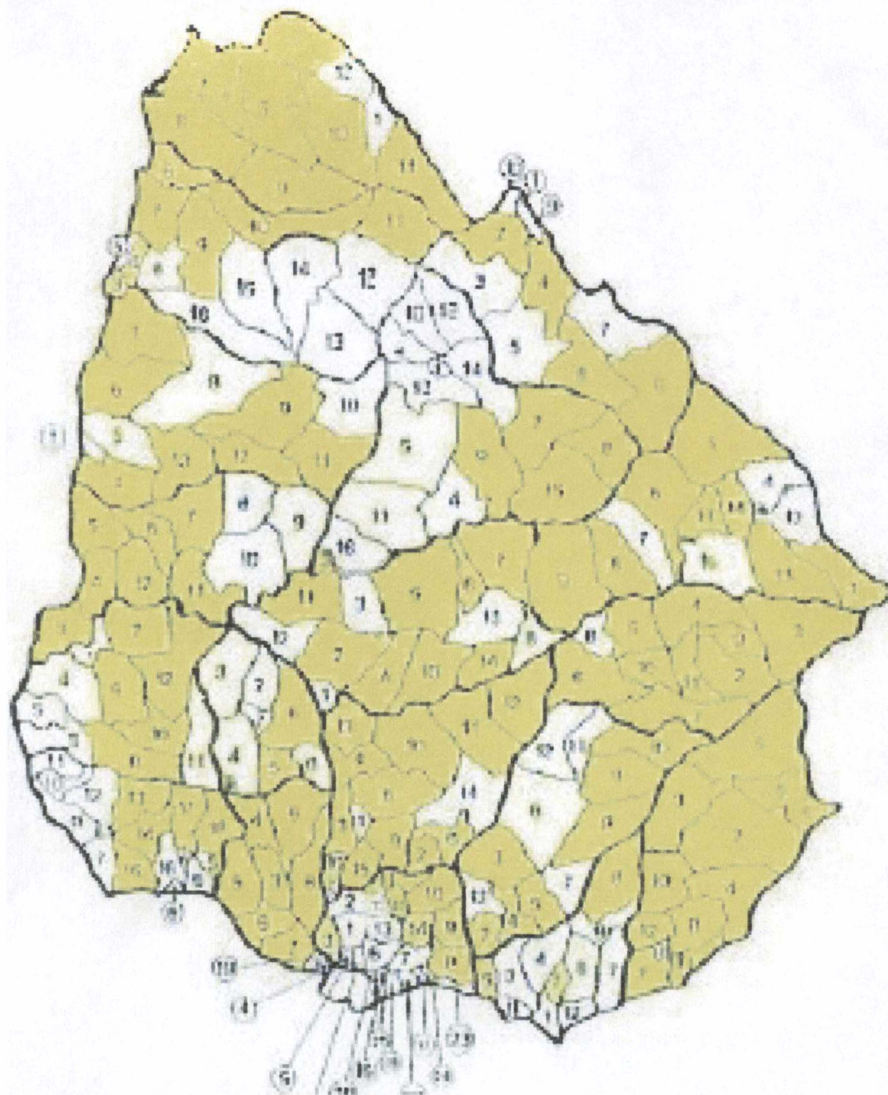


Figura 3. Mapa de Uruguay, seccionales policiales en riesgo (focos activos, o cesados hace menos de 12 meses) de Brucelosis bovina. En amarillo se muestran las seccionales policiales que se realizan sangrado previo movimiento.

Fuente: Fernández, (2011).

Cuadro 6. Nómina de seccionales policiales, por departamento, caracterizadas como de riesgo para brucelosis bovina (al 31/10/2011).

Departamento	Seccionales Policiales	Número de Seccionales/Departamento
Artigas	4°- 5°- 6°- 7°- 8°- 9°- 10°	7
Canelones	3°- 8°- 9°- 10°- 11°- 12°- 14°	7
Cerro Largo	3°- 5°- 6°- 8°- 9°- 11°- 13°- 14°- 16°	9
Colonia	10°- 12°- 14°- 15°- 16°- 17°- 18°	7
Durazno	2°- 4°- 5°- 6°- 7°- 10°- 11°- 14	8
Flores	5°- 6°	2
Florida	2°- 3°- 4°- 6°- 8°- 9°- 10°- 11°- 12°- 13°- 15°- 16°	12
Lavalleja	2°- 3°- 5°- 8°- 9°- 10°- 14°	7
Maldonado	2°- 5°- 8°	3
Paysandú	4°- 6°- 7°- 9°- 11°- 12°- 13°	7
Río Negro	3°- 4°- 5°- 6°- 7°- 11°- 12°	7
Rivera	2°- 4°- 6°- 8°	4
Rocha	2°- 3°- 4°- 5°- 6°- 7°- 8°- 9°- 10°- 11°- 12°	11
Salto	3°- 4°- 6°- 7°- 9°- 10°- 11°	7
San José	3°- 4°- 5°- 6°- 7°- 8°- 9°- 10°	8
Soriano	3°- 6°- 7°- 8°- 10°- 12°	6
Tacuarembó	7°- 8°- 9°- 15°	4
Treinta y Tres	2°- 3°- 4°- 5°- 6°- 7°- 9°- 10°- 11°	9
TOTAL		125

Fuente: Resolución DSA 70/011.

La media para sanear un foco de brucelosis bovina en el país es de 721 días (2 años). Teniendo en cuenta que una vez detectado un foco se realizan sangrados cada 4 meses, lo que da un total de 6 sangrados, de todos los bovinos hembra o machos enteros mayores de 1 año de edad. Los costos para el productor, según consultas con Médicos Veterinarios de libre ejercicio (VLE), son del entorno de 1,2 U\$\$ para el sangrado, 1,4 U\$\$ para el análisis de laboratorio/animal. Esto arroja un resultado de 15,6 U\$\$/animal, que el productor debe enfrentar en serología para sanear un foco.

En lo que se refiere a la vacunación con RB51, la dosis vacinal tiene un costo de 1,6 U\$\$ y la aplicación por parte de VLE es de 1 U\$\$/animal, teniendo en cuenta que se aplican dos dosis, tenemos un costo de 5,2 U\$\$/animal. Dando un total de 10,4 U\$\$/animal en los dos años de saneamiento del foco.

Si sumamos la serología (15,6 U\$\$), más la vacunación (10,4 U\$\$), tenemos un costo de 26 U\$\$/animal, en promedio para sanear un foco de brucelosis.

Estos costos sanitarios son relativamente bajos si tenemos en cuenta las cuantiosas pérdidas que genera directamente la enfermedad (sacrificio de animales positivos, abortos, aumento del intervalo inter-parto, menor producción de leche, entre otros), la interdicción por las restricciones de movimiento de animales, mano de obra extra y la importancia como zoonosis.

El precio que maneja la planta para animales positivos, es en el eje de 1,4-2 U\$\$/kg, dependiendo la condición corporal y si se trata de ganado de leche o carne. Si estos mismos animales no estuvieran afectados, el precio sería 2,05-3,45 U\$\$/Kg. Estos precios son puestos en planta y en segunda balanza. Esta diferencia de precios se ve complementada con el seguro para el control de la brucelosis bovina (SCB), financiado por los productores, que es de 420 U\$\$ para ganado de leche y 177 U\$\$ para ganado de carne (Decreto 036/011).

Otro dato interesante, es el número de bovinos indemnizados (Gráfico N° 3). Por ejemplo en el año 2010, fueron 7.526 bovinos de leche (420 U\$\$/animal) y 226 bovinos de carne (177 U\$\$/animal); esto nos da una indemnización por la suma de 3.200.922 U\$\$.

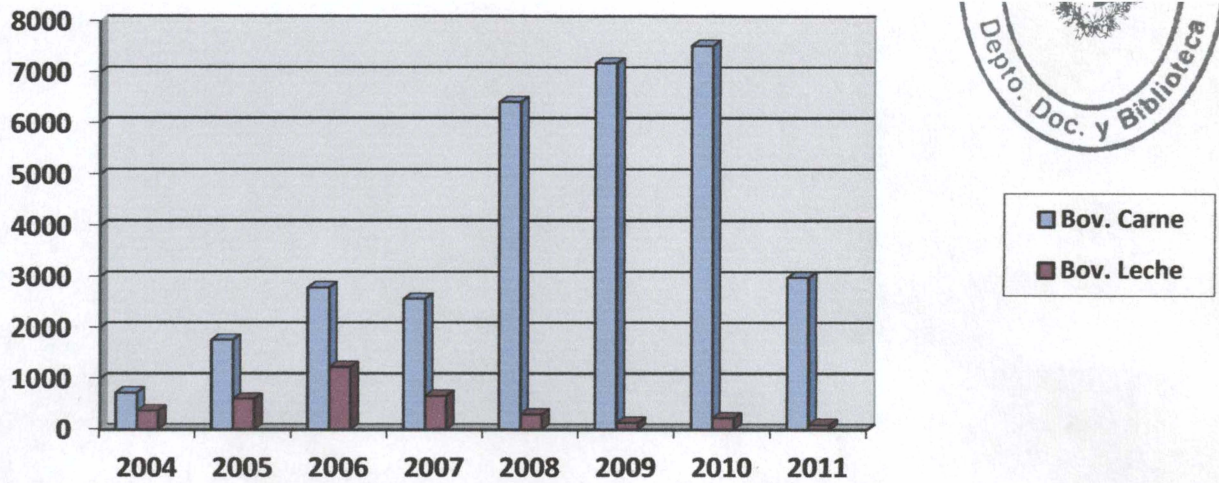


Gráfico 2. Bovinos indemnizados por brucelosis bovina (2004-2011).

Fuente: Fernández, 2011.

En la actual campaña sanitaria se han implementado una gran cantidad de recursos y esfuerzos, pero al no existir un consenso de todos los actores involucrados, resulta difícil llevar a cabo el objetivo de erradicación. Al aumentar la vigilancia epidemiológica aumenta la detección de focos, lo cual indica que aún permanecen focos sin detectar en el país. Existe un estudio nacional, el cual muestra a cuántos animales debe realizarse serología para detectar un foco entre los años 2005-2011 (Gráfico 3), aunque no discrimina el número de animales por foco, dato de interés teniendo en cuenta la epidemiología de la enfermedad. Basta la presencia de un animal positivo a la prueba confirmatoria para considerarse un foco.

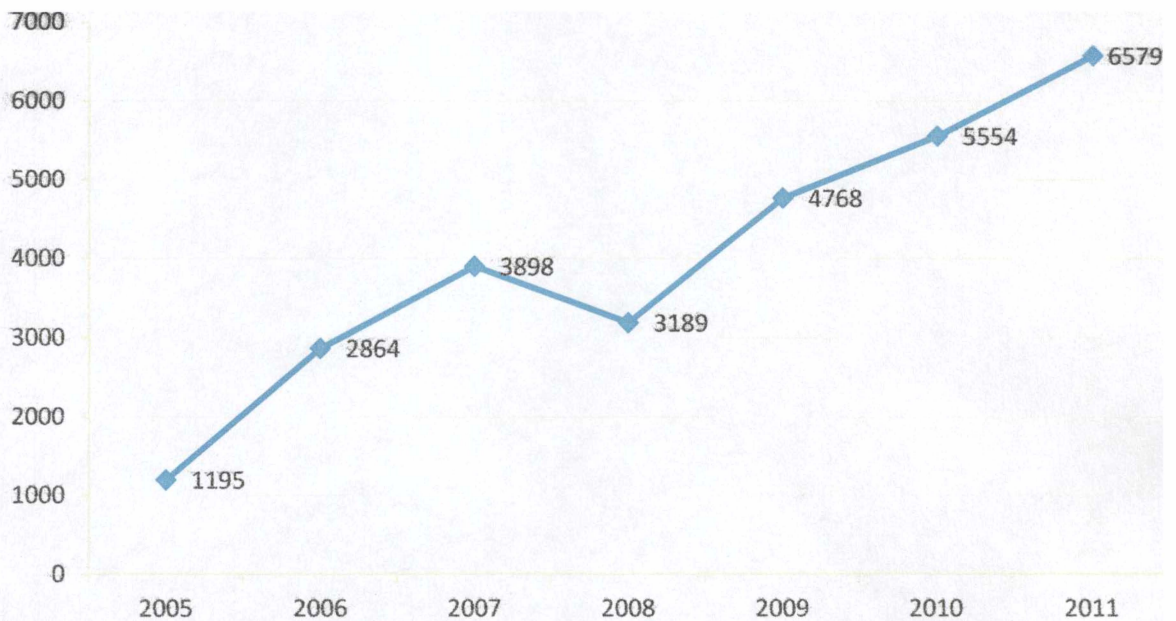


Gráfico 3. Número de sueros analizados por foco detectado por año (2005-2011).

Fuente: Gil, (2012).

4.6 IMPORTANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA

Al ser la brucelosis una zoonosis, la fuente de infección la constituyen las secreciones de animales infectados, en su mayoría son aquellas especies productoras de alimento. Los humanos la adquieren mediante el consumo de leche cruda o queso contaminado. *B. abortus* está más extendida en el mundo en comparación a las otras especies de *Brucellas*, sin embargo, se aísla poco de casos humanos (Mandell, 1995). 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 epizootiología de la enfermedad en nuestro medio rural. *B. melitensis* es la que a nivel mundial más se notifica como causa de enfermedad, aislándose con mayor frecuencia de los casos humanos (casi en un 90%) (Mandell, 1995). Es la especie más virulenta y está asociada a una

enfermedad aguda severa. La bacteria infecta principalmente a cabras y ovejas, pero también puede afectar otras especies, incluido al hombre.

Los animales infectados, excretan gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y otros productos del aborto; en menor cantidad por excreciones genitales, semen, orina que contaminan el ambiente (suelo, pasturas, agua). También se excreta en la leche y el calostro. La leche es una fuente de infección importante para la población que la consume sin ningún tratamiento térmico previo. Por consiguiente, tanto la población rural como la urbana pueden verse afectadas y contraer la infección. Es difícil determinar hasta qué grado el paso de los animales por ciertos caminos o rutas urbanas o suburbanas puede producir contaminación de zonas pobladas, teniendo en cuenta que la bacteria sobrevive períodos prolongados en el polvo, estiércol, agua, y en el suelo (Dornand y col., 2002).

El hombre puede adquirir la bacteria por exposición ocupacional, contacto con ambientes contaminados, consumo de agua y alimentos contaminados. 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 manteca, crema o helados preparados con leche contaminada y sin tratamiento térmico (Mandell, 1995). El consumo de carne no es una fuente de contaminación importante, excepto que sea carne cruda o mal cocida, proveniente de animales infectados (Mandell, 1995). Igualmente representa un riesgo menor, ya que el músculo contiene baja cantidad de *Brucellas* viables. En cambio las vísceras, la ubre y los testículos contienen cantidades importantes de bacterias, al igual que la sangre fresca (Mandell, 1995).

Brucella puede ingresar al organismo a través de lesiones de la piel, mientras se manipulan animales infectados o sus desechos, al inhalar polvo o pelo contaminado, por salpicaduras en la conjuntiva, por ingestión accidental, a través de abrasiones o lesiones de piel o por auto inoculación accidental de sangre del animal infectado o de vacunas vivas (Mandell 1995, Sauret y Vilissova, 2002).

En países en que la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección en humanos es frecuente (Roop y col., 1994, Yagupsky, 1999), sin

embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual (Fiori y col., 2000). En los casos reportados solo existe evidencia circunstancial, sugiriendo que la transmisión se produjo por vía sexual. De mayor importancia es la infección como resultado de una transfusión de sangre o de un trasplante de tejido, siendo el de médula ósea la de mayor riesgo (Yagupsky, 1999). 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.

En Uruguay la incidencia ha sufrido variaciones anuales en los últimos años dependiendo del número de focos en los animales. Por ejemplo en el año 2005, hubieron 5 casos humanos, año 2009, 22 y en el año 2010, 16 casos humanos. La prevalencia en Médicos Veterinarios es del orden del 0,32% (Gil, 2012).

4.7 ENFERMEDAD EN LOS HUMANOS

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, la dosis y del estado nutricional e inmune del individuo (López y Contreras, 2004). La enfermedad puede ser adquirida por exposición ocupacional de los trabajadores de mataderos, carniceros, empleados rurales y veterinarios, al inhalar aerosoles contaminados o en viajes a lugares donde la infección es endémica (Yagupsky, 1999). Las infecciones asociadas al trabajo de laboratorio representan el 2% de los casos y se ha informado que el período de incubación de la brucelosis adquirida por accidente en el laboratorio puede variar entre uno a cinco meses (Fiori y col., 2000). El predominio de un mecanismo de infección u otro dependerá de las condiciones socioeconómicas y de los hábitos de la población, 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 (Richey y Harrel, 1997, Dornand y col., 2002; López y Contreras, 2004).

La brucelosis humana ha sido clasificada en forma arbitraria en varias categorías: subclínica, subaguda, bacteriemia, 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, 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 y col., 2002).

Los pacientes presentan 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 causar dolor local. Tos, dolor de pecho, y dispepsia también pueden ser observados (Acha y Szyfres, 2001).

Los pacientes con infecciones crónicas presentan con frecuencia pérdida 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 *Brucellas*; *B. suis* causa principalmente una enfermedad supurativa localizada (Acha y Szyfres, 2001).

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

Las infecciones del pulmón también se han descrito, particularmente antes del advenimiento de antibióticos eficaces. Aunque hasta un cuarto de pacientes pueden presentar síntomas respiratorios, sobre todo 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 (López y Contreras, 2004).

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 es 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 y col., 2002; López y 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 y 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 (Rodríguez y col., 2002; López y Contreras, 2004).

En la actualidad existen otros sistemas de aislamiento y se cuenta también con métodos moleculares como la 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 ADN 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 y Contreras, 2004).

4.8 TRANSMISIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA

La forma principal de contagio de la Brucelosis bovina, es a través de 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 infectados se produce una ingestión masiva de bacterias (Rodríguez y col., 2005). 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 los pezones, en los extremos de los miembros o en el espacio interdigital que faciliten la penetración del agente patógeno. También durante el ordeño, las *Brucellas* pueden penetrar la piel de los pezones cuando las manos del ordeñador se encuentren humedecidas con leche infectada de otro animal (Rodríguez y col., 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 de *Brucellas* pero sin embargo no contagia a la vaca. La razón es que la acidez de la vagina contribuye a destruir a las bacterias (Rodríguez y col., 2002; Rodríguez y col., 2005).

La transmisión es menos frecuente por vía respiratoria, mediante la inhalación de polvo. Partículas que transportan *Brucellas*, puede tener importancia durante el verano cuando se reúnen los animales en corrales y mangas para realizar vacunaciones, desparasitaciones, etc. (Rodríguez y col., 2002; Rodríguez y col., 2005). 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 varía de acuerdo al estado fisiológico del animal. El período de incubación siempre es más corto en el animal preñado. Las vacas inmaduras sexualmente son poco susceptibles a *B. abortus*, ésta aumenta con el desarrollo sexual y con la gestación (Acha y Szyfres, 2001). El signo principal de la enfermedad es el aborto al final de la gestación (último tercio). 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 (Rodríguez y col., 2002; Rodríguez y col., 2005). Algunos experimentos demostraron que se pueden eliminar hasta 1×10^{14} *Brucellas* 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 infectado, en un rodeo con animales susceptibles. Pueden infectarse en útero o cuando los terneros nacidos de madres sanas son

alimentados con leche o calostro de hembras enfermas (Richey y Harrel, 1997; Rodríguez y col., 2005).

Una condición que debe tenerse en cuenta son las terneras hijas de madres positivas, las cuáles pueden padecer la infección en forma latente. Éstas se infectan durante la vida intrauterina, pero no son detectadas por las pruebas serológicas, durante la gestación (quinto y séptimo mes) se produce el aborto debido a la infección por brucelosis (Samartino, 2003; Casas, 2008).

Es aconsejable y prudente no destinar para el servicio esta categoría de alto riesgo y destinarla a engorde-faena. De no ser posible deberían mantenerse identificadas, apartadas del resto del rodeo y realizar un sangrado antes del quinto mes de gestación, con la finalidad de eliminarlas antes del parto/aborto en caso de estar infectadas (Samartino, 2003; Casas, 2008).

4.9 PATOGENIA Y SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD EN BOVINOS

Las especies de *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos, y su virulencia está relacionada con la capacidad que poseen para resistir el efecto bactericida de los componentes del suero normal y para adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucarióticas, tanto fagocíticas como no fagocíticas. La localización intracelular las mantiene protegidas de los antibióticos y de factores bactericidas del plasma como el sistema del complemento y anticuerpos, lo que determina la naturaleza crónica de la infección (Rodríguez y col., 2001).

De acuerdo a resultados obtenidos en experimentos de laboratorio controlados y cálculos estimativos de campo, alrededor de un 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 infectados con *B. abortus*.

La mayoría de los animales se infectan directamente a través de la mucosa oronasal, por ingestión de alimentos contaminados o por inhalación de polvo con microorganismos que los animales han secretado con la leche o los exudados vaginales después del aborto (Rodríguez y col., 2001). *B. abortus*, además de infectar al ganado bovino, puede infectar a otras especies como búfalos, bisontes, alces, jabalíes, zorros, renos, camellos y animales marinos (Mandell, 1995; Cloeckert y col., 2000). Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos períodos en el interior de las células fagocíticas (Llarmón y col., 1988). Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (Rodríguez y col., 2001). En los fagosomas de los macrófagos, *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio (Pizarro-Cerda y col., 1998, Celli y col., 2003, Ko y Splitter 2003). En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y la activación de una serie de pequeñas GTPasas (Guzmán- Berri y col., 2001), tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Corbel 1997). Su localización intracelular corresponde al área perinuclear de las células infectadas. La ubicación de *Brucella* en el RE de la célula huésped, pudiera ser una estrategia que le permitiría obtener metabolitos sintetizados o translocados al RE, en forma de péptidos pequeños, esenciales para su crecimiento.

El lipopolisacárido liso (S-LPS) posiblemente juega un papel importante, en la virulencia, ya que de forma natural las cepas lisas son más patógenas que las cepas rugosas, las cuales poseen virulencia reducida, sin embargo, existen en la naturaleza cepas rugosas que son patógenas, como *B. ovis* y *B. canis* y cepas lisas con virulencia reducida como *B. neotomae*. Lo anterior sugiere que el LPS no es la única molécula involucrada en la virulencia y que existen otros

factores como las proteínas superficiales que pueden participar en la interacción de *Brucella* con su célula huésped.

Por otro lado, se sabe que *B. abortus* escapa a la muerte dentro de los PMN, al producir guanosina 5' monofosfato (GMP) y adenina que inhiben la fusión fagosomalisosoma, la desgranulación y la activación del sistema mieloperoxidasahaluro y la producción del factor de necrosis tumoral. Además, *Brucella* produce Cu-Zn superóxido dismutasa, que probablemente participa en las fases tempranas de la infección intracelular (López y Contreras, 2004).

Dentro del macrófago, la bacteria debe enfrentarse a condiciones adversas como el pH, falta de nutrientes y presencia de intermediarios reactivos del oxígeno. *Brucella* debe resistir estas condiciones de estrés, para poder establecerse en el retículo endoplásmico. La supervivencia de *Brucella* dentro del macrófago, se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes (KatE y SodC). Estudios empleando mutantes de *B. abortus* catalasa-deficiente (katE) y Cu-Zn superóxido dismutasa deficiente (sodC) indicaron que estas enzimas juegan un papel fundamental en la protección de estos organismos contra la exposición al superóxido de hidrógeno y al oxígeno in vitro (Kim y col., 2000; Gee y col., 2001).

Una de las características interesantes acerca del parasitismo de *Brucella*, es que la bacteria es capaz de replicarse intracelularmente en grandes cantidades sin restringir las funciones celulares básicas o inducir daños obvios en las células. Por ejemplo, altos números de bacterias dentro del RE causan constricción en el núcleo de la célula, sin embargo, la invasión de este organelo nunca se logra. En esta misma dirección, procesos cruciales del ciclo celular como síntesis de ADN, condensación del cromosoma, mitosis, carioquinesis y citocinesis no son inhibidas, a pesar de que grandes cantidades de *Brucellas* se estén replicando dentro del RE (Gorvel y Moreno, 2002). Este fenómeno no se restringe a las células infectadas, puesto que las células vecinas no infectadas también están protegidas sugiriendo que este fenómeno es causado por una sustancia emanada por las células y puede ser promovido por la replicación de *Brucella*. Es difícil imaginar como una replicación masiva de una

bacteria intracelular parece no interferir con sus funciones fisiológicas importantes.

En este sentido, se especula que *Brucella* produce una colección de determinantes moleculares que promueven la supervivencia de la célula huésped y la proliferación celular para su propio beneficio (Gorvel y Moreno, 2002). Aunque los mecanismos que emplea *Brucella spp* para producir daño al huésped, aún no se conocen con detalle, se acepta que están muy relacionados con la permanencia intracelular de las bacterias. Esta ubicación intracelular, que la mantiene alejada de los antibióticos y de los componentes plasmáticos bactericidas como el complemento y los anticuerpos, probablemente determina la naturaleza crónica de la enfermedad (López y Contreras, 2004).

En infecciones experimentales en ratones, se ha observado que la infección tiene dos fases: durante las primeras dos semanas la bacteria se multiplica rápidamente; en la segunda fase, el número de bacterias se estabiliza hacia la quinta o sexta semana y luego decrece lentamente hasta desaparecer (Hong y col., 2000).

La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal de bovinos hace que también proliferen extensamente en trofoblastos de la placenta que rodean al feto (Meador y Deyoe, 1989), lo que condiciona que la principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación, o el nacimiento de animales prematuros poco viables (Ficht, 2003). Por lo general el aborto se produce en la segunda mitad de la gestación, con retención de placenta, y en consecuencia con metritis que puede ser causa de infertilidad permanente (Acha y col., 1986). Uno de los signos más frecuentes es la fiebre ondulante (Voigt y Kleine, 2001). En bovinos machos provoca alteraciones testiculares (orquitis, epididimitis) y en glándulas genitales anexas (vesiculitis seminal, ampollitis), disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo (Hausler y Koontz, 1974).

Además de la afección de los órganos genitales puede causar: bursitis, artritis, higroma, mastitis, debilidad, dolores articulares, trastornos gastrointestinales, hepatitis, endocarditis, neumonía, espondilitis (Voigt y Kleine, 2001).

4.10 RESPUESTA INMUNE PRODUCIDA EN BOVINOS POR LA INFECCIÓN CON *B. ABORTUS*

De un modo general, como resultado de una infección por bacterias Gram negativas, las células del huésped se exponen principalmente a dos diferentes categorías estructurales de antígenos, el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas, los que ejercen diferentes formas de activación del sistema inmune. Las proteínas bacterianas antigénicas inducen una respuesta inmune específica tanto celular como humoral con células de memoria funcionales. La primera es más importante porque se le relaciona con la inmunidad protectora. Una vez que la bacteria es ingerida, muerta, y procesada sus antígenos proteicos se localizan en compartimientos dentro de las células presentadoras de antígeno y se procesan hasta pequeños péptidos (de 8 a 12 residuos), quedando listos para asociarse con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Estas moléculas presentadoras, que son heterodímeros, se translocan desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi antes de alcanzar la vía endocítica a través de la cual serán presentados en la superficie de la célula. Los linfocitos TCD4⁺ reconocen péptidos asociados al MHC clase II y los T CD8⁺ interaccionan con péptidos asociados al MHC clase I (Janeway y col., 2003).

Las moléculas de carbohidratos y glicolípidos como el LPS, se consideran tradicionalmente como antígenos T- independientes, basado en observaciones que muestran que estas moléculas son capaces de activar linfocitos B, que inducen la producción de anticuerpos sin la aparente participación de las células T. El LPS no induce una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado como las proteínas (López y Contreras, 2004).

Los antígenos proteicos se presentan a células T cooperadoras (Th) con fenotipo CD4+, en general. Sin embargo, algunos antígenos de *Brucella* se expresan en el contexto del MHC de clase I, que provoca la activación de células T citotóxicas (Tc), con fenotipo CD8+. Las células Th incluyen a dos subpoblaciones que se distinguen entre ellas por sus funciones.

Las Th1 que controlan la respuesta de tipo celular, por medio de ciertas citoquinas, en cambio las Th2, controlan la respuesta de anticuerpos (humoral) por el mismo mecanismo. Las células Th1 participan en forma directa en la protección hacia patógenos intracelulares, produciendo IL-2 e IFN- γ que induce la activación de macrófagos con mayor capacidad bactericida. Ambas subpoblaciones regulan la producción de los diferentes isotipos de anticuerpos en forma selectiva al producir distintas citoquinas (López y Contreras, 2004). Sin embargo la respuesta inmune celular de tipo Th1, es la que controla la infección y la eliminación completa de las bacterias (López y Contreras, 2004).

En cuanto a la respuesta inmune innata frente a la infección con *B. abortus*, los macrófagos que son células fagocíticas y presentadoras de antígeno capaces de modular la respuesta inmune a través de la producción de diferentes citoquinas (Liautard y col., 1996), son la principal célula blanco en la infección con esta bacteria. El tipo de fagocitosis, la naturaleza del receptor utilizado y la activación de esta célula son variables críticas para determinar el desarrollo de la infección; así, se ha demostrado que cepas rugosas (desprovistas de la cadena O del LPS) y lisas (con la cadena O del LPS) de *B. abortus* son rápidamente ingeridas sólo si son opsonizadas con proteínas del complemento o anticuerpos específicos (Harmon y col., 1989). En macrófagos bovinos, derivados de glándula mamaria, las cepas virulentas de *Brucella abortus* presentan una mayor tasa de sobrevivencia y replicación, comparada con cepas rugosas o no virulentas (Harmon y col., 1989). Se ha sugerido que la cadena O del LPS es un factor esencial de este patógeno para la sobrevivencia en ratones (Godfroid y col., 2002). Una vez la bacteria ha sido fagocitada, es expuesta al medio hostil de los compartimentos fagolisosomales dentro de la célula fagocítica. El ensamblaje de esta estructura puede ser inhibido por cepas virulentas de *B. abortus*, mediante extractos de superficie (proteínas, azúcares, aminoácidos y carbohidratos) no relacionados con los LPS, que inhiben la

fusión fagosoma-lisosoma (Frenchick y col., 1984). La explosión respiratoria juega un papel muy importante en el proceso antibacterial de las células fagocíticas. Sólo las cepas de *Brucella* opsonizadas son capaces de inducir la liberación de cantidades significativas de radicales de oxígeno en macrófagos derivados de bovinos resistentes a la infección por *B. abortus*, comparado con macrófagos derivados de animales susceptibles (Harmon y col., 1985; Harmon y col., 1989). In vitro, líneas celulares de macrófagos y macrófagos peritoneales murinos, producen especies derivadas del nitrógeno reactivo, como el óxido nítrico, después de la activación con interferón gamma (IFN γ) y la infección con diferentes especies de *Brucella* (Jiang y col., 1993; Gross y col., 1998, 2000).

Las células fagocíticas tienen otros tipos de mecanismos diferentes a los radicales derivados del oxígeno, como las enzimas hidrolíticas y los haluros reactivos; sistemas esencialmente encontrados en los polimorfonucleares (PMNs) neutrófilos. Los PMNs utilizan los componentes de sus gránulos para la destrucción de microorganismos invasores. Se ha demostrado que la degranulación de estas células puede ser inhibida por *B. abortus* (Riley y Robertson, 1984; Bertram y col., 1986); esto se evidenció por un proceso inhibitorio activo de la iodación de proteínas por los PMNs: en la presencia de extractos crudos de *B. abortus* (Canning y col., 1985), donde la 5' guanosina monofosfato (GMP) y la adenina han sido identificadas como los componentes bacterianos involucrados en este proceso (Canning y col., 1986).

Adicionalmente, se ha demostrado que algunos componentes de la membrana externa de la *Brucella spp*, como el lípido A del LPS, juega un papel importante en la resistencia a los péptidos catiónicos bactericidas. De esta manera el LPS se considera un factor de virulencia que genera una eficiente barrera protectora cuando la bacteria se expone a la actividad digestiva de los fagocitos (Harmon y col., 1989; Martínez y col., 1995; Freer y col., 1996).

El gen *Nramp1*, que codifica la proteína del macrófago asociada con resistencia natural a patógenos intracelulares como *Mycobacterium* y *Salmonella* (Saldarriaga y col., 2002), ha sido ubicado en el cromosoma 2 bovino (Feng y col., 1996). Macrófagos derivados de bovinos seleccionados por la resistencia

in vivo a la infección por *B. abortus*, restringieron la replicación intracelular, a *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) y *Salmonella dublin*, significativamente mejor que macrófagos derivados de animales susceptibles (Qureshi y col., 1996). Estos mismos autores encontraron asociación significativa entre un polimorfismo del 3' UTR de gen *Nramp1* bovino y la resistencia natural de ganado a la Brucelosis. La sobrevivencia de esta bacteria dentro de células fagocíticas y no fagocíticas, puede ser también aumentada por la expresión de proteínas como la enzima superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) (Tatum y col., 1992; Kim y col., 2000; Gee y col., 2001) y la proteasa de respuesta a temperaturas aumentadas (HtrA) (Elzer y col., 1996; Gajiwala y Burley, 2000). Estas proteínas juegan un papel importante en la patogenicidad inducida por la *B. abortus* ya que son importantes componentes de defensa contra la respuesta oxidativa generada por el hospedero.

Cuando un macrófago ingiere una bacteria, inicia una serie de mecanismos seleccionados que pueden inducir la muerte del invasor. Sin embargo, la bacteria patogénica tiene desarrollados mecanismos moleculares para evitar el ataque del fagocito (Köhler y col., 2002). Cuando el ataque falla, los macrófagos algunas veces pueden inducir su propia apoptosis para evitar la multiplicación bacteriana intramacrofágica (Müller y col., 1996; Monack y col., 1997; Ruckdeschel y col., 1998; Weinrauch y Zychlinsky, 1999). La inducción o prevención de la apoptosis de la célula huésped parece ser un paso crítico en la determinación del resultado de la infección. Se ha demostrado que *B. suis* inhibe espontáneamente la apoptosis en monocitos humanos (Gross y col., 2000). La prevención de la apoptosis del monocito no es mediada por el lipopolisacárido de *Brucella* y requiere la supervivencia bacteriana dentro de las células infectadas. Las células invadidas y no invadidas están protegidas, indicando que mediadores solubles emanados durante la infección están envueltos en este fenómeno (Dornand y col., 2002).

En cuanto a la respuesta inmune adaptativa humoral, se ha visto que el LPS es el primer antígeno frente al cual aparecen inmunoglobulinas de tipo M (IgM) e IgG, después de la infección natural o de la vacunación con la cepa 19 (Winter y col., 1989; Corbel, 1997). Ya que los anticuerpos pueden opsonizar las cepas patógenas, nuevas células fagocíticas podrían ser invadidas, potenciando la

infección y promoviendo el establecimiento de la brucelosis bovina (Hofmann y Houle, 1983; Baldwin y Parent, 2002). Los anticuerpos tipo IgG también pueden proteger al huésped contra la liberación de grandes cantidades de endotoxinas (Hofmann y Houle, 1995). También se ha demostrado la producción de anticuerpos contra proteínas de membrana, como las OMPII (Gómez y col., 1995; Villamil y col., 1995). Si bien es cierto que la respuesta humoral ante estas proteínas no es tan fuerte como la observada contra el LPS, estos anticuerpos son importantes para el diagnóstico, cuando se utilizan cepas vacunales rugosas. De esta manera, otros antígenos, probablemente proteicos, podrían estar involucrados en la protección contra cepas lisas virulentas, ya que bovinos vacunados con cepas rugosas (RB51), aunque no producen anticuerpos contra el LPS de cepas lisas (2308), sí producen anticuerpos que reaccionan contra proteínas de estas cepas virulentas (Stevens y Steven, 1996).

Por otro lado, en cuanto a la inmunidad mediada por células, se presumen que una respuesta inmune mediada por células es de vital importancia para eliminar o proteger el huésped de la infección por este organismo, teniendo en cuenta que *Brucella* es capaz de replicarse en el medio ambiente intracelular.

Aunque en ratones la resistencia adquirida a la infección es el resultado de los efectos independientes o probablemente interactivos entre los anticuerpos y las células T efectoras de ambos fenotipos CD4+ y CD8+ (Araya y col., 1989), esta inmunidad protectora mediada particularmente por los linfocitos TCD8+ ha sido demostrada por ensayos con ratones knockout para las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I y II (Oliveira y Splitter, 1996; Oliveira y col., 2002).

Algunas citoquinas proinflamatorias y derivadas de la célula T han sido detectadas en sobrenadantes de esplenocitos derivados de animales sensibilizados, reestimulados con antígenos de *Brucella*. El papel de estas moléculas en el control de la infección, ha sido investigado por el uso de citoquinas recombinantes o por la inhibición específica de sus funciones, utilizando anticuerpos monoclonales. Se ha demostrado que monocitos humanos (Zaitseva y col., 1996) y células adherentes derivadas de bazo

murino (Olivera y col., 1998), expresan IL-12, después de una estimulación in vivo con *B. abortus* y con LPS derivados de esta bacteria. Esta inducción puede ser suprimida por anticuerpos monoclonales anti CD14, lo cual sugiere que los monocitos reconocen a *B. abortus* por medio de su receptor para LPS. Esta producción rápida de IL-12 durante la infección con *B. abortus*, es de vital importancia para activar las células Th1 productoras de IFN- γ y de esta manera contribuir a la inducción de la resistencia celular adquirida. La supresión de la IL-12 endógena antes de la infección de ratones con *B. abortus* aumenta significativamente la infección por *Brucella*, probablemente por la disminución en la producción de IFN- γ por las células T de bazo, observada en estos ratones. Bajos niveles de IFN- γ no alcanzaron a estimular adecuadamente los macrófagos derivados de bazo, quienes a su vez mostraron una disminución en la producción de óxido nítrico (Zhan y Cheers, 1995). La IL-12 inducida por *B. abortus*, también ha mostrado un gran efecto sobre células NK, ya que en éstas se promueve una eficiente actividad citolítica contra células tumorales o células infectadas con patógenos intracelulares (Zaitseva y col., 1996). El IFN- γ ha sido claramente involucrado en la resistencia durante la infección por *B. abortus*, ya que macrófagos murinos activados por esta citoquina controlaron efectivamente la replicación intracelular de las cepas de *B. abortus* 19 y 2308 in vitro (Jiang y Baldwin, 1993; Baldwin y Parent, 2002); además, la neutralización de IFN- γ endógeno in vivo resultó en una marcada disminución de la habilidad del ratón para controlar la infección con la cepa atenuada 19 de *B. abortus* (Zhan y Cheers, 1993).

En humanos, *B. abortus* induce la secreción de IFN- γ en células TCD4⁺ y TCD8⁺, demostrando de nuevo la capacidad de esta bacteria para promover el patrón Th1 de diferenciación de la célula T (Zaitseva y col., 1995; Murphy y col., 2001). Sin embargo, aunque es conocido que la *B. abortus* induce el patrón Th1 de las células TCD4 (Zhan y col., 1993), las cepas 19 y 2308 de *B. abortus* pueden persistir en los bazos de ratones BALB/c infectados, entre 6 semanas y 6 meses respectivamente (Ho y Cheer, 1982; Montaraz y Winter, 1986). Adicionalmente, una respuesta Th1 con producción de IFN- γ puede promover la secreción de anticuerpos; como por ejemplo, en ratones los

isotipos IgG3 e IgG2a, dirigidos contra el LPS de la cepa lisa de *Brucella*, han mostrado ser protectores (Ho y Cheer, 1982; Montaraz y Winter, 1986).

De igual manera el factor de necrosis tumoral (TNF- γ), una citoquina proinflamatoria producida durante la fase temprana de la infección intracelular, también está involucrada en la resistencia a *Brucella abortus* (Zhan y col., 1996). Sin embargo, se ha demostrado que algunos subproductos proteicos de alto peso molecular derivados de la *Brucella* inhiben específicamente la expresión de TNF- γ , y por lo tanto se han considerado como factores de virulencia (Caron y col., 1996).

La inducción de TNF- γ y de los patrones Th1 y Th2 por cepas vivas y muertas de *Brucella* es diferente. Así, cantidades sustanciales de TNF- α , fueron detectadas en los sobrenadantes de macrófagos peritoneales bovinos, después del desafío con la *Brucella* viva. Por el contrario, estas células estimuladas con bacterias muertas por calor, no produjeron TNF- α (Zhan y Cheers, 1995b).

De igual forma, células de bazo derivadas de ratones infectados con *Brucella* viva produjeron IFN- γ e IL-2 en respuesta a antígenos de *Brucella in vitro*, mientras que las mismas células derivadas de ratones inoculados con proteínas solubles de *Brucella*, produjeron cantidades significativas de IL-2 y de IL-4, pero no de IFN- γ (Zhan y col., 1993, 1995). Utilizando la misma metodología se ha determinado el perfil de otras citoquinas proinflamatorias, como por ejemplo la IL-1, la cual fue producida en bajas cantidades en respuesta a la bacteria viva o muerta y la IL-6 la cual se produjo en altas cantidades pero tampoco difirió significativamente entre la respuesta inducida por la bacteria viva y la inactivada (Zhan y Cheers, 1995b). De esta manera, queda reconocido el papel de la forma del antígeno y su influencia en la determinación de la respuesta inmune. La IL-10 es una citoquina involucrada en la regulación negativa de la respuesta inmune protectora contra *B. abortus*, mediante la inhibición de patrón Th1 o bloqueando las citoquinas inducidas por la activación del macrófago (Fernández y Baldwin, 1995). La inmunización de ratones con *B. abortus* inactivada, induce un incremento simultáneo de la expresión de genes de IL-10 y de IFN- γ en células TCD4+, independiente de la IL-2, sugiriendo que en la respuesta inmune primaria ambos patrones de

citoquinas son producidos. Además, aquí probablemente se está presentando un mecanismo de regulación fisiológica donde la respuesta inflamatoria es regulada negativamente por la IL-10 producida endógenamente (Svetic y col., 1993). De igual manera ratones deficientes en MHC clase I, donde no hay activación de células TCD8+, produjeron mayor cantidad de IL-10 que esplenocitos derivados de ratones con deficiencia en MHC de clase II. Los altos niveles de IL-10 se correlacionaron con un incremento de la susceptibilidad a la infección por brucelosis en ratones deficientes de MHC de clase I. Se sugiere entonces que las células TCD8+ pueden inhibir la producción de IL-10; por esto la brucelosis murina es más grave en ratones defectuosos para MHC de clase I (Olivera y col., 1998).

La identificación de antígenos derivados de esta bacteria, que puedan inducir una inmunidad mediada por células protectoras (Th1) ha sido el objetivo de varios estudios. El uso de una proteína ribosomal L7/L 12, producida por tecnología recombinante en *E. coli*, estimuló un perfil Th1 (IFN- γ e IL-2) en ratones infectados con *B. abortus* (Oliveira y Splitter, 1996). Además la inmunización de ratones con esta proteína, confiere protección contra la infección producida por *B. abortus* (Oliveira y Splitter, 1996). Otros componentes proteicos derivados de esta bacteria, como las proteínas de la membrana externa (OMP II) y la superóxido dismutasa (SOD Cu/Zn), han mostrado inducir una inmunidad mediada por células en bovinos (Montaña y col., 1998; Oñate y Folch, 1995).

La *B. abortus* inactivada, también indujo altos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras B7.1-, B7.2 y de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) sobre monocitos humanos, de tal forma que esta bacteria puede aumentar las interacciones de las células presentadoras de antígeno (CPA) con las células T, sugiriendo el potencial uso de esta cepa inactivada como una vacuna que favorece una amplia respuesta inmune celular (Zaitseva y col., 1996).

Ya que los linfocitos T derivados de diferentes hospederos como humanos, ratones y bovinos, proliferan mostrando un perfil de citoquinas Th1 de manera análoga en respuesta a la infección por *Brucella* (Olivera y col., 1998), las

vacunas deberían preferencialmente inducir un patrón Th1, para generar una óptima resistencia contra la infección inducida por esta bacteria. La inducción de una respuesta Th2 parece ser contraproducente para el control de la infección causada por *B. abortus* (Saldarriaga y col., 2002).

4.11 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico definitivo de Brucelosis se establece a partir del aislamiento, detección de antígenos bacterianos o amplificación del genoma del microorganismo (métodos directos) a partir de cultivos de sangre, médula ósea, leche, suero lácteo, moco vagina, plasma seminal u otros tejidos. Los métodos serológicos (indirectos) brindan un diagnóstico presuntivo para la enfermedad (Castro y col., 2005).

4.11.1 Diagnóstico Directo

Se basa en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en materiales provenientes de animales reaccionantes a las pruebas serológicas. Estas pueden proceder de fetos abortados, ganglios retromamarios, leche, útero grávido o no (D' Antro, 2003). Las mejores muestras para el cultivo son el contenido estomacal, hígado y bazo de fetos abortados y de terneros a término infectados. Los ganglios linfáticos asociados con el tracto gastrointestinal también dan habitualmente positivos en los cultivos de *Brucellas* (Scanlan, 1988).

4.11.1.1 Aislamiento

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 *Brucellas* son bacilos cortos Gram negativos de 0.5 x 0.5 hasta 1.5 mm de largo. Al emplear la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, las *Brucellas* se tiñen de color rojo y se observa la misma morfología. El aislamiento de *B. abortus* puede llevarse a

cabo 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 CO₂) (Rodríguez y col., 2002; López y Contreras, 2004).

En medio TSA, las cepas lisas (S) producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidos 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 *Brucellas* son positivas. Enseguida, se procede a aglutinar a las colonias sospechosas con suero polivalente anti *Brucella*. Se recomienda realizar la suspensión de *Brucellas* en solución salina fenolada al 1.0% extremando las precauciones. Si hay aglutinación, muy probablemente se trate de bacterias del género *Brucella* (Rodríguez y col., 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 CO₂ y el otro en atmósfera normal, a 36° C por 48 horas antes de que se desarrollen mutantes independientes de CO₂. 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 *Brucellas* y la ausencia de indol y H₂S. 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 y Contreras, 2002).

El cultivo tiene una sensibilidad de 46,1% y una especificidad de 100% (Gall y Nielsen, 2004).

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 (Mac Millan, 1990).

Es preciso tener en cuenta que esta enfermedad es una importante zoonosis y todos los trabajos de manipulación de muestras, siembras, deben realizarse adoptando las máximas precauciones (Blasco, 2001).

4.11.1.2 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La identificación genómica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye otro método para la identificación de *Brucella*, que a diferencia de los cultivos bacteriológicos, permite trabajar con organismos muertos, hecho que evita el riesgo de infección para el operador (Mullis y Faoona, 1987).

PCR ha sido incorporada en la detección de *Brucella* a nivel de género, con la utilización de diversas secuencias como blanco: entre ellos, el gen de la proteína de 43 kDa de membrana externa de *Brucella abortus* (Fekete y col., 1990); el gen que codifica el ARN ribosomal 16S de *B. abortus* (Hernan y Ridder, 1992); el gen *omp2*, que codifica una proteína de la membrana externa del patógeno (Leal-Klevezas y col., 1995).

Los análisis genéticos por PCR con la utilización de los cebadores mencionados, han permitido amplificar secuencias de *Brucella* a partir de muestras de sangre y/o de leche de caprinos y humanos (Leal-Klevezas y col., 1995), ovinos, bovinos (Martinez-Soriano y col., 1993).

La especificidad de la prueba es elevada, debido a que no hay amplificación de los genomas de organismos relacionados filogenéticamente (Perry y Bundle, 1990; Yanagi y Yamasoto, 1993). La sensibilidad es de 82% y la especificidad es de 98,6% (Gall y Nielsen, 2004).

4.11.1.3 ELISA (Inmunoanálisis enzimático) Directo

Se basa en la detección de antígenos mediante anticuerpos (Acs) específicos para *Brucella*. Las placas previamente impregnadas con el primer anticuerpo monoclonal, es sembrada con las soluciones en las que se sospecha la presencia del antígeno. Posteriormente se incuban con el anticuerpo conjugado y luego del lavado, se releva la reacción utilizando el sustrato específico para la enzima.

Esta técnica tiene como principales ventajas, la posibilidad de procesar muchas muestras a la vez, y que permite la cuantificación de antígenos bacterianos en las muestras analizadas. Tiene una sensibilidad de 97,7% y una especificidad de 90,5% (Gall y Nielsen, 2004.)

4.11.2 Diagnóstico indirecto

4.11.2.1 Prueba de Aglutinación lenta en Tubo (SAT)

Precursora de las pruebas serológicas actuales, todavía se sigue empleando en algunos países como prueba base, asociada a una prueba complementaria. Esta prueba pone en evidencia a los anticuerpos IgG2 e IgM, aunque es más eficiente en aglutinar los anticuerpos IgM que los IgG (Tizard, 1995).

Presenta una sensibilidad de 75,9% y una especificidad de 95,7% (Gall y Nielsen, 2004).

Tiene varias desventajas, la principal es la dificultad de detectar eficazmente la infección crónica o titulaciones bajas y difíciles de interpretar. Por tal razón la OIE no la recomienda como una prueba diagnóstica actualmente (OIE, 2010).

4.11.2.2 Prueba de aglutinación con 2 - mercaptoetanol (2-ME)

Esta prueba es una variante de la anterior, que emplea el tratamiento previo con 2 – ME como agente reductor, que inactiva los anticuerpos de la clase IgM y no produce efectos sobre los anticuerpos IgG (Castro y col., 2005). Tiene una sensibilidad de 88,4% y una especificidad de 91,5 (Gall y Nielsen, 2004).

4.11.2.3 ELISA (Inmunoanálisis enzimático)

La prueba de ELISA indirecta es sencilla, puede detectar anticuerpos tipo IgG1, IgG2 e IgA; principalmente detecta IgG1 en suero bovino. Presenta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 93,8% (Gall y Nielsen, 2004). Puede ser usada también en muestras de leche. Esta prueba es altamente sensible en la leche pudiendo detectar anticuerpos en bajas diluciones (López y col., 1998; Nielsen, 2002).

Existe un trabajo nacional donde utilizaron diferentes técnicas (ELISA, PAL y FPA), para determinar la probabilidad de detección de un rodeo con una vaca positiva a *Brucella abortus* en función del número de vacas en ordeño, la que logró mejor desempeño fue ELISA, seguido de FPA, y luego PAL (Gil, 2012). Si

bien la probabilidad de detección disminuye a medida que aumenta el tamaño del rodeo, ELISA mantiene un alto nivel de detección comparándola con las otras técnicas.

Por otro lado, debido a que varias pruebas no son capaces de diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos producidos por la infección, se desarrolló la prueba de ELISA competitiva, utilizando como antígeno LPS proveniente de *B. abortus*, teniendo una alta sensibilidad y especificidad. De este modo, esta prueba es capaz de diferenciar anticuerpos vacunales de los anticuerpos de campo, utilizándose como prueba de confirmación (Blasco, 2001; Nielsen, 2002; Dájer y col., 2003)

4.11.2.4 Rosa de Bengala

La prueba de rosa de Bengala puede utilizar dos tipos de cepas, *B. abortus* S99 o S1119.3 teñidas con rosa de Bengala con un pH de 3.65. El bajo pH previene algunas aglutinaciones por IgM y favorece la aglutinación por IgG1; de este modo reduce las reacciones no específicas (Davies, 1971, Alton y col., 1979, Nielsen, 2002). Es una prueba cualitativa muy sensible que detecta IgG1 y su positividad persiste por mucho tiempo, con la ventaja de realizarse en el suero sin diluir, además de presentar escasísimos fenómenos de prozona, por lo que su negatividad descarta prácticamente la enfermedad (Casas, 1976).

La prueba de rosa de Bengala es altamente sensible, siendo uno de los valores de sensibilidad de 96.2% y de una especificidad de 95.8% (Davies, 1971). Samartino y col. (1999) determinaron la sensibilidad de Rosa de Bengala en 96.1% y especificidad en 97.8%, mientras que Navarro (1995) determinó la sensibilidad de la prueba en 94.2% y especificidad de 92%.

La prueba de Rosa de Bengala presenta además, cualidades tales como su simplicidad al ejecutar la prueba (permite la realización de la prueba a campo, reduciendo la necesidad del envío de un número de muestras hacia un laboratorio especializado), el tiempo dedicado a la ejecución es mínimo, y por ello es considerada como prueba tamiz o base para el diagnóstico en

programas que se encuentren en término de erradicar la brucelosis (Casas, 1976; Moyer y col., 1987; Megid y col., 2000).

La prueba Rosa de Bengala al ser altamente sensible, sobre todo en poblaciones que presentan animales vacunados con cepas lisas como la vacuna *B. abortus* cepa 19, da como resultado mayor número de falsos positivos, por tanto es recomendado utilizarla como prueba tamiz en poblaciones donde no se procede a la vacunación, como también en poblaciones que presenten prevalencia baja (Samartino y col., 1999).

Los resultados de falsos negativos en la prueba Rosa de Bengala podrían atribuirse al tiempo de incubación de la infección. Es decir, se procede a la toma de muestra en el animal cuando se encuentra en una incubación temprana de la enfermedad donde los anticuerpos predominantes son los IgM y no los IgG (anticuerpo detectables para la prueba) (Erasmus, 1987).

4.11.2.5 Rivanol

La prueba de rivanol es una herramienta útil en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Es un colorante de acridina que sedimenta las proteínas del suero, entre ellas los anticuerpos de tipo IgM que predominan en el caso de vacunación o de infección primaria, quedando los de tipo IgG, que se encuentran en mayor cantidad en estimulaciones inmunológicas posteriores (Díaz y col., 1994).

Para lograr una buena aglutinación se utiliza una solución de rivanol al 1 % junto con el suero del animal a probar, en una proporción de 1:1. Esta reacción provocará la sedimentación de las IgM y un sobrenadante rico en IgG. Se utiliza un antígeno de *Brucella abortus* especialmente sensible para compensar el efecto de la dilución de los anticuerpos. Tiene una sensibilidad del entorno del 83% y una especificidad del 93% (Díaz y col., 1994).

4.11.2.6 Fijación de Complemento (FC)

Detecta los anticuerpos de los tipos IgG1 e IgM (aunque la IgM en gran parte es destruida por el calor durante la inactivación del complemento del suero mientras que la IgG2 no fija complemento). Se la considera la prueba más

sensible y precisa. Presenta el inconveniente de ser delicada y larga de efectuar (Fensterbank, 1989). Las técnicas de ejecución de la prueba difieren de un laboratorio a otro; las principales son: Fijación en frío y fijación en caliente, la macrotécnica en tubos y la microtécnica en placa.

El 50% de hemólisis se clasifica positivo en bovinos con títulos de 1:10 o superiores y sospechosos a los títulos de 1:5. Es una prueba laboriosa y complicada, pero valiosa por su alta especificidad (cerca del 99%); sin embargo, es de uso limitado debido al tiempo que se invierte en su estandarización, así como por su complejidad técnica que requiere de personal calificado (Dájer-Abimerhi y col., 1995).

Navarro (1995) determina valor de sensibilidad que va de 96 a 98.8% y especificidad entre 99.4 hasta el 100%. Se considera determinante en el diagnóstico confirmatorio de los sueros positivos a la prueba de rosa de Bengala (García-Carrillo, 1981).

Se basa en la activación del complemento por la vía clásica, en donde es necesaria la presencia de una unión antígeno-anticuerpo para iniciar la reacción (fase invisible). Cuando existen anticuerpos contra *Brucella spp.*, se da la reacción antígeno anticuerpo y el complemento se une a esta reacción (Ag-Ac-C'), siendo incapaz de unirse al sistema hemolítico, que es un segundo sistema antígeno anticuerpo (fase visible), observándose una sedimentación de los glóbulos rojos con anticuerpos o hemolisina. En ausencia de anticuerpos contra *Brucella spp.* en el primer sistema durante la fase invisible, el complemento queda libre, uniéndose al segundo sistema antígeno-anticuerpo o sistema hemolítico, observándose una hemólisis (Alton y col., 1988).

Por tanto, si el suero presenta anticuerpos contra *Brucella spp.*, el complemento no va a estar disponible y por tanto, no se va a producir la lisis de los eritrocitos sedimentándose y, por consiguiente, se formará en el fondo del tubo un botón de eritrocitos, dando la prueba como positiva. Ésta se realiza en varias diluciones para determinar la cantidad de anticuerpos existentes en la muestra del animal (Blasco, 2001; Nielsen, 2002).

4.11.2.7 Prueba del anillo en leche o “Milk ring test”

Una adaptación de la prueba de aglutinación utilizando el antígeno teñido con hematoxilina, detecta los anticuerpos existentes en la leche, ya sea procedentes de la sangre por filtración (IgM) o bien producidas localmente en la glándula mamaria (IgA).

El antígeno se une con el anticuerpo (si está presente), formando un complejo junto con los glóbulos de grasa, que asciende por efectos del calor y forma una capa de crema coloreada de azul oscuro (anillo de color azul). Si no existen anticuerpos contra *Brucella*, el antígeno permanecerá suspendido en la leche, dando un color homogéneo azul, bajo una capa de crema blanca similar a un anillo de color blanco (Díaz y col., 2000). La sensibilidad es de 89,5% y la especificidad es de 74,5% (Gall y Nielsen, 2004).

Por su baja sensibilidad puede causar interpretaciones erróneas en mastitis, calostro y leche de la etapa final de lactación (Fensterbank, 1989; López y col., 1998; William, 1999; Nielsen, 2002).

4.11.2.8 Polarización fluorescente (FPA)

Entre las nuevas técnicas que más recientemente se ha incorporado en diversos países para el diagnóstico de la brucelosis, se encuentra la FPA. Es una técnica sencilla que puede realizarse en el laboratorio y en otras circunstancias en el campo. Es una prueba homogénea que, al no requerir la separación de los compuestos analizados, es muy rápida de efectuar. El mecanismo se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución. El tamaño molecular es el factor principal que influencia la velocidad de rotación. Por ejemplo, una molécula pequeña gira a una velocidad más alta que una molécula grande. En este caso la molécula pequeña es el antígeno (*Brucella abortus*) marcado con isotiocianato de fluoresceína que emitirá una reacción que puede medirse por la luz polarizada. Sin embargo, si esta molécula se une a los anticuerpos en solución, aumentará su tamaño y la velocidad de rotación de las mismas descenderá, provocando una medida menor. El FPA se hace en tubos aunque puede hacerse también en placas de 96 pocillos: luego de diluir el suero bovino 1-100 en buffer específico, se coloca en 2 mL de dicho buffer y

se lee en un lector de polarización de fluorescencia. Seguidamente se le agrega el antígeno, se espera dos minutos, se vuelve a leer y se obtiene el resultado definitivo. Las medidas de lectura se expresan en unidades de milipolarización (umP) (Samartino y col., 2007).

Tiene una sensibilidad de 94.9% y una especificidad de 99.4% (Nielsen, 2002). Una de las ventajas prácticas de esta técnica es la facilidad de la implementación y su rapidez, lo que permite obtener un diagnóstico rápido y preciso en pocos minutos. Esto que contribuye a una comunicación rápida del mismo con implicaciones importantes en el control de esta enfermedad (Samartino y col., 2007).

Las pruebas diagnósticas oficiales, utilizadas en Uruguay según el decreto 20/998 son:

1. Pruebas presuntivas: Rosa de Bengala (prueba individual) y Prueba de anillo en leche (prueba colectiva). Pueden ser realizadas por laboratorios particulares.
2. Pruebas confirmatorias: Fijación de complemento, Rivanol (es la que se utiliza actualmente) y Mercaptoetanol. Se realizan únicamente en el laboratorio oficial Miguel C. Rubino (DILAVE), el cual produce y controla los antígenos a ser utilizados en las diferentes pruebas diagnósticas.

A continuación, se describen las técnicas serológicas utilizadas en el diagnóstico de Brucelosis en algunos países de la región (Cuadro 7).

Cuadro 7. Técnicas serológicas en algunos países de la región.

Países	Prueba Tamiz	Complementarias
Argentina	BPA *	ME, FC, FPA
Brasil	Rosa de Bengala	ME, FC
Chile	Rosa de Bengala	Rivanol, ELISAc
Paraguay	Rosa de Bengala	ME
Costa Rica	Rosa de Bengala	ELISAc
EEUU	Rosa de Bengala, BPA*	Rivanol, FC, FPA
Canadá	BPA, FPA	ELISAc

* (Buffered plate antigen) Aglutinación con antígeno buferado en placa.

Fuente: Samartino, 2006.

Dájer-Abimerhi y col. (1995), realizaron un estudio comparando las técnicas Rosa de Bengala (RB), Rivanol (Riv), 2-Mercaptoetanol (2-ME) y ELISA con Fijación de Complemento (FC) para conocer su utilidad en el diagnóstico de brucelosis bovina. La sensibilidad y especificidad relativas de las cuatro pruebas comparadas con FC fueron como sigue: RB, 100% y 38%; 2-ME, 90% y 99%; Riv, 86% y 100%; ELISA, 97% y 99%. Cabe recordar que en este trabajo se utilizaron animales vacunados con Cepa 19, esto puede explicar la baja especificidad de RB.

La prueba de RB demostró ser buena como tamiz al tener una sensibilidad del 100%, sin embargo por su baja especificidad (38%) debe ser confirmada ya sea con la prueba de FC o ELISA, ya que el 2-ME y Riv mostraron baja sensibilidad (90 y 86%), lo que aumenta el riesgo de obtener falsos negativos.

Las pruebas de 2-ME y Riv parecen tener altas especificidad pero baja sensibilidad comparadas con FC y pueden por lo tanto fallar en la identificación de reactores positivos a FC. Rivanol es una técnica poco deseable como confirmatoria en etapas finales de erradicación debido al riesgo de dejar animales falsos negativos en el rodeo y de esta manera perpetuar la enfermedad (Dájer-Abimehi y col., 1998). Según la OIE (2010), las pruebas

confirmatorias son BPA (prueba del antígeno tamponado), FC, ELISA, FPA (polarización fluorescente).

4.12 TRATAMIENTO

No existe ningún tratamiento para la brucelosis en los animales. Ello es debido a que *Brucellas* son bacterias intracelulares facultativas, alojándose dentro de las células que protegen al animal, donde no logran actuar las sustancias antibacterianas. Sin embargo, la enfermedad se puede prevenir, controlar e incluso erradicar empleando vacunas, buenas prácticas de manejo, eliminación de animales positivos e higiene (Cherwonogrodzky, 1995).

4.13 PRINCIPALES ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA LA INMUNIZACIÓN CONTRA BRUCELOSIS BOVINA

La prevención de la diseminación de la brucelosis se basa en la administración de vacunas adecuadas contra la infección por *B. abortus*. Con este objetivo se han utilizado clásicamente cepas bacterianas atenuadas y componentes antigénicos propios de la *Brucella*. La habilidad de un antígeno específico para inducir en forma preferencial una respuesta Th1 es un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas contra *Brucella abortus* (Stevens y col., 1994; Oliveira y col., 1996).

4.13.1 Bacterias atenuadas

4.13.1.1 *Brucella abortus* S19

La cepa 19 de *B. abortus* es una cepa lisa que posee la cadena O del LPS. Por ello, en animales inmunizados con esta cepa se pueden observar anticuerpos específicos contra este antígeno del tipo IgG1, IgG2b e IgM (Vemulapalli y col.,

2000). El defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, pero hace que pierda un mecanismo de virulencia esencial (Briones y col., 2001). Su efectividad en el ganado bovino depende de variables como la edad de vacunación, dosis, ruta de administración y de la prevalencia de la brucelosis en el rebaño vacunado (Schurig y col., 2002). Los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa interfieren con el diagnóstico tradicional de bovinos infectados con cepas silvestres de *B. abortus*, pudiendo también inducir aborto en hembras preñadas y es patógena para la especie humana (Oliveira y Splitter, 1996; WHO, 1997; Olsen, 2000).

4.13.1.2 *Brucella abortus* 45/20

La cepa 45/20 es una cepa rugosa, que fue desarrollada por 20 pasajes repetidos de *B. abortus* 45 en cobayos (Corbeil y col., 1988). A pesar de que no induce anticuerpos contra la cadena O del LPS e induce una protección significativa contra la infección por *B. abortus* (WHO, 1997), no es muy utilizada porque es inestable y puede revertir a su forma virulenta in vivo (Corbeil y col., 1988). La cepa 45/20 también ha sido utilizada en forma inactiva, pero adicionada junto a un adyuvante oleoso, la que ha demostrado una relativa efectividad, pero provoca una reacción inflamatoria local en el sitio de la inyección (McDonel, 1990).

4.13.1.3 *Brucella abortus* RB51

B. abortus RB51 es una cepa rugosa, resistente a rifampicina, que ha sido derivada de la cepa virulenta *B. abortus* 2308 (Schurig y col., 1991, Schurig y col., 2002). Esta cepa es utilizada desde 1996 contra la brucelosis bovina en Estados Unidos y en otros países. Es administrada en dosis que fluctúan entre 1×10^{10} y 4×10^{10} UFC/mL en bovinos no menores de 4 meses de edad (Olsen, 2000, Vemulapalli y col., 2000). La protección que proporciona la vacunación con esta cepa, se debe a la alta activación de linfocitos T (Stevens y Olsen, 1996; Olsen, 2000; Vemulapalli y col., 2000). La vacunación induce altos niveles de IFN- γ , lo cual es fundamental en las etapas primarias de la infección (Pasquali y col., 2001). La inoculación intraperitoneal de *B. abortus* RB51 en ratones resulta en una colonización del bazo que desaparece luego de cuatro semanas postinmunización (Schurig y col., 1991). La vacunación del ganado permite la diferenciación entre bovinos vacunados y aquellos infectados con

cepas silvestres debido a que no induce anticuerpos contra la cadena O del lipopolisacárido (Pasquali y col., 2001). Sin embargo, se ha determinado que puede causar placentitis, endometritis e infección fetal, en vacas que han sido vacunadas durante la preñez (Lopetegui, 1998; Van Metre y col., 1999; Olsen, 2000).

Basándose en reportes sobre la efectividad de la proteína SOD Cu/Zn de *B. abortus* expresada en *E. coli* DH5 α en proteger a ratones vacunados del desafío con la cepa patogénica de *B. abortus* 2308 (Oñate y col., 1999), Schurig y col desarrollaron una nueva cepa de *B. abortus* RB51, que sobreexpresa la proteína SOD Cu/Zn de *Brucella* (*B. abortus* RB51-SOD) (Vemulapalli y col., 2002). La inmunidad protectora proporcionada por la cepa *B. abortus* RB51-SOD contra *Brucella* es superior a la de *B. abortus* RB51, cepa parental, sin alterar las características de atenuación de la vacuna (Vemulapalli y col., 2000).

4.13.2 Vacunas subcelulares.

Se han probado distintos antígenos de *Brucella* en su capacidad de inducir respuesta inmune mediada por células. Estos antígenos forman parte de la estructura de la bacteria, como la lipoproteína de 18 kDa presente en la superficie de *Brucella* (Vemulapalli y col., 2000), la proteína periplásmica P39, la proteína bacterioferritina (Al-Mariri y col., 2001b) y la proteína ribosomal L7/L12, que produce una protección equivalente a la alcanzada con la cepa 19 de *B. abortus* en ratones, con activación de células T CD4⁺ que secretan niveles significativos de IFN- γ (Oliveira y col., 1994; Oliveira y col., 2002; Ko y Splitter, 2003). Las proteínas bacterioferritina y P39 no producen niveles significativos de protección contra *Brucella*, aunque se utilicen adyuvantes como CpG en su administración (Al-Mariri y col., 2001a). También se han probado proteínas de choque térmico, como las proteínas UvrA, GroEL, GroES y HtrA de *B. abortus* (Oliveira y col., 1996), ya que se ha encontrado que éstas son altamente inmunogénicas en el curso de la infección con *Brucella*, estimulando tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral en el huésped infectado (Roop y col., 1994); sin embargo, no son capaces de estimular una respuesta inmune protectora eficiente frente a la infección con *Brucella* (Bae y col., 2002). A partir del extracto de proteínas totales de *B.*

abortus RB51, se purificaron dos proteínas: una de 22,9 y otra de 32,2 kDa, de las cuales sólo la proteína de 22,9 kDa demostró ser capaz de otorgar cierto grado de protección (Céspedes y col., 2000). Los mejores resultados se han obtenido con la proteína de 18,5 kDa, SOD Cu/Zn de *B. abortus*, que es capaz de inducir una respuesta celular de tipo Th1, con inducción de la producción de IFN- γ e IL-2, pero no de IL-4 (Oñate y Folch, 1995) y además la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora (Oñate y col., 1999).

En los últimos años han surgido dos nuevas estrategias de inmunización altamente efectivas, basadas en la vacunación con moléculas de ácidos nucleicos, generándose la aparición de las vacunas de tercera generación, que son las vacunas ADN y las ARN, aplicándose este tipo de estrategia para la infección por *Brucella*.

4.13.2.1 Vacunas ADN

La inmunización con vectores de expresión plasmidial se basa en la expresión in vivo de algún antígeno seleccionado, que induciría una respuesta inmune protectora, y tienen algunas de las ventajas que presentan el uso de los patógenos vivos o atenuados, pero sin el riesgo de la infección (Tang y col., 1992). En principio, el método de vacunación con ácidos nucleicos se basa en el uso de un plásmido bacteriano que tiene un promotor viral fuerte capaz de expresarse en células eucariotas, un gen que codifica para un antígeno seleccionado y una secuencia de término de la transcripción o poliadenilación. El plásmido se replica en una bacteria (*E. coli*), se purifica y luego se inyecta por una vía determinada en el huésped. Las células del huésped son capaces de sintetizar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos, originando eventualmente una respuesta de células T y B específicas para el antígeno seleccionado. El plásmido es fabricado sin su origen de replicación funcional en células eucariotas, por lo tanto nunca se replica en una célula huésped de mamífero, ni se integra al ADN cromosomal del hospedador (Donnelly y col., 1997).

Se ha demostrado que las vacunas ADN para *B. abortus* que contienen el gen para la proteína L7/L12 (Kurar y Splitter, 1997) y lumazina sintetasa (Velikovsky

y col., 2002), inducen un significativo nivel de protección contra brucelosis en el modelo ratón.

En bovinos, actualmente el único trabajo que ha estudiado la utilización de una vacuna ADN para *Brucella* describe que la inmunización con pcDNA-SOD es capaz de estimular una respuesta inmune celular y una eficiente estimulación de células T citotóxicas, respuestas clave en la inducción de protección frente a *Brucella*. Sin embargo, se destaca una gran variabilidad de respuesta observada en el ganado bovino, lo que podría atribuirse a la constitución genética de la especie bovina con la cual se trabajó (Guzmán y col., 2004).

4.13.2.2 Vacunas ARN

Además de los vectores plasmidiales existen otros vectores de expresión como los basados en el virus Semliki Forest (SFV) (Alfavirus de la familia Togaviridae). Estos vectores son partículas virales suicidas del virus Semliki Forest, cuyo genoma corresponde a un ARN desnudo autorreplicable, cuya secuencia contiene inserto el gen que codifica para la proteína de interés. Algunos experimentos han demostrado la alta eficiencia de estos sistemas para expresar proteínas heterólogas en células eucariotas, así como también la capacidad para conferir excelentes niveles de protección en animales inmunizados con estos sistemas de expresión, superando incluso a las vacunas ADN (Fleeton y col., 1999; Andersson y col., 2001).

Contra *B. abortus* se ha evaluado en un modelo murino de inducción de respuesta inmune y protección por un ARN recombinante que codifica la proteína SOD Cu/Zn empaquetado en el interior de partículas suicidas del virus Semliki Forest (VSF-SOD). La inmunización con VSF-SOD estimuló preferentemente una respuesta inmune de tipo Th1 y la activación de células T citotóxicas. Esta respuesta fue protectora frente al desafío con una cepa patógena, indicándose su potencial uso como vacuna para *Brucella* (Oñate y col., 2005).

4.14 RESPUESTA INMUNE PRODUCIDA POR LA VACUNACIÓN (CEPA 19 Y RB51)

Actualmente las cepas más utilizadas para la inmunización contra Brucelosis en varias partes del mundo, se basan en la utilización de la Cepa 19 y/o RB51.

4.14.1 Características de la vacuna cepa 19

La vacuna *Brucella abortus* Cepa 19, fue originalmente aislada de leche de una vaca Jersey como una cepa virulenta en el año 1923, pero después de ser mantenida en el laboratorio a temperatura ambiente durante un año, se convirtió en una cepa atenuada. Su nombre se debe a que era el decimonoveno cultivo (Buck, 1930). El defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, pero hace que pierda un mecanismo de virulencia esencial (Briones y col., 2001).

Esta cepa produce una protección de aproximadamente el 70%, pero su eficacia en el ganado bovino varía dependiendo de una serie de variables incluyendo edad de vacunación, dosis, ruta y prevalencia de brucelosis en rebaños vacunados (Nicoletti, 1990). Szyfres (1973), sostiene que confiere una protección entre 65-80%, frente a la exposición de mediana intensidad, y esta perdura por 7 años o más. No se recomienda la revacunación ya que no mejora significativamente la inmunidad que es obtenida con una única dosis vacunal.

La Cepa 19 es un organismo atenuado de morfología lisa normalmente incapaz de crecer en presencia de eritritol (Jones y col., 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 en un 1-2.5% en condiciones de campo (Beckett y Diarmid, 1985; Schurig y col., 2002).

La vacuna se administra por vía subcutánea y la dosis vacunal tradicional de Cepa 19 es de $5-6 \times 10^{10}$ bacterias viables en el momento de la aprobación de

la serie de la vacuna y $2,5 \times 10^{10}$ hasta la fecha de expiración de la vacuna, en un volumen de 5 mL.

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). Para contrarrestar este inconveniente, se debe vacunar entre los 3 y 8 meses de edad. Cuanto más joven es el animal, menor tiempo retiene los anticuerpos debido a la vacunación. Las hembras vacunadas a los 3 meses, dejan de ser reaccionantes a las pruebas serológicas dos meses después de la vacunación, en cambio las vacunadas a los 6 meses tardan en hacerlo 6 meses y las vacunadas a los 9 meses (fuera de la edad permitida) mantienen la clasificación de sospechosa 15 meses después de la vacunación. En términos generales se puede afirmar que el 95 % de las hembras vacunadas a los 3-8 meses se negativizan a la edad de 2 años (Szyfres, 2000), citado por Solís-Salas TV. (2008).

En los gráficos 4 y 5 se puede observar la relación de la concentración y persistencia en el tiempo de los anticuerpos IgM e IgG en relación a la edad de vacunación, 4 a 6 meses y 8 meses de edad.

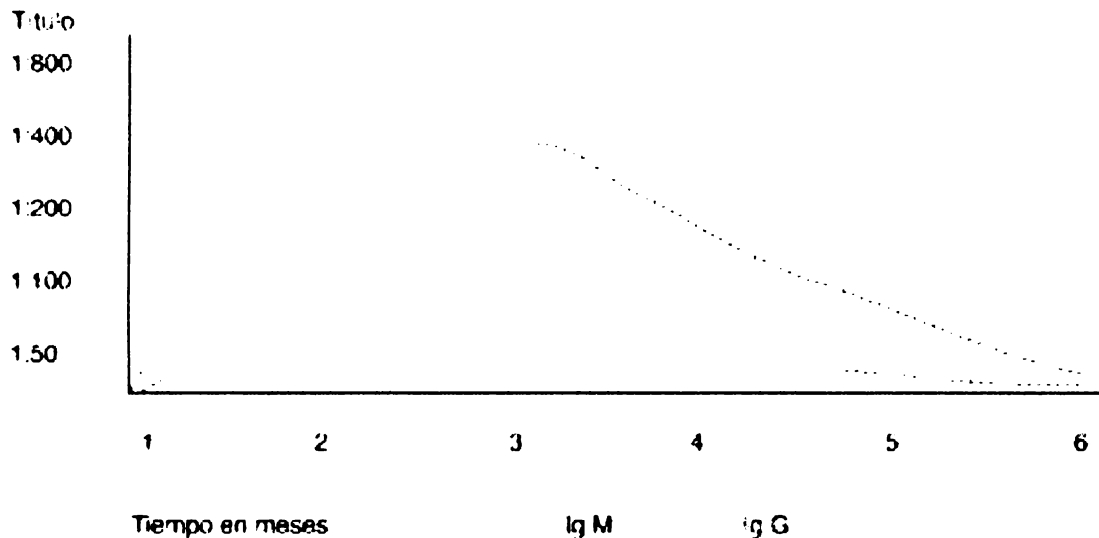


Gráfico 4. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con cepa 19 entre 4 y 6 meses de edad.

Fuente: Szyfres, 2000, citado por Solís-Salas TV. (2008).

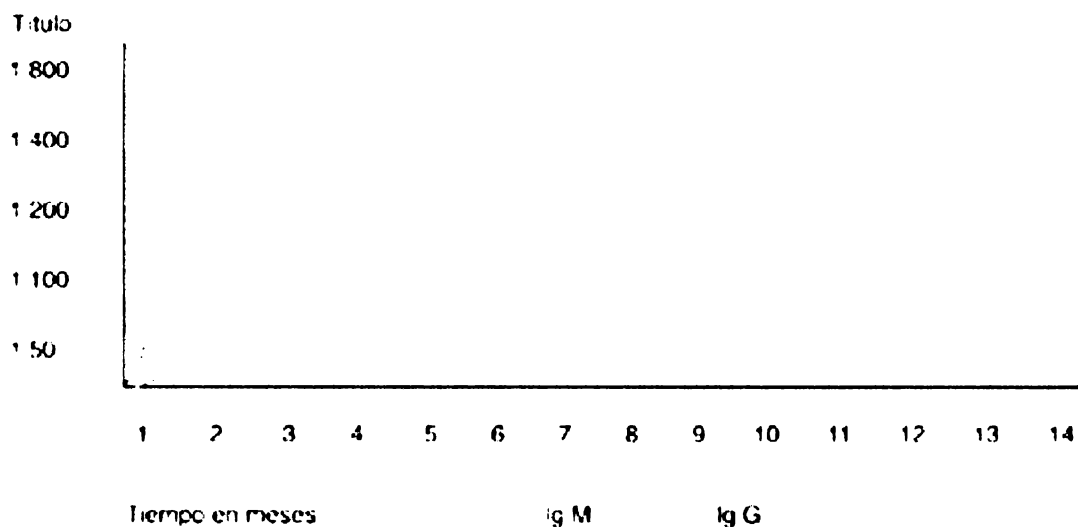


Gráfico 5. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con la vacuna cepa 19 a los 8 meses de edad.

Fuente: Szyfres, 2000, citado por Solís-Salas TV. (2008).

Como se puede observar, los anticuerpos a títulos significativos no solo desaparecen más rápidamente en terneras vacunadas entre 4 y 6 meses de edad, sino que el nivel de la IgG es mucho menor y menos persistente que cuando se vacunan animales a los 8 meses y con más razón a mayor edad.

Vacunando a edad temprana no solamente se reduce el riesgo de títulos persistentes en las pruebas serológicas, sino también se confiere oportunamente la inmunidad a los animales. De ahí la recomendación de vacunar a temprana edad en los establecimientos donde se está erradicando la brucelosis (Szyfres, 2000), citado por Solís-Salas TV. (2008).

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 y col., 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 y col., 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.

En Uruguay, Cattáneo y Bermúdez (2011) realizaron un trabajo con la finalidad de estudiar la persistencia de los anticuerpos vacinales utilizando la técnica de rosa de bengala en bovinos hembras (entre 3 y 6 meses de edad) vacunados con *Brucella abortus* cepa 19. Todos los animales estudiados resultaron negativos a la técnica de rosa de bengala al octavo mes post vacunación con *Brucella abortus* cepa 19.

Aristizabal (2000), sostiene que a los 6 meses post vacunación con cepa 19, más del 90% de las terneras no presentan título a IgG. Otras investigaciones sostienen que la respuesta de anticuerpos desaparece entre los 5 y 12 meses post vacunación en las terneras vacunadas entre los 4 a 8 meses, pero persistirá mayor tiempo si la vacunación sobrepasa los 9 meses de edad (Pluma y col., 2000).

La vacunación conjuntival con B19 (una inoculación de 5×10^9), produce inmunidad adecuada en el ganado bovino frente a *Brucella abortus*, induciendo tan sólo una respuesta serológica débil y transitoria. La repetición de esta vacuna, entre 3 y 12 meses después de la primera vacunación, brinda una eficacia protectora de una forma equivalente e incluso superior a la conferida por la vacunación subcutánea, sin inducir una respuesta serológica persistente (Blasco, 2001). Esta limitada respuesta serológica hace que el procedimiento conjuntival sea una herramienta ideal para la revacunación de las terneras que fueron vacunadas subcutáneamente y quedaron mal protegidas, como también para la vacunación de vacas adultas en rebaños infectados o con riesgo, y que resulta perfectamente compatible con un programa de erradicación por sacrificio (Blasco, 2001). Si bien esta vía de aplicación no genera respuesta humoral detectable por las pruebas serológicas, resulta laboriosa desde el punto de vista práctico.

En cuanto a la dosis reducida de la vacuna Cepa 19 (5×10^9), en rodeos de vacunos infectados con brucelosis, es igualmente efectiva para controlar la enfermedad, a pesar de que no se eliminan los animales reaccionantes (Zambrano y col., 1991).

4.14.2 Características de la vacuna RB51

Es una cepa mutante natural de la cepa lisa 2308 virulenta, que se atenuó por sucesivos pasajes en medios que contenían Rifampicina y por selección de colonias con morfología rugosa. De esta manera se logró una cepa rugosa y estable, denominada *Brucella abortus* RB51 (Schurig y col., 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 y col., 1991; Colby, 1997), aunque se ha divulgado más recientemente la síntesis de niveles bajos de la cadena-O (Clockaert y col., 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.

Al permitir la revacunación, se reduce la posibilidad de tener animales mal inmunizados por fallas en la primera vacunación (Rosso, 2002). Pareciera ser razonable recomendar revacunación cada 2 años después de la primera (terneras) y segunda (12 – 16 meses de edad) vacunación (Schurig y col., 2002).

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 y col., 1991; Palmer y col., 1996). Cuando se usa un solo protocolo de vacunación su efecto protector es similar al que induce la Cepa 19 (Cheville y col., 1992, 1996). Los experimentos recientes llevados a cabo a 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 y col., 1998).

La vacuna se administra por vía subcutánea, con una dosis vacunal recomendada de $1-3,4 \times 10^{10}$ bacterias viables en un volumen de 2 mL, sin

efectos indeseables. Sin embargo, se recomienda que la inmunización deba 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 y col., 1997). Sin embargo otros autores sostienen que puede causar placentitis, endometritis e infección fetal, en vacas que han sido vacunadas durante la preñez (Lopetegui, 1998; Van Metre y col., 1999; Olsen, 2000).

La inoculación intravenosa de vacas preñadas con 10^{10} organismos conduce a una infección placentaria y fetal, pero no al aborto (Palmer y col., 1996), sugiriendo que la vacunación de animales no preñados y ganado adulto con una dosis completa es segura, 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 fundamentalmente mediada por células T, puesto que la transferencia pasiva de anticuerpos inducidos por RB51 no protegen al huésped (Bagchi, 1990; Jiménez de Bagues y col., 1994). Estudios en progreso sugieren que las células T citotóxicas son capaces de eliminar las *Brucellas* 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 y col., 1996).

Todas las especies examinadas han permanecido negativas en todas las pruebas serológicas convencionales para brucelosis, después de la vacunación con la cepa RB51 (Olsen y col., 1996).

Finalmente, aunque la cepa RB51 tiene un excelente registro de estabilidad, la naturaleza exacta de las mutaciones no se conoce (Olsen y col., 1996). 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.

Entre las ventajas más importantes que tiene la RB51 son el hecho de que no produce ningún tipo de confusión en el diagnóstico (Cuadro 8); permite iniciar

los muestreos de los animales antes de los 18 meses, detectando tempranamente la enfermedad; y la cantidad de bacterias por dosis no influye en la serología (Lopetégui, 1997).

La vacunación con la vacuna RB51, al igual que con la vacuna Cepa 19, tiene un doble beneficio: disminuye la susceptibilidad a la infección al conferir protección inmunitaria y reduce el nivel de exposición a la infección al disminuir el número de animales excretores de *Brucella abortus* y reducir substancialmente el número de abortos en los rodeos infectados.

Tanto la vacuna RB51 como la Cepa 19 son estables y no se propagan de un animal a otro y su virulencia no aumenta por pasajes seriados en animales. La protección conferida por ambas vacunas es mediada por células y deben ser administradas bajo la responsabilidad de un veterinario.

Las dosis subcutáneas de cepa RB51 usadas para la vacunación son: en terneras, 10 a 34 mil millones ($1-3,4 \times 10^{10}$) de bacterias vivas; adultos/hembras preñadas, mil millones (10^9) de bacterias vivas. Las dosis comparables de cepa 19 son: en terneras de 4 meses a un año, 3 a 10 mil millones ($3-10 \times 10^9$); vacunos adultos, 0,3 a 1.0 mil millones ($0,3-1 \times 10^9$) de bacterias vivas (Briker y Halling, 1995).

Según el Manual de procedimiento de vacunación con RB51, de la División Sanidad Animal (MGAP), la dosis vacinal de RB51 empleada en Uruguay es de 10 a 34 mil millones ($1-3,4 \times 10^{10}$) de bacterias vivas.

Cuadro 8. Comparación entre la respuesta de las vacunas Cepa 19 y RB51 contra brucelosis bovina.

Cepa 19	Cepa RB 51
Protección: contra brucelosis bovina.	Protección: contra brucelosis bovina.
Diagnóstico: produce falsos positivos, porque es detectada por pruebas serológicas de rutina y no se puede diferenciar de la enfermedad (confunde con el diagnóstico).	Diagnóstico: no produce falsos positivos, porque no es detectada por las pruebas serológicas de rutina (no confunde con el diagnóstico).
Edad de vacunación: se pueden vacunar solamente las terneras hasta los 10 meses de edad, y realizar pruebas serológicas a partir de los 18 meses.	Edad de vacunación: se puede vacunar a cualquier edad, pero con el fin de prevenir el contagio temprano, se recomienda vacunar a las terneras entre 4 y 10 meses (edad óptima 5 meses).
En caso de rodeos infectados, donde es necesario vacunar animales adultos, se utiliza una dosis reducida, no se hace diagnóstico por un período de tiempo y los resultados se deben interpretar cuidadosamente para no eliminar animales sanos.	En predios infectados o de mucho riesgo se hace la vacunación de todo el rodeo (incluyendo animales adultos), y se puede realizar diagnóstico rápidamente sin riesgo de eliminar animales sanos.
Abortos: cuando se aplica dosis completa puede causar abortos.	Abortos: raramente produce abortos, pero como medida de precaución en hembras preñadas, aplicar 1/10 la dosis.

Fuente: Lopetégui, 1997.

4.14.3 Eficacia comparativa de las vacunas con las cepas RB51 y Cepa 19

4.14.3.1 Efecto de la Edad de Vacunación en la eficacia de cepa 19 y RB51

A fin de determinar el efecto de la edad de vacunación y la protección conferida, Cheville y col. (1996) utilizaron terneras Polled Hereford las cuales fueron vacunadas con 1×10^{10} UFC (unidades formadoras de colonia) de la vacuna RB51 y cepa 19 a los 3, 5, 6, 7, y 10 meses de edad, y se sirvieron a los 16 - 18 meses de edad, siendo posteriormente desafiadas con la cepa virulenta de *B. abortus* a los 6 meses de gestación. Las terneras vacunadas a los 10 meses de edad presentaron los más altos porcentajes de protección (Cuadros 9 y 10). Aun cuando la vacunación a los 5, 6, 7 ó 10 meses de edad tendió a dar protección equivalente, hubo una tendencia a inducir menor protección en las edades más jóvenes (3 meses). Por otro lado, las hembras que recibieron la vacuna cepa 19, estaban protegidas contra la infección en 95% y frente al aborto en un 100%. Las que se vacunaron con RB51, tuvieron una protección de 78% frente a la infección y un 95% frente al aborto. Las hembras no vacunadas controles (las cuales recibieron solución salina) tuvieron una incidencia de infección (60%) y aborto (42%) (Cuadros 9 y 10).

Cuadro 9. Eficacia de la vacuna RB51 y la cepa 19 utilizada en diferentes edades.

Edad de vacunación	Protección contra la infección % (infectadas/desafiadas)		
	RB51	Cepa 19	Controles
10 meses	95% (1/20)	100% (0/6)	45% (6/11)
7 meses	83% (4/23)	80% (1/5)	36% (7/11)
5-6 meses	69% (8/26)	100% (0/4)	50% (7/14)
3 meses	61% (7/18)	100% (0/4)	70% (8/11)
Todas las edades	78% (20/87)	95% (1/19)	40% (28/47)

Fuente: Cheville y col., (1996).

Cuadro 10. Protección contra el aborto conferido por la vacuna RB51 y la cepa 19 en diferentes edades.

Edad de vacunación	Protección contra el aborto % (abortadas/desafiadas)		
	RB51	Cepa 19	Controles
10 meses	100% (0/20)	100% (0/6)	45% (6/11)
7 meses	100% (0/23)	100% (0/6)	64% (4/11)
5-6 meses	92% (2/26)	100% (0/4)	64% (5/14)
3 meses	87% (2/15)	100% (0/4)	55% (5/11)
Todas las edades	95% (4/84)	100% (0/19)	58% (20/47)

Fuente: Cheville y col., 1996.

4.14.3.2 Prueba de eficacia de las vacunas antibrucélicas cepa 19 y RB51 en bovinos

Para probar la eficacia de las vacunas con la cepa 19 y la cepa RB51 (Bagnat y Manetti, 2000), realizaron un experimento donde utilizaron 75 terneras Aberdeen Angus que conformaron 3 grupos: controles (testigos) no vacunados; vacunados con cepa RB51; vacunados con cepa 19. La vacunación se efectuó a los 9 meses de edad. Posteriormente se dividió cada grupo para realizar una Experiencia I (animales no gestantes), desafiadas a los 18 meses de edad y una Experiencia II (animales gestantes), desafiados a los 6 meses de gestación.

En términos de infectados-no infectados (protección absoluta), cepa 19 fue la única que obtuvo diferencias estadísticamente significativas en su favor respecto del grupo control. Los cálculos de confianza estimados por análisis de varianza, solo permitió apreciar diferencias a favor de cepa 19, mientras que RB51 no se diferenció en ninguno de los parámetros. La cepa 19 fue la única vacuna en esta Experiencia II que obtuvo diferencias a favor en el parámetro infectados-no infectados (protección absoluta), pero ella no resultó ser estadísticamente significativa. Cuando se integran ambas experiencias en este parámetro, sí las diferencias son altamente significativas. RB51 no mostró protección en ninguna de las variables utilizadas (Bagnat y Manetti, 2000).

Estos resultados contradicen las afirmaciones de que las vacunas RB51 y cepa 19 son similares en su eficacia, realizadas en las publicaciones de experimentos controlados en bovinos (Cheville y col., 1996). Estas contradicciones deben estar atribuidas al hecho de que el desafío realizado en ambos experimentos, fueron notoriamente diferentes. En el primer trabajo experimental (Cheville y col., 1996), la infección fue de 60% en los controles, por lo que un 40% de los controles no se infectaron. Este bajo nivel de infección indica además, que un mismo porcentaje no se hubiese infectado en los grupos vacunados (aun si no estuviesen inmunizados). En cambio, en el segundo trabajo experimental, la infección alcanzó el 100% de los controles (Bagnat y Manetti, 2000).

Cuando se evalúan comparativamente dos o más vacunas antibrucélicas, se debe considerar que puede haber diferencias entre ellas que no son observables con bajos niveles de infección pero si con altos niveles de infección (Alton y col., 1972; García-Carrillo y col., 1977; García-Carrillo, 1980). El nivel de infección debe verificarse en los porcentajes y grados de infección efectiva de los animales desafiados y no solo en las cuentas viables de la descarga.

Por lo tanto, se puede decir que aparentemente la menor eficacia de la vacuna RB51 respecto de la cepa 19 no pudo observarse en los estudios de Cheville y col. (1996) debido al bajo nivel de infección ocurrido. Las condiciones requeridas para observar diferencias de eficacia entre vacunas, se dan sometiéndolas a altos niveles de infección.

La vacuna RB51 no fue similar a la cepa 19, solo mostró protección en dos parámetros del experimento I (generalización e invasividad) en un nivel inferior al de esta. En los restantes parámetros de ambos experimentos, no hubo protección, hecho que sí ocurrió con la cepa 19.

Dos de las características de RB51, escasa virulencia y condición de rugosa, les fue atribuida su limitación para alcanzar el nivel de protección que induce la cepa 19 (Stevens y col., 1994).

4.15 RESULTADOS DE LAS CAMPAÑAS SANITARIAS EN PAISES DE LA REGIÓN

En EEUU, Chile, Costa Rica y Uruguay se utiliza exclusivamente la vacuna RB51. En Argentina se emplea la vacuna Cepa 19 y en México, Venezuela, Ecuador, Paraguay, Colombia y Brasil una combinación de Cepa 19 y RB51 (Samartino, 2006).

4.15.1 Brucelosis Bovina en Argentina

Estudios realizados hacia la mitad del siglo XX mostraron una prevalencia de brucelosis bovina del 20% en ganado lechero y 18% en mataderos. La estimación actual de la prevalencia predial de la enfermedad, está entre 10 y 13% y la prevalencia individual está entre 4 y 5% (SENASA, 1999).

Debido a las grandes pérdidas económicas en 1980, el Departamento de Agricultura estableció la vacunación obligatoria con *B. abortus* S19 con dosis reducidas en terneras de 3-8 meses de edad. En 1998, fue publicada una autorización condicional para el uso de la vacuna *B. abortus* RB51 bajo estricta supervisión veterinaria en hembras bovinas mayores de 10 meses de edad y no con más de 3 meses de preñez. Luego Bagnat y Manetti (2000) realizaron un ensayo para probar la efectividad de la vacuna y llegaron a la conclusión que RB51 no genera protección, por lo cual fue retirada su autorización condicional.

En cuanto a los métodos diagnósticos, se realizan la aglutinación estándar en placa y en tubo, así como también, la prueba 2-mercaptoetanol. Se han validado la prueba de ELISA competitiva y polarización fluorescente en sueros y ELISA indirecta en leche como pruebas diagnósticas complementarias (Samartino, 2002).

4.15.2 Brucelosis Bovina en Brasil

La brucelosis bovina en Brasil según reportes oficiales y datos examinados, demuestra una situación endémica bastante estable y un predominio más alto de la enfermedad en las regiones con una densidad más alta de ganados.

Después de algunos años y muy poco progreso, fueron propuestas ciertas pautas nacionales con el objeto de consolidar las medidas de control. Estas incluyeron la vacunación de todas las terneras con la vacuna Cepa 19 y la creación de comités de brucelosis que incluyeron a representantes del gobierno (salud animal y pública), y productores de carne y leche (Vinhas, 1958).

A principios del 2001, fue lanzado un Programa Nacional con metas ambiciosas (Ministerio da Agricultura-Brasil, 2001). La estrategia se resumió en: vacunación obligatoria de terneras de 3-8 meses de edad con Cepa 19; acreditación voluntaria de rebaños libres con estándares internacionales; supervisión voluntaria de rebaños destinados para la comercialización de productos cárnicos basados en esquemas de muestreos periódicos; pruebas reguladoras para el transporte de animales reproductores de un estado a otro y a la entrada de ferias y exhibiciones; sacrificio obligatorio de bovinos positivos para *Brucella* en mataderos aprobados y estandarización de procedimientos para pruebas con pequeños cursos para veterinarios acreditados. Bajo las nuevas regulaciones, los veterinarios acreditados o laboratorios realizan la prueba tamiz Rosa de Bengala con los procedimientos estándar. Los animales positivos en esta prueba pueden confirmarse con pruebas complementarias más específicas como 2-mercaptoetanol y fijación de complemento en laboratorios aprobados.

El Programa Nacional reconoce la extrema importancia de la vacunación obligatoria con Cepa 19 de terneras dependiendo de la situación epidemiológica y todas las jornadas de vacunación tienen que ser aprobadas por el Laboratorio Federal de Referencia, más recientemente se aprobó la vacuna RB51 para ser utilizada en caso de brotes de la enfermedad y siempre y cuando estos animales no hayan sido inmunizados cuando ternera con Cepa 19 (Padilla y col., 2002).

4.15.3 Brucelosis Bovina en Chile

Históricamente, también se han presentado altas tasas de infección por *B. abortus* en el rodeo bovino de Chile. En un estudio nacional de prevalencia de brucelosis bovina realizado en 1991, la tasa de rodeos infectados fue de 23 a 38%. Así, la brucelosis bovina constituyó la enfermedad reproductiva más importante en esta región, además, no solamente fue una enfermedad limitante en la eficacia reproductiva y productiva, sino también un riesgo para la salud pública.

La estrategia técnica sobre la cual está basado el programa de erradicación de la brucelosis bovina depende fundamentalmente de tres líneas de acción: vigilancia para detectar rodeos infectados, saneamiento de dichos rodeos infectados y prevención de la diseminación de *B. abortus*. Estas medidas fundamentales están apoyadas por líneas de acción complementarias las cuales abarcan: acreditación de veterinarios y laboratorios, certificación de rebaños libres de brucelosis, vacunación de terneras, diagnósticos de laboratorio y sistemas de información y soporte legal (Lopetegui, 1995).

Estas medidas realizadas en el periodo entre 1996 y 2001 han llevado a un proceso de erradicación de la brucelosis en la X Región de los lagos. La erradicación fue verificada por la disminución de la incidencia y prevalencia de rodeos infectados de brucelosis. Los principales componentes en el progreso han sido la implementación de un sistema de vigilancia epidemiológica que detecta la ocurrencia de la infección, una orientación del Estado hacia el saneamiento de rodeos infectados, la utilización de la vacuna RB51, que no interfiere con el diagnóstico de la enfermedad y la participación activa de productores, veterinarios, laboratorios privados y la industria ganadera (Rivera y col., 2002).

4.15.4 Brucelosis Bovina en Paraguay

Esta enfermedad ha existido en el país por muchos años, una de las últimas estimaciones de la prevalencia de *B. abortus* en ganado fue de 3.15% (SENACSA, 2000). Las pérdidas económicas en ganado debido a la brucelosis están estimadas en 23.5 USD millones por año (Veirano, 2001). La Campaña Nacional de Erradicación de Brucelosis fue creada en 1978 y en ella se establecieron: estandarización de pruebas para *Brucella*; uso obligatorio de la Cepa 19 como vacuna para terneras de 3-8 meses de edad; identificación de animales vacunados y de animales positivos; requerimientos para declarar “zonas libres de *Brucella*” y finalmente, el control en el transporte de animales destinados para cría incluyendo importaciones, ferias y subastas ganaderas.

En 1999 un decreto permitió la producción y/o importación de vacunas de *B. abortus* Cepa RB51 y en el 2000 se establecieron reglas para el uso de las

vacunas contra *Brucella*, las cuales permitieron: el uso de *Brucella abortus* Cepa 19 en terneras (3-8 meses de edad) una vez en el curso de su vida; el uso de *Brucella abortus* RB51 en terneras sobre los 8 meses de edad, incluyendo hembras adultas que muestren un resultado negativo en las pruebas; el uso de *B. abortus* RB51 en el esquema de revacunación, una vez, incluyendo terneras previamente vacunadas con *B. abortus* S-19 que muestren un resultado negativo en las pruebas; el uso de *B. abortus* RB51 en rodeos “libres de *Brucella*” en terneras hasta de 15 meses de edad y no se debe realizar ningún tipo de vacunación en vacas preñadas ni machos.

En cuanto al diagnóstico, en este país se realizan la prueba de anillo en leche, la prueba Rosa de Bengala y la prueba 2-mercaptoetanol (Baumgarten, 2002).

4.15.5 Brucelosis Bovina en Estados Unidos

Los esfuerzos para erradicar la brucelosis causada por *Brucella abortus* en los Estados Unidos empezaron en 1934 como parte de un programa de recuperación económica para reducir la población de bovinos debido a la gran depresión y las condiciones severas consecuencia de la sequía. En 1934 y 1935, la tasa de reactores positivos en pruebas realizadas a bovinos adultos fue 11.5%. En 1954, la magnitud del problema de brucelosis en los Estados Unidos en términos de economía de la industria ganadera y la salud humana incitó al congreso a destinar fondos para un esfuerzo nacional para erradicar la brucelosis. Los programas de erradicación de brucelosis fueron diseñados como un esfuerzo conjunto entre el gobierno federal, los estados y los productores y éste a través de los años con las investigaciones y la experiencia ha sido modificado muchas veces (Ragan, 2002).

Una vez se encontrara infección, el rodeo era muestreado y los animales positivos eran removidos y sacrificados, también se realizaban pruebas adicionales cada 30-180 días hasta que el rodeo fuera negativo. Además, rodeos linderos eran muestreados incrementando el riesgo de infección ya que la enfermedad se diseminaba a los animales susceptibles (Ragan, 2002).

El uso de la vacunación ha sido el mayor factor para el éxito del programa de erradicación de brucelosis. Por muchos años, fue usada la vacuna Cepa 19 solo en vacas paridas y en adultos antes de 1959, pero fue descontinuada por que causaba abortos en los animales que habían sido vacunados, además de que presentaban títulos persistentes causando interferencias en las pruebas de diagnóstico, por lo que, se incluyeron dosis reducidas de la vacuna en bovinos adultos y terneras siendo efectiva en estos rodeos incrementando su resistencia y disminuyendo la cantidad de excreciones de *B. abortus* en partos o abortos. En cuanto a los problemas de los títulos post-vacunales, estos se resolvieron con la vacuna Cepa RB51, la cual fue condicionalmente aprobada para su uso en bovinos en 1996. La implementación de cada uno de estos progresos resultó en una dramática disminución de brucelosis. Sin embargo, en 1990 se divulgó un bajo número de nuevos rodeos afectados cada año. Por lo tanto, en 1997, fue implementado el Plan de Acción de Emergencia para Brucelosis (BEAP). De acuerdo al plan, todas las actividades que implicaran vigilancia de la brucelosis y manejo de nuevos casos eran conducidas como medidas de emergencia.

A partir del 31 de diciembre del 2000, no había rodeos de ganado afectados en el país. Esta fue la primera vez en la historia del programa de brucelosis que Estados Unidos no reportó ningún rodeo afectado por esta enfermedad. Sin embargo, la brucelosis tiene una variable, algunas veces presenta un período muy largo de incubación, así que los rodeos afectados que no se han mostrado positivos podrían serlo posteriormente (Ragan, 2002).

5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo pretende recopilar toda la información existente sobre la Brucelosis bovina en Uruguay y la región. Por tratarse de una enfermedad reemergente en el país, se hizo necesaria esta revisión, debido a la situación actual de la misma.

La brucelosis es una zoonosis con gran impacto tanto para la salud pública como para la economía agropecuaria en la mayoría de los países en desarrollo.

La permanencia de esta enfermedad limita las posibilidades del sector pecuario y la comercialización internacional, influyendo negativamente en la rentabilidad de las explotaciones, la calidad de los productos, el consumo y la salud humana.

A pesar de las recomendaciones de diferentes organismos e instituciones nacionales e internacionales, la enfermedad continua presente en muchos países de la región (incluyendo Uruguay), donde existe una gran heterogeneidad en las formas de los sistemas de producción y comercialización de productos, por lo que es necesario estudiar y programar acciones locales y regionales considerando cada situación en particular.

Uruguay implementó una campaña sanitaria entre los años 1964-1996 basada en la vacunación con Cepa 19. En 1996 se suspende la vacunación y en el año 2002, frente a la reaparición de la enfermedad, se optó por la vacuna RB51, empleada en la actual campaña sanitaria. La reemergencia de la brucelosis bovina en Uruguay, en el año 2001, se da como consecuencia de un cese en la vacunación con Cepa 19 en el año 1996. Esto fue una decisión política, apoyada por gremiales de productores en la cual no se tuvo en cuenta el punto de vista técnico, que se oponía a dicha medida y la escasa o nula vigilancia epidemiológica luego de adoptarla (Comunicación personal Dres. Casas R; Garín A; Rosso E; y SMVU, 2012). Transcurrido 5 años de suspender la vacunación se comprueba la existencia nuevamente de la enfermedad en el departamento de Rocha. Es importante recordar que la inmunidad generada por la vacuna Cepa 19 perdura por toda la vida productiva del rodeo vacunado cuando ternera (Szyfres, 1973). Este hecho pone en evidencia que la enfermedad en realidad nunca se erradicó, sino que permanecía en nichos ecológicos altamente favorables. Los animales no vacunados (sin inmunidad), al momento de la reaparición de la brucelosis se encontraban en plena edad reproductiva (categoría más susceptible), haciéndolos doblemente vulnerables.

La campaña sanitaria contra la Brucelosis implementada en el Uruguay, se basa en prueba-sacrificio de animales positivos a la prueba confirmatoria (Rivanol), interdicción y sangrado de focos, linderos y predios relacionados epidemiológicamente, sangrado previo movimiento de seccional policiales de

riesgo, vigilancia epidemiológica, serología en planta de faena y finalmente la vacunación y revacunación con la cepa RB51. La vacuna es solo una herramienta en la actual campaña de erradicación y se la utiliza debido a que no genera interferencia con el diagnóstico serológico independientemente de la edad de vacunación. (Comunicación personal Dr. Alfredo Garín, 2012). Existen carencias en los controles y registros de vacunación y revacunación, no existe a pesar de contar con las herramientas adecuadas un registro completo y confiable de establecimientos que utilizaron la vacuna, cantidad y categorías de animales vacunados, fechas de revacunación, y otros datos referentes (SMVU, 2011).

Además existen carencias en los controles y auditorías de la campaña, siendo los mismos absoluta responsabilidad del MGAP. Los controles han sido discontinuos, escasos y no han generado los aportes buscados, el MGAP ha estado omiso en cumplir su rol de Policía Sanitaria (SMVU, 2011).

Las vacunas utilizadas en las campañas sanitarias, en los países donde la enfermedad es endémica, son las cepas atenuadas 19 y/o RB51. La gran diferencia entre estas, radica en que Cepa 19 es una cepa lisa y los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa interfieren con el diagnóstico tradicional de bovinos infectados con cepas silvestres de *B. abortus* (Oliveira y Splitter, 1996; WHO, 1997; Olsen, 2000).

En cuanto a la eficacia de la vacunas antibrucélicas (Cepa 19 y RB51), hay trabajos que difieren en sus resultados, si bien no son comparables porque las condiciones en que fueron realizados fueron diferentes; se puede decir que frente a un mayor desafío (alto nivel de infección), Cepa 19 logra mayor protección que RB51 (Bagnat y Manetti, 2000). Esto es esperable, dado que Cepa 19 es una cepa lisa, igual a la cepa patógena, logrando una respuesta eficaz y duradera. La limitada protección de RB51 fue atribuida a su condición de cepa rugosa y escasa virulencia (Stevens y col., 1994).

No hay estudios contundentes realizados que demuestren la real duración de la inmunidad que otorga RB51. La recomendación oficial del MGAP es vacunar las hembras no gestantes, mayores de 4 meses y revacunar a los 90 días. De esto surge la interrogante, ¿por qué vacunar animales tan jóvenes siendo que

la mayor susceptibilidad se presenta en etapas reproductivas y esta vacuna no interfiere con el diagnóstico serológico? y ¿cómo asegurarnos que éstos animales estarán protegidos a los 4-5 años de edad?

Un punto importante a tener en cuenta en la campaña que lleva adelante el país, es el diagnóstico confirmatorio de brucelosis. Este es realizado por DILAVE utilizando la técnica de Rivanol. Ésta y 2-Mercaptoetanol son técnicas que han sido propuestas como métodos que pueden diferenciar entre títulos de anticuerpos producidos por vacuna y por infección (Metcalf, 1986; Morgan y col., 1987). Debido a que en la campaña actual se utiliza la vacuna RB51 (no interfiere con el diagnóstico), no justificaría la utilización de una prueba diagnóstica para tal objetivo. Además las pruebas de 2-ME y Riv parecen tener altas especificidad pero baja sensibilidad comparadas con FC. Siendo técnicas poco deseable como confirmatoria en etapas finales de erradicación debido al riesgo de dejar animales falsos negativos en el rodeo y de esta manera perpetuar la enfermedad (Dájer-Abimehi y col., 1998). Según la OIE (2010), las pruebas confirmatorias son BPA (prueba del antígeno tamponado), FC, ELISA, FPA (polarización fluorescente).

Otro aspecto importante en la campaña sanitaria, se refiere a la interdicción de foco. Actualmente en Uruguay, se requiere de dos pruebas negativas a Rosa Bengala, con un intervalo de 120 días, para la liberación de restricciones de un predio (junto con la eliminación de positivos y vacunación). En otros países, se ha demostrado que esto es un tiempo demasiado corto para asegurarse de que la enfermedad ha sido eliminada del rodeo (Ragan y Ragan, 2012). Aunque los intervalos de pruebas pueden variar dependiendo del nivel de la enfermedad, el tipo de explotación y otros factores, la prueba final del rodeo, que será la base para liberar la interdicción del establecimiento, debe ser al menos un año después de la detección del último reactor (Ragan y Ragan, 2012). Un intervalo de 30 días para un segundo análisis funciona bien hasta que el rebaño se haga negativo. Esto se basa en el período de incubación promedio de la brucelosis. Después de la primera prueba negativa, los plazos para las pruebas pueden ser extendidos (Casas, 2008; Ragan y Ragan, 2012).

Es de fundamental importancia la correcta investigación epidemiológica de los perifocos. Actualmente se utiliza el término “perifoco”, para aquellos predios linderos y relacionados epidemiológicamente. Según Ragan y Ragan (2012) sería conveniente extender el área de perifoco hasta un radio de 2-3 Km del establecimiento afectado. La extensión del área de perifoco es importante para garantizar que un foco está rodeado de un anillo de establecimientos verdaderamente negativos (Ragan y Ragan, 2012). Debe ser realizada en el menor tiempo posible, y se debe evitar la salida de animales susceptibles del perifoco y del o los predios relacionados epidemiológicamente, hasta no tener resultados serológicos negativos (Ragan y Ragan, 2012). Hoy día los predios linderos o relacionados epidemiológicamente al foco, deben realizar sangrado a todos los reproductores bovinos mayores de un año (Resolución 128/010), posterior vacunación y revacunación con RB51 de todas las hembras bovinas no preñadas mayores de 4 meses (Resolución 883/010).

En cuanto al sangrado de animales susceptibles previo movimiento de seccionales policiales de riesgo, en Uruguay más de la mitad de los productores lo realizan. Por lo que quizás sería conveniente realizar un sangrado de todos los establecimientos previo movimiento, dejando sin efecto la división por seccional policial de riesgo, que como unidad epidemiológica es sumamente cuestionable. Esta medida si bien no cubriría la totalidad de los establecimientos, revelaría la actual situación del país, confirmando que aquellas seccionales policiales fuera de riesgo, se deban exclusivamente a la ausencia de la enfermedad y no a la falta de diagnóstico de la misma.

Esta estrategia es importante para evitar la propagación de la enfermedad pero tiene limitado valor como herramienta de vigilancia (Ragan y Ragan, 2012).

Otra medida a ser tenida en cuenta, para la detección focos ocultos, sería la realización de un sangrado a todos los predios con ganado susceptible del país, igual al que se realiza para los establecimientos lecheros remitentes a planta (anualmente). Esto también sería otra medida que permitiría detectar focos que quizás no se estén detectando actualmente. Quizás el mayor inconveniente que tiene esta medida sanitaria, es el alto costo económico y de

personal capacitado para llevarla adelante. Eso sin duda se debe poner en la balanza y evaluar el costo beneficio para el país en caso de ser justificada.

En cuanto a la eliminación de los animales positivos, hay situaciones en la cuales resulta engorroso, debido a la falta de interés en la compra por parte de las plantas habilitadas, las grandes distancias entre establecimiento y frigorífico habilitado y las disposiciones existentes de la FOICA (Federación de operarios de industrias cárnicas y afines) que establecen límites en la faena de animales positivos por día. Son éstos acontecimientos, que muchas veces conllevan a la permanencia por un tiempo considerable de animales positivos en el establecimiento, constituyendo la principal fuente de infección para el resto del rodeo, más aún tratándose de hembras preñadas (debido a que la principal fuente de infección es el parto/aborto).

El plazo establecido según el MGAP luego del diagnóstico confirmatorio para envío a faena es de 30 días. Esto puede ser excesivo, debido no sólo al riesgo que implican estos animales para el resto del rodeo, sino también debido a la ausencia de recomendaciones oficiales, tales como el aislamiento hasta el momento de ser enviado a faena.

La vigilancia epidemiológica durante el sacrificio a nivel frigorífico realizada en algunas plantas del país, debería en realidad aplicarse en todas las plantas de faena habilitadas. Esta es una excelente herramienta de vigilancia y probablemente resultaría en una más rápida divulgación de los nuevos rebaños afectados (Ragan y Ragan, 2012). De ésta manera evitaríamos el envío a faena animales cuyos propietarios sospechen la presencia de la enfermedad y envíen a plantas que no realizan muestreo serológico.

Los mayores porcentajes de brotes en el Uruguay durante los años 2009 y 2010, fueron detectados por pruebas pre-movimiento, seguidas por la investigación de linderos y predios vinculados epidemiológicamente (Ragan y Ragan, 2012). Esto es preocupante ya que la principal forma de detectar nuevas infecciones debería ser llevando a cabo investigaciones epidemiológicas, incluyendo adecuadas investigaciones y sangrados de rodeos linderos. Cuando se encuentran un alto porcentaje de los rodeos afectados por

pruebas pre-movimiento, indica que la enfermedad no es detectada tempranamente por investigación epidemiológica (Ragan y Ragan, 2012).

Actualmente el organismo oficial no tiene un plan de manejo diferencial para los rodeos afectados (partos y vaquillonas). El manejo de vaquillonas en rodeos afectados ha demostrado ser una parte fundamental para la eliminación de la brucelosis y evitar su reemergencia (Casas, 2008; Ragan y Ragan, 2012).

Por otro lado, según informe realizado por la SMVU (2011), la demora en los tiempos de aplicación de la mayoría de las medidas propuestas, la incorrecta o incompleta aplicación de las mismas en muchos casos, pero fundamentalmente los tiempos operativos absolutamente diferentes a los tiempos de difusión de la enfermedad, han contribuido a la permanencia de la misma en el país.

Las posibles fallas en la campaña sanitaria de Uruguay son producto de varios factores (técnicos, logísticos). El organismo oficial cuenta con una limitante de recursos humanos y materiales, lo cual es inadmisibles en un programa sanitario con el objetivo de erradicar de la brucelosis. Así como también la falta de supervisión uniforme, de la labor de los veterinarios de libre ejercicio (VLE), laboratorios privados y demás actores. La falta de compromiso hacia la campaña sanitaria por parte de los VLE, de los productores, constituyen un punto débil en la campaña. Muchos productores que padecen desde largo tiempo atrás la presencia de la enfermedad en sus establecimientos, no ven de forma positiva las medidas sanitarias propuestas, y sin el convencimiento de los principales actores, es imposible llevar adelante con éxito un programa sanitario (Comunicación personal Ing. Manuel Béttega, 2012). Existe un "Seguro para el control de la Brucelosis Bovina", financiado por los productores con la finalidad de indemnizar a los productores que envían a frigorífico animales positivos a la prueba confirmatoria. El fondo se financia en forma diferencial para ganado de carne y leche, este último actualmente no se está recaudando, debido al superávit existente. (Comunicación personal Dr. Alfredo Garín, 2012). Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, sería conveniente considerar seguir recaudándolo, con el objetivo de destinar cierto porcentaje para financiar parcialmente la realización de medidas sanitarias, tales como el sangrado de la totalidad del ganado susceptible del país. ¿No

sería entonces mejor medida sangrar todo el ganado susceptible y descartar la enfermedad que subsidiar por animales sacrificados por ella?

En la actual campaña sanitaria se han implementado una gran cantidad de recursos y esfuerzos, pero al no existir un consenso de todos los actores involucrados, resulta difícil llevar a cabo el objetivo de erradicación.

Para hablar de erradicación hoy día existen muchas limitantes. Se debe generar un ámbito de confianza en el relacionamiento público/privado, y de esta forma fortalecer los objetivos de la campaña sanitaria y lograr este status sanitario. Por lo tanto, el éxito en la realización de un programa sanitario nacional de erradicación requiere un riguroso compromiso de todos para el beneficio de un bien común.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Acha, PN, Szyfres, B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes a los hombres y animales. 3a ed. Washington OPS 398 p.
2. Al-Mariri, A, Tibor, A, Mertens, P, De Bolle, X, Michel, P, Godfroid, J, Walravens, K, Letesson J. (2001a). Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. Infect. Immun. 69: 4816-4822.
3. Al-Mariri, A, Tibor, A, Mertens, P, De Bolle, X, Michel, P, Godfroid, J, Walravens, K, Letesson, J. (2001b). Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella spp.* Infect. Immun. 69: 6264-6270.
4. Alton, GG, Jones, L, Garcia-Carrillo, C, Trenchi, A. (1972). *Brucella mellitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* 45/20 vaccines in Goats: Immunity. Am. J. Vet. Res. 33: N° 9.
5. Alton, G, Rogerson, H, McPherson, G. (1979). The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rosa Bengal test. Aust. Vet. J. 51 (2): 57-63.

6. Alton, G, Jones, L, Angus, R, Verger, J. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Paris INRA, 190 p.
7. Allardent-Servent, A, Bourg, G, Ramuz, M, Pages, M, Bellis, M, Roizes, G. (1988). DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. J Bacteriol 170: 4603-4607.
8. Andersson, C, Vasconcelos, N, Sievertzon, M, Haddad, D, Liljeqvist, S, Berglund, P, Liljeström, P, Ahlborg, N, Stahl, S, Berzins, K. (2001). Comparative immunization study using RNA and DNA constructs encoding a part of the Plasmodium falciparum antigen Pf332. Scand. J. Immunol. 54: 117-24.
9. Aragón, V, Díaz, R, Moreno, E, Moriyó I. (1996). Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 178 (4): 1070-1079.
10. Araya, LN, Elzer, PH, Rowe, GE, Enright, FM, Winter, AJ. (1989). Temporal development of protective cell mediated and humoral Immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. J. Immunol. 143: 3330-3337.
11. Aristizábal, M. y Céspedes, N. (2000). Respuesta serológica y persistencia de títulos en terneras Holando Argentino vacunadas y revacunadas con cepa 19 de *Brucella abortus* entre los 3 y 10 meses de edad. Vet. Arg. 17: 161-165.
12. Ariza-Cardenal, J. (1995). Brucelosis. En: Farreras-Rozman, Medicina Interna. 13a. ed. Barcelona: Mosby-Doyma p. 2312-2317.
13. Bae, J, Schuring, G, Toth, T. (2002). Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins use of vaculovirus recombinant-expressing whole insects cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. Vet. Microbiol. 88: 189-202.
14. Bagchi, T. (1990). Immune mechanisms in murine brucellosis: studies with strain RB51, a rough mutant of *Brucella abortus*, Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic: Blacksburg, VA 24061, USA. 134 p.
15. Bagnat, E, Manetti, J. (2000). Prueba de eficacia de las vacunas antibrucélicas RB 51 y cepa 19 en bovinos. Rev. Med. Vet. 81: 428-429.

16. Baldi, PC, Wanke, MM, Loza, ME, Fossati, CA. (1994) *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 41(1-2): 127-134.
17. Baldwin, CL, Parent, M. (2002). Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.* 90: 367-382.
18. Baumgarten, D. (2002). Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Vet. Microbiol.* 90: 63-69.
19. Bermúdez, J, Barriola, J. (1983). Comportamiento de las pruebas serológicas en el diagnóstico de la brucelosis bovina en el Uruguay. *Vet. Montevideo* 19 (84): 29-35.
20. Bertram, TA, Canning, PC, Roth, JA. (1986). Preferential inhibition of primary granule release from Bovine neutrophils by a *Brucella abortus* extract. *Infect. Immun.* 5: 285-292.
21. Beckett, FW, Diarmid, SC. (1985). The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *British. Vet. J.* 141: 507-510.
22. Bricker, BJ, Halling, SM, (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay: differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain RB51. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1640 –1642.
23. Briones, G, Iñon de Iannino, N, Roset, M, Vigliocco, A, Silva, P, Ugalde R. (2001). *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.* 69: 4528-4535.
24. Blasco, J. (2001). Manual de brucelosis. Brucelosis animal: la enfermedad y medidas para su control y erradicación. Junta de Castilla y León. España. p. 31-43.
25. Brazil, Secretaria de Defesa Agropecuária. (2001). Instrução normativa n.2. Diário Oficial. Seção. 1. p. 26-31.
26. Buck, JM. (1930). Studies of vaccination during calthood to prevent bovine infectious abortion. *J. Agric. Res.* 41: 667 (Abst).
27. Canning, PC, Roth, JA, Tabatabai, LB, Deyoe, BL. (1985). Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. *J. Inf. Dis.* 152 (5) 913-921.

28. Canning, PC, Roth, JA, Deyoe, LB. (1986). Release of 5'guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. J. Inf. Dis. 154: 464-470.
29. Caron, E, Gross, A, Liautard, JP, Dornand, J. (1996). *Brucella* species release a specific. Protease -sensitive, inhibitor of TNF α expression, active on human macrophage-like cells. J. Immunol. 156: 2885-2893.
30. Casas, R. (1976). Diagnóstico serológico de la brucelosis. Zoonosis. 18 (3/4): 107-130.
31. Casas, R. (2008). Actualización sobre "Brucelosis bovina". Vet. Montevideo 43 (170): 7-35.
32. Castro, H, González, S, Part, M. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioq. Clín. Latinoamer. 39: (2), 203-216.
33. Cattáneo, M, Bermúdez J. (2011). Persistencia de anticuerpos en animales vacunados con *Brucella abortus* Cepa 19. 7° Jornadas Técnicas Veterinarias. Montevideo, Uruguay 235 p (Abst).
34. Celli, J, Chastellier, Ch, Franchini, D, Pizarro-Cerda, J, Moreno, E, Gorvel, J. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J. Exp. Med. 198: 545-556.
35. Céspedes, S, Andrews, E, Folch, H, Oñate, A. (2000). Identification and partial characterization of a new protective antigen of *Brucella abortus*. J. Med. Microbiol. 49: 165-170 p.
36. Cherwonogrodzky, JW. (1995). Tratamientos en brucelosis bovina. Archivos de Medicina Veterinaria. 27: 23-28. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&meth=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=019641> Fecha de consulta: 12 de abril, 2012.
37. Cheville, NF, Jensen, AE, Halling, SM, Tatum, FM. (1992). Immunology: bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutants strains of *Brucella abortus*. Amer. J. Vet. Res. 53: 1881-1888.
38. Cheville, NF, Stevens, MG, Jensen, AE, Tatum, FM, Halling, SM. (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle

- experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. Amer. J. Vet. Res. 54: 1591-1597.
39. Cheville, NF, Olsen, SC, Jensen, AE, Stevens, MG, Palmer, MV. (1996). Efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis: Effects of age at vaccination, Amer. J. Vet. Res. 57:1604-1607.
 40. Cloeckaert, A, Tibor, A, Zygmunt, MS. (1999). *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6 (4): 627-629.
 41. Cloeckaert, A, Grayon, M, Grepinet, O. (2000). An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7: 835-839.
 42. Cloeckaert, A, Verger, JM, Grayon, M, Paquet, JY, Garin-Bastuji, B, Foster, G. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA poly-morphism at the omp2 locus. Microb. Infect. 3(9): 729-738.
 43. Cloeckaert, A, Zygmunt, MS, Guilloteau, LA. (2002). *Brucella abortus* vaccinestrain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. Vaccine. 20: 1820-1822.
 44. Cloeckaert, A, Vizcaino, N, Paquet, J, Bowden, RA, Elzer, PH. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. Vet. Microbiol. 90(1-4): 229-247.
 45. Colby, LA. (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. 185 p.
 46. Corbeil, L, Blau, K, Inzana, T, Nielsen, K, Jacobson, R, Corbeil, R, Winter, A. (1988). Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. Infect. Immun. 56: 3251-3261.
 47. Corbel, MJ, Stuart, FA. (1983). Brewer RA. Observations of serological cross reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. Dev. Biol. Stand. 56: 341-348.
 48. Corbel, MJ, Brinley-Morgan, WJ. (1984). Genus *Brucella*: En: Section 4. Gram Negative aerobic rods and cocci. Bergey's, Manual, p. 377-387.

49. Corbel, MJ. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 213-221.
50. D', Anatro. (2003). Aislamiento y tipificación de *Brucella abortus*. Jornada de Actualización sobre Brucelosis Bovina. DILAVE. "Miguel C. Rubino". Jornada de actualización sobre Brucelosis Bovina, Rocha, Uruguay. Disponible en: www.mgap.gub.uy/DGSG/.../JornadasBrucelosis/DrAnatro.pdf Fecha de consulta: 22 mayo, 2012.
51. Dájer-Abimerhi, A, Gutiérrez-Ruiz, EJ, Zapata-Villalobos, D, Honhold N, Villegas-Pérez, SL. (1995). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. *Rev. Biomed.* 6:2, 84-90.
52. Dájer-Abimehi, A, Gutiérrez-Ruiz, EJ, Zapata-Villalobos, D. (1998). Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. *Vet. Méx.* 29:2, 167-171.
53. Davies, G. (1971). The rose bengal test. *Vet. Rec.* 88: 447-449.
54. Donnelly, J, Ulmer, J, Shiver, J, Liu, M. (1997). DNA vaccines. *Ann. Rev. Immunol.* 15: 617-648.
55. Dornand, J, Gross, A, Lafont, V, Liautard, J, Oliaro, J, Liautard JP. (2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet. Microbiol.* 90: 383-394.
56. Diaz, R, Blasco, JM. (1994). Diagnóstico inmunológico de la brucelosis bovina, *Bovis* 57: 59-77.
57. Díaz, R, Leiva, J, Rubio, M, Dorronso, I. (2000). Diagnóstico de la Brucelosis humana. En: Díaz E. Hernandez L. Valero G, Arellano B. Diagnóstico de brucelosis animal. INIFAP, México, 212p.
58. Elzer, PH, Phillips, RW, Robertson, GT, Roop, RM. (1996). The HtrA response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Inf. Inm.* 64: 4838-4841.
59. Erasmus, J, Davey, S. (1987). Bovine brucellosis in the highveld region. Effect of delay in transit on rose bengal test result. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 58(2): 81-84.

60. Fekete, A, Bantle, JA, Halling, SM, Sanborn, MR. (1990). Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J. Appl. Bacteriol. 69: 216-227.
61. Feng, YL, Li, M, Hashad, M, Schurr, E, Gross, P. (1996). Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. Genetic Res. 6: 956-964.
62. Fensterbank, R. (1989). Brucelosis bovina, ovina y caprina: Diagnóstico, control, vacunación. Programa de control y erradicación de tuberculosis, brucelosis y fiebre aftosa. OPS/OMS-IIICA. Arequipa, Perú. p 25-30
63. Fernández, A. (1982). Algunos aspectos epizootiológicos de la Brucelosis Bovina en las condiciones de la República de Cuba. Tesis. Escuela Superior de Veterinaria de Brno. Checoslovaquia. 56 p.
64. Fernandes, DM, Baldwin, CL. (1995). IL-10 down-regulates protective immunity to *Brucella abortus*. Inf. Inm. 63: 1130-1133.
65. Fernández F. (2011). Brucelosis bovina situación y perspectivas. División Sanidad Animal – D.G.S.G. – M.G.A.P. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DSA/DSA.htm> Fecha de consulta: 02 de marzo, 2012.
66. Ficht, T. (2003). Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. Vet Microbiol 92: 213-223.
67. Ficht, TA, Bearden, SW, Sowa, BA, Marquis, H. (1990) Genetic variation at the omp2 porin locus of the *Brucellae*: species –specific markers. Mol. Microbiol. 4(7): 1135-1142.
68. Fiori, P, Mastrandrea, S, Rappelli, P, Cappuccinelli, P. (2000). *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. J. Clin. Microbiol. 38: 2005-2006.
69. Fleeton, M, Sheahan, B, Gould, E, Atkins, G, Liljeström, P. (1999). Recombinant Semliki Forest virus particles encoding the prME or NS1 proteins of louping ill virus protect mice from lethal challenge. J. Gen. Virol. 80: 1189-1198.
70. Freer, E, Moreno, E, Moriyón, I, Pizarro-Cerdá, J, Weintraub, A. (1996). *Brucella*- Salmonella lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA

- than are their native *Brucella spp.* counterparts. J. Bact. 178(20): 5867-5876.
71. Gajiwala, K, Burley, SK. (2000). HdeA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. J. Mol. Biol. 295: 605-612.
 72. Gall, D, Nielsen, K. (2004). Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Rev. Sci. Tech. 23(3) 989-1002.
 73. Garcia-Carrillo, C, Cedro, VC, Casas-Olascoaga, R, Bagnat, E. (1977) Evaluación en cobayos de vacunas contra *Brucella suis*. Rev. Med. Vet. 58: (3) 147-156.
 74. Garcia-Carrillo, C. (1980). Comparison of *B. malitensis* Rev.1 and *B. abortus* strain 19 as a Vaccine against Brucellosis in Cattle. Zbl. Vet. Med. B. 27: 131-138.
 75. García-Carrillo, C. (1981). Prueba de fijación de complemento para el diagnóstico de la brucelosis. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires. OPS/OMS. 24: 20-25.
 76. Garín, A. (2003). Estructura y situación de la campaña contra Brucelosis Bovina en el Uruguay. Disponible en: www.mgap.gub.uy/DGSG/.../JornadasBrucelosis/CampañaDrGarin.pdf
Fecha de consulta: 22 de febrero, 2012.
 77. Garrity, GM. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2a.ed, New York. Springer 721 p.
 78. Gee, JM, Robertson, GT, Grippe, VK, Roop, II RM. (2001). Host factor-I dependent stationary phase regulation of the *Brucella abortus* sodC. Proceedings of the 82nd Annual Conference of Research Workers in Animal Disorder, Animal Disease. New York, USA. p.213-242.
 79. Gestal, G, Cortina, P, Delgado, M. (1998) Vacunas de aplicación no sistemática de uso poco frecuente. En: Vacunaciones preventivas. Principio y aplicaciones. Barcelona: Masson, p. 491-506.
 80. Gil, AD. (2012). Experiencia de un programa de Erradicación de la Brucelosis bovina en Uruguay Marzo 2012. Disponible en: <http://www.sapuvetnet.org/News%20Imas/1.4.%20Experiencia%20de%2>

81. Godfroid, J, Saegerman, C, Wellemans, V, Walravens, K, Letesson, J, Tibor, A, Millan, A, Spencer, S, Sanna, M, Bakker, D, Pouillot, R, Garin, B. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.* 90: 461- 477.
82. Golbaum, F, Rubbi, C, Wallach, J, Miguel, S, Baldi, P, Fossati, C. (1992) Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune response. *J Clin Microbiol*; 30(3): 604-607.
83. Gómez, PH, Rueda, E, Gallego, I, Villamil, M, Mariño, C. (1995). Mecanismos de protección inducidos por proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepa RB51. *Arch. Med. Vet.* 27: 23-34.
84. Gorvel, JP, Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasión to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90: 281-297.
85. Gross, A, Spiesser, S, Terraza, A, Rout, B, Caron, E, Dornand, J. (1998). Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Inf. Inm.* 66: 1309-1316.
86. Gross, A, Terraza, A, Ouahrani-Bettache, S, Liutard, JP, Dornand, J. (2000). In vitro *Brucella Suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Inf. Imm.* 68: 342-351.
87. Guzmán, C, Chaves, E, Eichel, C, López, I, Thelestam, M, Arvidson S, Gorvel, J, Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes. *J. Biol. Chem.* 276: 44435-44443.
88. Guzmán, I, Andrews, E, González, A, Rivers, R, Cabrera, A, Oñate, A. (2004). Una vacuna ADN para la brucelosis bovina. *Resúmenes del XIII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria, Valdivia.* p.19-30.
89. Halling, S, Peterson-Burch, B, Bricker, B, Zuerner, R, Qing, Z, Li, L, Kapur, V, Alt, D, Olsen, S. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genome of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 187: 2715-2726.

90. Harmon, BG, Templeton, JW, Crowford, RP, Heck, FC, Williams, JD. (1985). Macrophage function and immune response of naturally resistant and susceptible cattle to *Brucella abortus*. Genetic Control of host resistance to infection and malignancy. Amer. J. Vet. Res. 38: 345-354.
91. Harmon, BG, Adams, LG, y Frey, M. (1989). Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. Amer. J. Vet. Res. 49: 1092-1097.
92. Hausler, W, Koontz, F. (1974). Manual of Clinical Microbiology. 2a ed. En: Lennette, E. Spaulding, J. Truant (Eds.). American Society of Microbiology. Washington, 295-301 p.
93. Herman, L, de Ridder, H. (1992). Identification of *Brucella spp.* by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. 58(6): 2099-2101.
94. Ho, M y Cheer, C. (1982). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. J. Inf. Dis. 146: 381-387.
95. Hoffmann, EM, Houle, JJ. (1983). Failure of *Brucella abortus* lipopolisaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. Vet. Inm. Immunopath. 5: 65-76.
96. Hoffmann, EM, Houle, JJ. (1995). Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. Crit. Rev. Microbiol. 21: 153-163.
97. Hong, P, Tsolis, R, Ficht, T. (2000). Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. Infect. Immun. 68: 4102-4107.
98. Janeway, CA, Travers, P, Walport, M, Shlomchik, MJ. (2003). Inmuno biología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2a ed. Barcelona. Masson, 731p.
99. Jiang, X, Leonarad, B, Benson, R, Baldwin, CL. (1993). Macrophage control of *Brucella abortus*, role of oxygen intermediates and nitric oxide. Cell. Inm. 151: 309-319.
100. Jimenez de Bagues, MP, Elzer, PH, Jones, SM, Blasco, JM, Enright, FM, Schurig, GG, Winter, AJ. (1994). Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. Inf. Inm. 62: 4990-4996.

101. Jones, LM, Montgomery, V, Wilson, JB. (1965). Characteristic of carbon dioxide independent cultures of *Brucella abortus* isolated from cattle vaccinated with strain 19. J. Inf. Dis. 115: 312-320.
102. Kim, JA, Sha, Z, Mayfield, JE. (2000). Regulation of *Brucella abortus* catalase. Inf. Inm. 68: 3681-3866.
103. Ko, J, Splitter, G. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin. Microbiol. Rev. 16: 65-78.
104. Köhler, S, Parte, F, Jubier-Mourin V, Ouahrani-Bettache, S, Teyssier, J, Liautard, JP. (2002). The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. Vet. Microbiol. 90: 299-309.
105. Kurar, E, Splitter, G. (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. Vaccine 15: 1851-1857.
106. Leal-Klevezas, DS, López-Merino, A, Martínez-Soriano, JP. (1995). Molecular detection of *Brucella spp.*: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. Arch Med Res; 26(3): 263-267.
107. Liautard, JP, Gross, A, Dornand, J, Kohler S. (1996). Interactions between professional phagocytes and *Brucella spp.* Microbiol. 12: 196-206.
108. Lopetegui, P. (1995). Estrategia técnica para la Erradicación de la Brucelosis Bovina. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0301-732X200900020001100011&pid=S0301-732X2009000200011&lng=es>
Fecha de consulta: 19 de diciembre, 2011.
109. Lopetégui, P. (1997). "Vacuna RB51 en la erradicación de brucelosis en Chile". Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Rev. Tec. Vet. 3(3): 82-101.
110. Lopetegui, P. (1998). Erradicación de brucelosis bovina en Chile. Experiencia en el uso de la vacuna cepa RB51. Luna E, Suárez F. III Foro Nacional de Brucelosis, Acapulco, México. p. 159-179.
111. López, J, Best, A, Morales, C. (1998). Diagnóstico de Brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). Arch. Med. Vet. 30 (1): 133-138.

112. López, A, Contreras, A. (2004). *Brucella*. Scand J. Infect. Dis. 36: 636-638.
113. Lord, VR, Schurig, GG, Cherwonogrodzky, JW, Marcano, MJ, Melendez, GE. (1998). Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. Amer. J. Vet. Res. 59: 1016-1020.
114. Liautard, JP, Gross, A, Dornand, J, Kohler, S. (1996). Interactions between professional phagocytes and *Brucella spp.* Microbiol. 12: 197-206.
115. Llarmon, B, Adams, L, Frey, M. (1988). Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. Amer. J. Vet. Res. 49: 1092-1097.
116. Mac-Millan, A. (1990). Conventional serological test. Cha 8. En: Nielsen, K. and R. Duncan, (Eds). Animal Brucellosis. Boca Raton CRC. p. 153-198.
117. Mandell, G, Bennet, J, Dolin, R. (1995). Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone. 4a. ed. Philadelphia. 2: 2053-2057.
118. Martínez de Tejada, G, Pizarro-Cerdá, J, Moreno, E, Moriyón, I. (1995). The outer membranes of *Brucella spp.* are resistant to bactericidal cationic peptides. Inf. Inm. 63: 3054-3061.
119. Martínez-Soriano, JP, Cab-Barrera, EL, Tamez-González, R, Leal-Klevezas, DS. (1993). Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquímica; 18(4): 10-16.
120. McDonel, J. (1990). *Brucella* vaccines. En: Mizrahi, A. ed. Advances in Biotechnological Processes. Bacterial Vaccines. New York, Wiley-Liss, 13: 105-122.
121. Meador, V, Deyoe, B. (1989). Intracellular Localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. Vet. Pathol. 26: 513-515.
122. Megid, J, Ribeiro, M, Marcos, G. (2000). Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis. Brazil. J. Vet. Res. Anim. Sci. 37(5): 107-141.

123. Metcalf, HE. (1986). Control of bovine brucellosis in the United States En: Woods GT, (ed). Practices in Veterinary Public Health and Preventive Medicine in the United States. Iowa: Iowa State University, 97-100.
124. Meyer, ME. (1990). Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. En: Nielsen, K. Duncan R. (eds). Animal Brucellosis. Boca Raton CRC. p. 1-18.
125. Meyer, M. (1995). The epizootiology of brucellosis and its relationship to the identification of *Brucella* organisms. Am. J. Vet. Res. 25: 553-557.
126. Michaux-Charachon, S, Bourg, G, Jumas-Bilak, E, Guigue-Talet, P, Allardet-Servent, A, O'Callaghan, D. (1997). Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J. Bacteriol, 179 (10): 3244-3249.
127. Ministério da Agricultura. (1997). Boletim de Defesa Sanitária Animal, 1-4: 17 p.
128. Monack, DM, Meccas, J, Ghori, N, Falkow, S. (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. Proceedings of the National Academy of Science USA. 94, p. 10385-10390.
129. Montaña, NI, Rueda, OE, Calderón, CP, Ortega, A, Puentes, AR. (1998). Medición de la respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *B. abortus* RB51 en bovinos. Arch. Med. Vet. 30: 110-115.
130. Montaraz, JA, Winter, AJ. (1986). Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/C mice. Inf. Inm. 53: 245-251.
131. Moreno, E, Speth, SL, Jones, LM, Berman, DT. (1981). Immunochemical characterization of *Brucella* lipo-polysaccharides and polysaccharides. Infect. Immun. 31(1): 214-222.
132. 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. 40: 243-249.
133. Morgan, BWJ, MacKinnon, DJ, Gill KPW, Gower, SGM, Norris, PIW. (1987). Brucellosis diagnosis: standard laboratory techniques. London: MAFF/ HMSO, p. 5-30.

134. Moyer, N, Evins, G, Pigott, N, Hudson, J, Farshy, C, Feeley, J, Hausler, J. (1987). Comparison of Serologic Screening Test for Brucellosis. J. Clin. Microbiol. 25(10): 1969-1972.
135. Müller, A, Hacker, J, Brand, BC. (1996). Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL60 cells By Legionella pneumophila infection. Inf. Inm. 64: 4900-4906.
136. Mullis, K, Faloona, F. (1987). Specific synthesis DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. Meth. Enzimol. 55: 1335-1350.
137. Murphy, EA, Sathiyaseelan, J, Parent, MA, Zou, B, Baldwin, CL. (2001). Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. Immunology. 103: 511-518.
138. Navarro, F. (1995). Determinación de la prevalencia serológica de brucelosis bovina en distintas zonas de la república Argentina. Tesis Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río de Cuarto-Argentina, 76 p. Disponible en: [www.produccionbovina.com/.../06-determinacion de la prevalencia.pdf](http://www.produccionbovina.com/.../06-determinacion-de-la-prevalencia.pdf) Fecha de consulta: 10 de febrero, 2012.
139. Nicoletti, P. (1990). Vaccination. En: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds), Animal Brucellosis. Boca Raton, CRC p. 284-299.
140. Nicoletti, P. (1994). Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. Bovis 57: 17-25.
141. Nicoletti, P. (2002). A short history of brucellosis. Vet. Microbiol. 90: 5-9.
142. Nielsen, K, Wright, PF, Kelly, WA, JW, Cherwonogrodzky. (1988). A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle, Vet. Immunol. Immunopathol. 24: 373-382.
143. Nielsen, K. (1990). The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* 0:9 or to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassay, Vet. Immunol. Immunopathol. 24 (4): 373-382.
144. Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology, Vet. Microbiol. 90: 447-459.
145. OIE (2010). Pruebas de diagnóstico prescritas y de sustitución para las enfermedades de la lista de la OIE. Disponible en:

146. Oliveira, S, Zhu, Y, Splitter, G. (1994). Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gamma-irradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4+ T cells. *Immunology* 83: 659-664.
147. Oliveira, SC, Splitter, GA. (1996). CD8+ type 1 CD44hiCD45Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II deficient mice. *European J. Immunol.* 25: 2551-2557.
148. Oliveira, S, Harms, J, Banai, M, Splitter G. (1996). Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella* vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell. Immunol.* 172: 262-268.
149. Oliveira, SC, Soeurt, N, Splitter, G. (2002). Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.* 90: 417-424.
150. Olivera, SC, Harms, JS, Rech, EL, Rodarte RS, Bocca AL, Goes, AM, Splitter, GA. (1998). The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 31: 77-84.
151. Olsen, SC, Evans, D, Hennager, SG, Cheville, NF, Stevens, MG. (1996). Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J. Vet. Diag. Invest.* 8: 451-454.
152. Olsen, S. (2000). Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res. Vet. Sci.* 69: 135-140.
153. Oñate, A, Folch, H. (1995). Proteína de 18.5 KDa: un antígeno interesante en *Brucella*. *Arch. Med. Vet.* 27: 93-102.
154. Oñate, A, Vemulapalli, R, Andrews, E, Schurig, G, Boyle, S, Folch, H. (1999). Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect. Immun.* 67: 986-988.
155. Oñate, A, Donoso, G, Moraga-Cid, G, Folch, H, Céspedes, S, Andrews, E. (2005). A RNA Vaccine Based on Recombinant Semliki Forest Virus

- Particles Expressing Cu/Zn Superoxide Dismutase Protein of *Brucella abortus* Induces Protective immunity in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 73: 3294-3300.
156. Osterman, B, Moriyon, I. (2006). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. *International J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1173–1175.
 157. Palmer, MV, Cheville, NF, Jensen, AE. (1996). Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet. Pathol.* 33: 682-691.
 158. Palmer, MV, Olsen, SC, Cheville, NF. (1997). Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Amer. J. Vet. Res.* 58: 472-477.
 159. Pasquali, P, Adone, R, Gasbarre, L, Pistoia, C, Ciuchini, F. (2001). Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect. Immun.* 69: 6541-6544.
 160. Perry, M, Bundle, DR. (1990). Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 58:1391-1395.
 161. Pizarro-Cerda, J, Merece, S, Parton, R, Der-Goot, G, Sola- Landa, A, Lopez-Goñi, I, Moreno, E, Gorvel, J. (1998). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 66: 5711-5724.
 162. Pluma, B, Alonso, M, Mesa, R, Carrero, R, Guedes, J. (2000). Obtención y evaluación de la vacuna cubana contra la brucelosis bovina. *Rev. Cub. Cien. Vet.* 26(1):30-32.
 163. Qureshi, T, Templeton, JW, Adams, GA. (1996). Intracellular survival of *B. abortus*, *M. bovis* (BCG), *S. dublin* and *S. typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet. Imm. Immunop.* 50: 55-65.
 164. Ragan, VE. (2002). The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in United States. *Vet. Microbiol.* 90: 11-18.

165. Ragan, VE, Ragan, JR. (2012). Revisión del programa de brucelosis bovina en el Uruguay y recomendaciones para su mejora. Consultores para el Ministerio de Ganadería, Agricultura Y Pesca, Dirección General de Servicios Ganaderos. Montevideo, MGAP. 35 p.
166. Riley, LK, Robertson, DC. (1984). Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Inf. Immunol.* 46: 224-230.
167. Rivera, SA, Ramírez, MC, Lopetegui, P. (2002). Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. *Vet. Microbiol.* 90: 45-53.
168. Rodríguez, A, Orduña, A, Ariza, X, Moriyon, I, Díaz, R, Blasco, J, Almaraz, A, Martínez, F, Ruiz C, Abad, R. (2001). Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León. Zamora. 70 p.
169. Rodríguez, Y, Ramírez, W, Antúnez, G, Pérez, S, Ramírez, Y, Igarza A. (2005). Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. *Rev. Elec. Vet. REDVET.* 6: 1-9. Disponible en: www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905/090503.pdf Fecha de consulta: 10 de junio, 2012.
170. Rojas, X, Contreras, A. (1997). Vacunas contra Brucelosis. *Rev Soc Chilena Buiatría.* 5: 16-20.
171. Roop, II R, Fletcher, T, Sriranganathan, N, Boyle, S, Schurig, G. (1994). Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. *Infect. Immun.* 62: 1000-1007.
172. Rosso, E. (2002). "Consideraciones a tener en la lucha contra la brucelosis bovina". (SMVU). Sociedad de Medicina Veterinaria de Uruguay. Montevideo, Uruguay. Disponible en: http://www.smvu.com.uy/Paginas/artecom_63.asp Fecha de consulta: 15 noviembre, 2010.
173. Richey, EJ, Harrel, CD. (1997). *Brucella abortus* disease (Brucellosis) in beef cattle. Institute of Food and Agricultural Sciences. 100: 1-6.
174. Rodriguez, A, Orduña, A, Ariza, X, Moriyón, I, Diaz, R, Blasco, JM, Almaraz, A, Martínez F, Ruiz, C, Abad, R. (2002). Manual de Brucelosis. Junta de Catilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar social, Catilla-España, 139 p.

175. Ruckdeschel, K, Harb, S, Roggenkamp, A, Hornef, M, Zumbihl, R, Köhler, S, Heesemann, J, Rouot, B. (1998). *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage TNF- α production. J. Exp. Med. 187: 1069-1079.
176. Saldarriaga, A, Sossa, JE, Rugeles, MT. (2002). Respuesta inmune y estrategias de avesión durante la infección con *Brucella* spp. Rev. Colombiana Cienc. Pec. 15: 180-188.
177. Salhi, I, Boigegrain, RA, Machold, J, Weise, C, Cloeckert, A, Rouot, B. (2003) Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. Infect. Immun. 71(8): 4326-4332.
178. Samartino, L, Gall, D, Gregoret, R, Nielsen, K. (1999). Validation of enzymelinked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Microbiol. 70:193-200.
179. Samartino, LE. (2002). Brucellosis in Argentina. Vet. Microbiol. 90: 71-80.
180. Samartino, LE. (2003). Aspectos Generales de la Brucelosis Bovina. Jornada de Actualización Técnica. INTA, Castelar. Argentina. 69 p.
181. Samartino, LE. (2006). Conceptos generales sobre brucelosis bovina. INTA. 1° Congreso ganadero CORFOGA, San José, Costa Rica, Agosto. 54 p.
182. Samartino, L, Schust, M, Piazza, E, Salustio, E, Conde, S. (2007) Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15: (Supl. 1) 56-61.
183. Sauret, J, Vilissova, N. (2002). Human Brucellosis. J. Am. Board. Fam. Pract. 15: 401-406.
184. Scalan, M. (1989). Introducción a la Bacteriología Veterinaria. Zaragoza, Acribia, p. 315-322.
185. Schurig, G. (1991). The role of cell mediated immunity in brucellosis. En: Networking in brucellosis research. Report of the united nations university brucellosis research network. New York. J. Frank. 93-96 p.
186. Schurig, G, Sriranganathan, N, Corbel, M. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet. Microbiol. 90: 479-496.
187. 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. 84 p.
188. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). (1999). Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis bovina. Resolución 115/99. Mimeo 62 p.
 189. SMVU (Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay), (2011). Informe Técnico 28 de febrero de 2011. p. 1-5. Disponible en: <http://www.smvu.com.uy/> Fecha de consulta: 15 de febrero de 2012.
 190. Solís-Salas, TV (2008). Cinética de anticuerpos en terneras inmunizadas contra *Brucella*, mediante la vacuna Cepa 19 (B-19). Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de ciencias agropecuarias, p. 161.
 191. Spencer, TL, Burges, GW. (1984) Enzyme-linked immuno-sorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. Res. Vet. Sci. 36: 194-198.
 192. Stemshorn, B, Nielsen, K. (1981). The bovine immune response to *Brucella abortus* IV. Studies with a double immunodiffusion test for antibody against A2. Can. J. Comp. Med. 45 (2): 147-153 p.
 193. Stevens, MG, Olsen, S, Pugh, G. (1994). Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* 2308 or RB51 antigens in mice infected with strain 2308, RB51, or 19. Inf. Imm. 62: 4659-4663.
 194. Stevens, MG, Olsen, S. (1996). Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. Inf. Imm. 64: 1030-1034.
 195. Svetic, A, Jian, YC, Lu, P, Finkelman, FD, Gause, WC. (1993). *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterised by elevated IL-10 and IFN γ in CD4⁺ T cells. Int. Imm. 5: 877-883.
 196. Szyfres, B. (1973). Curso de Brucelosis. Centro Panamericano de Brucelosis. Buenos Aires - Argentina. p. 1-4.
 197. Tang, D, Devit, M, Johnston, S. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature 356: 152-154.
 198. Tatum, FM, Detilleux, PG, Sacks, JM, Halling, SM. (1992). Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: Analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. Inf. Imm. 60: 2863-2869.

199. Tizard, I. (1995). *Inmunología veterinaria*. 4a ed. México, McGraw-Hill. Interoamericana. p. 242-266.
200. Van-Metre, D, Kennedy, G, Olsen, S, Hansen, G, Ewalt, D. (1999). Brucellosis induced by RB51 vaccine in a pregnant heifer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215: 1491-1493.
201. Veirano, FR. (2001). *La Ganadería del pasado y del Futuro*. Serie de Estudios producción y Medio Ambiente. Fundación para el desarrollo Socio Económico. Asunción-Paraguay. 36 p.
202. Velikovskiy, C, Cassataro, J, Giambartolomei, G, Goldbaum, F, Estein, S, Bowden, R, Bruno, L, Ffossati, C, Spitz, M. (2002). A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Imm* 70: 2507-2511.
203. Vemulapalli, R, He, Y, Buccolo, L, Boyle, S, Sriranganathan, N, Schurig, G. (2000). Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change rough phenotype and attenuation. *Infect. Imm.* 68: 3927-3932.
204. Verger, J, Grimont, F, Grimont P, Grayon, M. (1995) *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 292-295.
205. Vinhas, C. (1958). Sogestões para um programa de erradicação de Brucelose. *Rev. Bras. Malariol.* 10: 101-110.
206. Villamill, M, Rueda, E, Gallero, Y, O. Mariño, O, Guitierrez de Gerardino, A, (1995). Respuesta inmune humoral y celular en cobayos inmunizados con proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* Cepa RB 51. *Arch. Med. Vet.* 27: 77-84.
207. Viogt, A, Kleine, F. (2001). *Zonosis*. Zaragoza, Acribia, Esp. 169-172 p.
208. Weinrauch Y, e Zychlinsky A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.* 53: 155-187.
209. WHO, (1997) *The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting with the participation of the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) and the Office International des Epizooties (OIE)*. World Health Organization. Geneva, Switzerland 11-12 December 1997. 145 p.

210. Wilfert CM. (1986). *Brucella*. En: Zinsser, Microbiología. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18a ed. Buenos Aires. Médica Panamericana, p. 764-771.
211. William, C. (1999). Enfermedades del ganado vacuno lechero. Zaragoza, Acribia. p 623-626.
212. Winter, AJ, Duncan, JR, Santisteban, CG, Douglas, JT, Adams, LG. (1989). Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. *Inf. Imm.* 57: 3438-3444.
213. Winter, AJ, Schurig, GG, Boyle, SM, Srigananathan, N, Bevins, JS, Enright, FM, Elzer, PH, Kopec, JD. (1996). Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Amer. J. Vet. Res.* 57: 677-683.
214. Wyatt, HV. (1999). Royal Navy Surgeons and the transmission of brucellosis by goats' milk. *R. Naval Med. Serv.* 85: 112-117.
215. Yagupsky, P. (1999). Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J Clin Microbiol* 37: 3437-3442.
216. Yanagi, M, Yamasoto, K. (1993). Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of the 16S genes using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett*; 107(1): 115-120.
217. Zaitseva, MB, Golding, H, Betts, M, Yamauchi, A, Bloom, ET. (1995). Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heat-inactivated *Brucella abortus*. *Inf. Imm.* 63: 2720-2728.
218. Zaitseva, M, Golding, H, Manischewitz, J, Webb, D, Golding, B. (1996). *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Inf. Imm.* 64: 3109-3117.
219. Zambrano, A, Chiriguayo, B, Villalva, F, Loor, K. (1991). Eficacia de dosis reducida en la vacunación de adultos de hatos vacunos infectados con brucelosis. En: Networking brucellosis research. Report of the united nations university brucellosis research network. New York J. Frank, p. 97-99.

220. Zhan, Y, Kelso, A, Cheers, C. (1993). Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Immunology*. 80: 458-464.
221. Zhan, Y, Chang, J, Cheers, C. (1993a). Cytokine response of, T-cells subsets from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Inf. Imm.* 61: 2841-2847.
222. Zhan, Y, Kelso, A, Cheers, CH. (1995). Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cell by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Inf. Imm.* 63: 969-975.
223. Zhan, Y, Cheers, CH. (1995b). Differential induction of macrophages-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro. *Inf. Imm.* 63: 720-723.
224. Zhan, Y, Liu, ZA, Cheers, CH. (1996). Tumor necrosis factor alpha and Interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Inf. Imm.* 64: 2782-2786.