

Brucelosis bovina

Dr. Raúl Casas Olascoaga

Montevideo, 23 de Junio de 2007

Perfil inicial fue presentado en el "Centro Médico Veterinario de Durazno,"

Ciudad de Durazno, 29 de Junio de 2007.

Dedicado a los veterinarios de campo y productores ganaderos

DEFINICIÓN Y CARACTERES GENERALES DE LA BRUCELOSIS BOVINA

La brucelosis bovina es una enfermedad infecciosa específica causada por *Brucella abortus* que afecta principalmente a los bovinos y secundariamente a otras especies animales (en orden decreciente de susceptibilidad puede extenderse a: ovinos, caprinos, equinos, porcinos y caninos) y a los humanos.

Brucella abortus es una bacteria gram-negativa, parásito intracelular con predilección por el sistema retículo- endotelial y los órganos de la reproducción.

Posee 8 Biotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, los cuales difieren entre sí solamente en sus caracteres bioquímicos o serológicos o en ambos pero causan una enfermedad similar.

Se caracteriza por bacteriemia con infección generalizada e inflamación y localización preferencial en los órganos genitales, membranas fetales y maternas con endometritis, cotiledonitis necrótica, adenitis en ganglios linfáticos, mastitis en glándula mamaria y formación de lesiones localizadas en varios órganos.

Clínicamente se caracteriza por abortos, retención de placenta, partos prematuros, terneros recién nacidos débiles, esterilidad e infertilidad temporal o permanente, mastitis con disminución de la lactación e inflamación de los ganglios linfáticos mamaros; orquitis y epididimitis en el toro y lesiones en glándulas genitales accesorias (vesiculitis seminal, ampullitis); y ocasionalmente artritis, bursitis y en casos crónicos, higromas.

La transmisión principal y más frecuente de la infección es por vía oral: hábito

del vacuno -hembra y macho- de lamer sobre fetos, terneros recién nacidos, placenta y cotiledones, excreciones uterinas y vulvares; ingestión de forrajes, calostro, leche y agua contaminados con brucelas.

Las hembras son más infecciosas y liberan enormes concentraciones de brucelas en la parición, aborto y parto prematuro y por vía mamaria.

Ocasionalmente, puede ocurrir infección por las vías conjuntival, cutánea, pezones mamaros.

La transmisión por inhalación aerógena es posible cuando en establos, galpones y espacios cerrados, cohabitan animales susceptibles con animales infectados que pueden liberar aerosoles con altas concentraciones de la bacteria.

En la monta natural, la transmisión por la vía vaginal requiere una alta dosis de brucelas para infectar una hembra y no es frecuente; mientras que por inseminación artificial intrauterina con semen contaminado con brucelas la infección se transmite con mucha mayor facilidad.

Sinonimia: Enfermedad de Bang

Aborto Contagioso

Aborto Enzoótico

GUÍA DE UN PLAN SANITARIO PARA CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN UN ESTABLECIMIENTO GANADERO

El propietario o su administrador y el veterinario deben definir un plan de acción ya sea para la prevención de la brucelosis o para el control y erradicación de la brucelosis en una hacienda afectada

o sospechosa de estar infectada por *Brucella abortus*.

El plan debe aplicar los mejores procedimientos de manejo sanitario para prevenir, controlar y eliminar la brucelosis en la hacienda.

Debe tener un costo-beneficio lo más favorable posible que comprenda el sistema de producción, los antecedentes de la salud/sanidad del establecimiento, las posibilidades y las limitaciones de manejo en la hacienda y el sistema de comercialización de animales (ingresos y egresos).

Se deberá instruir y adiestrar al personal explicando en detalle los procedimientos y responsabilidades para la aplicación eficiente y eficaz de todo el proceso que demandará la ejecución del plan.

El plan debe incluir las medidas de salud pública veterinaria para la prevención de la infección del personal del establecimiento.

Se hará una síntesis de los problemas sanitarios y se establecerán o mejorarán los registros sanitarios del establecimiento.

La instrumentación del programa sanitario exige que el administrador evalúe, entienda y acepte que se trata de una acción sanitaria ejecutada por un equipo en el cual todos sus integrantes son importantes y que el veterinario es un miembro del equipo y no solamente un "pres-tador" de servicios de emergencia o circunstancias.

Deberá conocer e interpretar las disposiciones legales y reglamentarias vigentes que se aplicarán en el proceso de saneamiento.

El veterinario debe contribuir con su pericia y dedicación a que se alcancen los objetivos y metas trazadas en el plan-programa con la mayor efectividad.

El plan deberá tener la aprobación y seguimiento del veterinario del servicio veterinario nacional, Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG/MGAP).

El plan de saneamiento debe ser un esfuerzo cooperativo entre el productor y su veterinario y el veterinario oficial que tiene a cargo su regulación.

El plan-programa comprenderá:

- I. La aplicación del análisis de riesgo y puntos críticos de control el cual ofrece un enfoque sistemático para la identificación y control de una variedad de peligros biológicos, ambientales y comerciales en el sistema de producción animal de cada establecimiento pecuario. (Anexo 1: "Análisis de riesgo y puntos críticos de control" Modelo simplificado).
- II. Evaluar e identificar el riesgo y los peligros asociados con la producción y comercio del establecimiento en relación con la brucelosis.
- III. Determinar los principales factores de riesgo que afectan la introducción de la infección/enfermedad desde fuentes externas o la incidencia interna.
- IV. Establecer la lista de puntos críticos de control necesarios para mitigar el riesgo y controlar los peligros.
- V. Establecer metas y límites para cada punto crítico de control y un cronograma para su ejecución.
- VI. Aplicar las mejores prácticas de manejo productivo y sanitario incluidas las medidas de bioseguridad y biocontención para la prevención, control y eliminación de la brucelosis en el establecimiento problema.

- VII. Llevar a cabo el seguimiento y monitoreo continuo del plan de acción.
- VIII. Evaluar y adoptar medidas correctivas y ajustes de procedimientos y cronograma, si es necesario, para verificar y mantener la efectividad del proceso sanitario.
- IX. Establecer un sistema de registros para documentar el proceso productivo, sanitario y comercial.
- X. Escribir y documentar el plan de acción.
- XI. Determinar el intervalo entre las pruebas de examen para el saneamiento del rodeo del establecimiento (infectado, sospechoso, indemne, libre).
- XII. Pruebas diagnósticas a utilizar.
- XIII. Estrategia de vacunación y tipo de vacuna.*
- XIV. No uso de la vacunación.
- XV. Identificación individual permanente de los animales del rodeo que asegura su rastreabilidad/trazabilidad individual y grupal.
- XVI. Marcado indeleble de los animales "reaccionantes" y su remisión obligatoria a la faena sanitaria según las normas reglamentarias.
- XVII. Planificar las fuentes de reemplazo de los animales "reaccionantes" (Positivos).
- XVIII. Lograr la meta de eliminación de la brucelosis en la hacienda a través del proceso sistemático de saneamiento.
- XIX. Certificación del establecimiento libre de brucelosis.

1. Diagnóstico de la brucelosis bovina

- El veterinario debe analizar la historia de la hacienda, su composición, manejo y dinámica del rodeo, los in-

gresos y egresos de animales, los antecedentes de parición y procreo, vacunaciones diversas, presencia de otras especies animales susceptibles, presencia de signos clínicos y los resultados de exámenes previos.

- Se debe agregar la información sobre la condición sanitaria de los establecimientos linderos y vinculados con la hacienda investigada.
- Esta evaluación integral u holística de la hacienda puede permitir el descarte de la brucelosis o aumentar la exactitud de sospecha de la presencia de la enfermedad.
- Las pruebas diagnósticas racionalmente aplicadas permitirán identificar los animales infectados.

La epidemiología es la ciencia del rastreo de la infección/enfermedad en una población que comporta la investigación de su origen, frecuencia, como y donde se ha diseminado en la población animal y las medidas para su prevención y control.

2. Método de diagnóstico directo

La obtención de muestras del animal, ya sea ganglios o flujos uterinos y vaginales, placenta y cotiledones, fetos, leche, semen, sangre, hacen posible el diagnóstico bacteriológico directo con el cultivo, aislamiento y caracterización de *Brucella abortus*, el cual es concluyente demostración de infección. (Cuando se practica la vacunación en hembras adultas es necesario diferenciar si el aislamiento es de una cepa virulenta o de la cepa de vacuna ya que un porcentaje muy bajo de hembras vacunadas podría alojar en la ubre la cepa atenuada de vacuna).

Un examen bacteriológico negativo no ofrece garantía que el animal está libre de infección.

El examen bacteriológico lleva tiempo y es costoso.

*Los conceptos sobre las vacunas contra la brucelosis bovina se anexan en:

"Informe sobre vacunas y vacunación contra Brucelosis bovina" Raúl Casas Olascoaga, Academia Nacional de Veterinaria, Veterinaria, (Montevideo) 38 (152-153) 31-41:2003.

"Resenha da Epidemiologia da Brucelose Bovina" Raúl Casas Olascoaga, en portugués, Río de Janeiro, Brasil, pp.1-49, Julho, 1985, Rev.1, 1989

Esta Guía de carácter práctico refleja la opinión del autor y ha sido elaborada en apoyo de los veterinarios y productores que trabajan y producen en las haciendas rurales dedicadas a la cría y producción de vacunos y en respuesta a la solicitud del Centro Médico Veterinario de Durazno, en la sede de la Sociedad Rural de Durazno, ciudad de Durazno el 29 de Agosto de 2007.

La Guía fue presentada por su autor en la 11ª Jornada de Educación Continua y 2º Simposio de Vigilancia Epidemiológica del Uruguay, organizados por el Centro Médico Veterinario de Cerro Largo y celebrados en el Centro de la Sociedad Agropecuaria de Cerro Largo, Melo, Cerro Largo el 4-5 de Octubre de 2007.

El diagnóstico directo debe ser usado, toda vez que sea posible y necesario, para confirmar la infección humana o animal y para descubrir casos con infección crónica.

Las técnicas de bioingeniería como la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) permiten un diagnóstico rápido pero no siempre están accesibles o disponibles.

3. Métodos diagnósticos indirectos

Las pruebas con suero sanguíneo, leche, crema, líquido seminal efectuadas con reactivos padronizados dan evidencias indirectas de la infección.

Hay un buen número de pruebas indirectas, presuntivas y de pruebas diagnósticas confirmatorias o suplementarias, pero ninguna es 100% efectiva en todas las fases de la evolución de la infección que caracterizan la brucelosis. Las pruebas individuales no siempre predicen el verdadero estado del animal en relación a la infección/enfermedad. La combinación de las pruebas y la repetición de los exámenes hacen posible que con exactitud pueda lograrse el diagnóstico en la "unidad epidemiológica del rodeo o rebaño".

En el diagnóstico se requiere responsabilidad y eficacia ya que basado en los resultados de las pruebas indirectas es que se adoptan y aplican las decisiones sobre sacrificio sanitario, interdicción/cuarentena, despoblación, vacunación, las cuales son trascendentes para el futuro productivo y económico del establecimiento afectado.

4. Respuesta a la infección con producción de anticuerpos específicos

En la brucelosis bovina el período de incubación puede ser tan breve como 10 días y tan largo como 280 días. Con mayor frecuencia la aparición de anticuerpos serológicamente diagnosticables se presenta a las 3 a 12 semanas de la infección.

El animal responde a la infección con la producción simultánea o ligeramente diferida de anticuerpos específicos de las clases Inmunomacroglobulinas (IgM) e Inmunogamaglobulinas IgG1 e IgG2 e IgA.

La IgM es el anticuerpo producido más precozmente en la respuesta inmune a la infección pero también ocurre muy rápidamente la producción de las IgG e IgA.

A medida que la infección progresa las IgM declinan y tienden a desaparecer mientras que las IgG alcanzan un nivel más alto, se estabilizan y persisten por períodos más prolongados. En el tiempo de evolución de la infección prevalece la IgG1 mientras que la IgG2 es más variable.

En la leche se presentan los cuatro tipos homólogos, si bien predominan las IgG y las IgA.

La formación de anticuerpos depende de la especie animal y edad del animal, estado inmunitario, cepa infectante, dosis de exposición y vía de inoculación, repetición del estímulo antigénico, sea por re-infección o vacunación, estado fisiológico de los órganos de reproducción.

La repetición del estímulo antigénico, por re-infección o vacunación, genera una síntesis y persistencia mayor de las IgG, en cambio, la respuesta secundaria de las IgM se comporta como un simple estímulo primario.

Las IgG están ligadas a un estímulo antigénico fuerte y a un estado infeccioso progresivo y activo que puede evolucionar a un estado crónico de la enfermedad.

Los bovinos infectados con cepas lisas virulentas de *Brucella abortus* en las fases iniciales e intermedias de la infección desarrollan anticuerpos aglutinantes de alto título, los cuales declinan en la fase crónica de la enfermedad. Por el contrario los anticuerpos precipitantes, demostrados por inmunodifusión, persisten por largo tiempo y posiblemente durante toda la evolución de la infección/enfermedad.

Los grados de variabilidad de la especificidad y sensibilidad de las diferentes pruebas serológicas pueden originar reacciones de *falsos positivos* y *falsos negativos*.

Un método de gran sensibilidad probablemente detectará la mayoría de los animales infectados pero podría clasificar "positivos" algunos animales no infectados, denominados "*falsos positivos*" (vacunaciones, reacciones cruzadas con

anticuerpos de otras infecciones antigénicamente relacionadas con *Brucella* sp.).

Un método de alta especificidad clasificará como positivos los animales infectados pero podría clasificar como negativos, por ejemplo, algunos animales recientemente expuestos a la infección o también animales infectados crónicamente en fase anérgica, denominados "*falsos negativos*".

Por lo tanto, es importante que el método tenga un equilibrio en su sensibilidad/especificidad y haya sido padronizado y validado.

En las brucelas clásicas (*Brucella abortus*, *melitensis*, *suis*) que se presentan en forma lisa, el antígeno principal que interviene en las reacciones es el lipopolisacárido. Las bacterias gramnegativas poseen una doble capa de lípidos externa donde los lipopolisacáridos están embebidos.

La *Brucella abortus* Cepa 19 es también lisa pero de virulencia atenuada y la vacunación genera respuesta inmune similar a la de las cepas lisas virulentas. En cambio, la cepa de *Brucella abortus* RB51 es rugosa y atenuada y no da respuesta serológica detectable por las pruebas con antígenos lisos usados en la rutina de laboratorio, pero se puede detectar la respuesta serológica a la vacunación con antígenos de cepas rugosas de brucelas.

5. Los anticuerpos que circulan en el organismo animal son uno de los mecanismos de defensa contra la infección

Pero en el caso de la brucelosis estos anticuerpos circulantes no actúan efectivamente en contener la infección debido a que la brucella no solo circula en la sangre sino que se aloja intracelularmente. Estos anticuerpos específicos son de gran utilidad en el diagnóstico de la brucelosis.

Los métodos con suero sanguíneo y otras secreciones (leche, líquido seminal) se basan en la presencia de los anticuerpos específicos en el animal infectado.

La necesidad, por razones operativas y económicas, de usar pruebas tamiz en el diagnóstico de la brucelosis animal ha exigido el uso de diferentes esquemas de vigilancia y diagnóstico.

El uso de la aglutinación estándar rápida en placa (ARP, Huddleson) como prueba tamiz o de descarte en el diagnóstico se basa principalmente en la detección de IgM e IgG2 pero no revela las IgG1. Este método, que fuera mundialmente usado en programas de control/erradicación ha sido sustituido por métodos de mayor sensibilidad y especificidad.

En cambio, si se emplea la aglutinación a pH ácido de 3.6-3.85, como ocurre en las pruebas de Rosa de Bengala (pH 3.65) y el antígeno bufferado acidificado (BAPA) se revelaran principalmente las IgG1 pero no las IgG2. Esta mezcla del suero- antígeno a pH menor de 4,0 inhibe las aglutininas IgM y las heteroespecíficas.

En este esquema el uso de los métodos de fijación de complemento padronizado, prueba inmunoabsorbente enzimático indirecta (ELISAI), prueba inmunoabsorbente enzimático competitiva (ELISAc), prueba polarización-fluorescente (PF), como pruebas confirmatorias de los resultados de los sueros reaccionantes en las pruebas tamiz (Rosa de Bengala, BAPA) presentaran una excelente correlación.

Un esquema de la producción de anticuerpos se sintetiza a continuación:

a) Periodo de incubación

Inicio de la infección y ausencia o inicio incipiente de la respuesta en anticuerpos no detectables. En este periodo no será posible obtener un diagnóstico y será necesario repetir el examen más tarde.

b) Producción precoz de anticuerpos

En esta fase, si la exposición es una dosis infecciosa baja, habrá una producción menor de anticuerpos los cuales pueden ser revelados por las pruebas de alta sensibilidad, como Rosa de Bengala, BAPA.

c) Producción creciente de anticuerpos

En esta fase los animales infectados pueden ser detectados no solo por las pruebas de alta sensibilidad (Rosa de Bengala, BAPA, PAL, Polarización-fluorescente) sino también por pruebas de menor sensibilidad y mayor especificidad.

d) Producción de alto nivel de anticuerpos

La infección cursa su fase aguda y los anticuerpos alcanzan su pico máximo de formación. La mayoría de las pruebas indicarán la infección.

e) Fase de declinación de los anticuerpos

En animales con infección crónica hay disminución de los anticuerpos y periodos de intermitencia y variabilidad en su presencia en el organismo. En estos animales el diagnóstico puede ser incierto y se necesita un seguimiento y repetición de las pruebas.

5. Los métodos serológicos padronizados y validados usados en la vigilancia como pruebas tamiz son rápidos y de alta sensibilidad

Los métodos de Rosa de Bengala, Antígeno Brucella Bufferado (BBAT o BAPA) son sencillos y de uso extenso y a ellos se agregan la Polarización-fluorescente y ELISAs.

6. Los métodos confirmatorios incluyen la Prueba de Fijación de Complemento (PFC), pruebas Inmunoabsorbente enzimático ELISAs), ensayo de polarización-fluorescente (PF), 2-mercapto-etanol y prueba de Rivanol

Pruebas presuntivas usadas en la Vigilancia Epidemiológica para identificar establecimientos sospechosos de padecer brucelosis.

Las pruebas presuntivas tienen alta sensibilidad y son usadas en la vigilancia como tamiz para procesar un gran número de muestras a fin de identificar animales positivos y hacer el rastreo epidemiológico de los establecimientos de origen.

Las muestras positivas deben ser sometidas a pruebas confirmatorias.

1. Prueba del Anillo en Leche (PAL)

La prueba de PAL es usada en los tambos como prueba tamiz para detectar la presencia de anticuerpos específicos en la leche.

Es una prueba presuntiva que permite la vigilancia del hato lechero por medio de exámenes grupales efectuadas 4 veces al año para permitir que las pruebas cubran el total de hembras en lactación rotadas anualmente en la hacienda.

La prueba puede dar "falsos positivos" en muestras con calostro y leche de vacas con mastitis y en animales recientemente vacunados.

Las muestras de leche deben reposarse por 24 horas antes de ser examinadas por PAL. La PAL no se debe hacer con leche pasteurizada ya que el calentamiento altera los resultados.

La sensibilidad de la PAL debe ajustarse según el tamaño del rodeo para compensar la dilución de la leche de los animales infectados con la leche del mayor número de animales negativos.

El número de vacas que integran la muestra tiene gran influencia en la sensibilidad de la PAL por lo que es necesario ajustar el volumen de la muestra de leche compuesta utilizado en la prueba de la siguiente manera:

1-150 hembras en lactación 1 ml. es el tamaño de la muestra en el montaje de la prueba; de 51-450 es 2 ml; de 451-700 es 3 ml.

En rodeos con más de 700 hembras en lactación deben segmentarse las muestras compuestas de leche distribuyendo en grupos de 25 a 75 animales en lactación y se utilizará para cada grupo 1ml de leche compuesta en la prueba. Este procedimiento asegura una mayor sensibilidad de la PAL en los grandes rodeos de vacas en lactación ya que elimina el factor de gran dilución de la leche de los animales infectados versus los animales indemnes.

Este criterio, con segmentación de las muestras en grupos más pequeño de hembras en lactación ofrece una mayor sensibilidad en la PAL para la vigilancia en "rodeos problemas" que presenten dificultades en el saneamiento.

La prueba de ELISA indirecta (ELISAI) en leche es de mayor sensibilidad y especificidad y recomendada para uso extenso.

El uso correcto de estas pruebas con leche disminuye los costos de identificación de establecimientos lecheros afectos.

tados por la brucelosis y es un instrumento técnico muy valioso para la vigilancia de la brucelosis.

- 1.1 Toda muestra de leche de un establecimiento que resulte positiva en la PAL o ELISAi exige examinar todo el rodeo para identificar los animales positivos.
- 1.2 Las pruebas PAL y ELISAi en leche tienen alta sensibilidad y pueden usarse individualmente o en muestras de leche o de crema de un grupo de animales o de tarros de leche o para detectar brucelosis en un hato o rodeo en mezclas de muestras extraídas de las líneas de bombeo de leche, de tanques de leche a granel refrigerados o en las usinas de leche.
- 1.3 Debe cumplirse estrictamente con los procedimientos y montaje de las pruebas.
- 1.4 La prueba positiva en leche clasifica el “rodeo como sospechoso” y debe ser seguida por el examen individual de los animales que componen el stock del establecimiento y los animales de campos de pastoreo o comunitarios y las vacas secas.

2. Prueba de Mercado Vacuno (PMV)

Es una prueba presuntiva rápida realizada en muestras recolectadas previa a la comercialización de animales (ferias, “remates en pantalla”, ventas particulares o en el momento del sacrificio en la planta de faena (frigoríficos, mataderos).

- 2.1 Los métodos serológicos usados extensamente en la PMV son el Rosa de Bengala y el BBAT o BAPA.
- 2.2 Usualmente la sangría para muestreos de vigilancia en puntos de comerciali-

zación o faena debe practicarse en animales de dos años de edad y mayores. Sin embargo, la reglamentación vigente es más exigente y establece el muestreo desde 12 meses de edad.**

- 2.3 Las hembras son las categorías más importantes para procesar la vigilancia debido a su importancia en la cadena epidemiológica de transmisión. Los machos también son susceptibles y pueden infectarse pero -salvo los toros- tienen escasa participación en la transmisión de la infección.
- 2.4 La Prueba de Mercado Vacuno (PMV) es una prueba presuntiva de vigilancia destinada a detectar animales positivos debidamente identificados. Exige poner en acción el sistema de rastreo epidemiológico para identificar el establecimiento de origen y proceder al examen por pruebas diagnósticas del rodeo en las categorías de animales indicadas en la reglamentación.

La PMV clasifica los resultados en positivos o negativos.

- 2.5 La Prueba de Mercado Vacuno negativa no implica que el animal está libre de infección ya que podría estar en el período de incubación y no haber aún desarrollado suficientes anticuerpos específicos detectables en esa fase incipiente de la infección. Una prueba negativa no permite inferir que dicho animal es libre de infección.

Las pruebas de un número de animales que tenga valor significativo con relación a la población total del establecimiento ofrecen una información valiosa sobre la condición de la hacienda.

3. Pruebas para exposiciones, remates y exportaciones

Todo animal positivo o sospechoso a las pruebas diagnósticas exige el rastreo del establecimiento de origen y el examen de todo el stock según las normas reglamentarias.

4. El apoyo de la red de laboratorios, de referencia, de rutina y de producción es básico para:

- 4.1 La selección de pruebas diagnósticas, prácticas y de adecuada sensibilidad y especificidad, a ser utilizadas en la vigilancia epidemiológica y en el diagnóstico bacteriológico y serológico.
- 4.2 La disponibilidad de fuentes confiables y seguras para la preparación y abastecimiento regular y suficiente de reactivos calificados.
- 4.3 El control de calidad y validación de los reactivos por el laboratorio oficial de referencia nacional, DILAVE “Miguel C. Rubino”.
- 4.4 La disponibilidad de una adecuada capacidad de procesamiento de muestras por la red laboratorios oficiales y privados debidamente acreditados, de acuerdo a la dinámica y cantidad que exige el programa de control, con alta eficiencia y eficacia.
- 4.5 El entrenamiento de los recursos humanos para el trabajo de laboratorio y para la obtención de muestras biológicas adecuadamente extraídas y remitidas en tiempo y forma.

**Además, en condiciones de aislamiento estricto, fue demostrado que terneras hijas de madres artificialmente infectadas y separadas de ellas al nacer, privadas del calostro y criadas en unidades de aislamiento, al alcanzar la madurez sexual fueron inseminadas artificialmente y preñadas, 4 de 22 vaquillonas abortaron y estaban infectadas las madres y sus fetos abortados. Las 22 hembras fueron sacrificadas a las seis semanas después de parir o abortar y en 4 hembras los órganos, ganglios y fetos examinados estaban infectados por *Brucella abortus*. Las reacciones serológicas de las vaquillonas habían permanecido negativas hasta 8 semanas previas al parto (Plommet, Francia, 1973).

La duración del período de incubación depende de la dosis de exposición a la bacteria, de la inmunidad natural o adquirida del animal expuesto, de la edad del animal, del estado de madurez sexual, del estado y fase de preñez y de la densidad y tamaño del rodeo y de su manejo.

El período de incubación se acorta cuando el animal recibe una dosis masiva de bacteria en un corto tiempo, ya sea por confinamiento y cohabitación, densidad de animales infectados e infecciosos o por exposición a dosis masivas de brucelas excretadas en los flujos útero-vaginales, calostro y leche de la vaca parturienta, o recién parida, en los abortos o terneros recién nacidos densamente contaminados con la bacteria.

Cuando la dosis infecciosa es reducida o el animal es resistente- parcial o totalmente- el período de incubación se prolonga o el animal puede bloquear la infección y no infectarse.

En promedio, desde que ocurre la exposición al agente infeccioso hasta la aparición de las reacciones positivas de anticuerpos específicos transcurren alrededor de tres a doce semanas. Período de peligro para la difusión inaparente o subclínica de la infección en el rodeo.

CONTROL Y ELIMINACIÓN DE LA BRUCELOSIS EN ESTABLECIMIENTO CON RODEO INFECTADO O SOSPECHOSO

Síntesis de procedimientos y recomendaciones en la hacienda problema

Tiene gran importancia la detección temprana de la infección/enfermedad en un establecimiento.

El veterinario de campo debe ser la primera línea de defensa en el diagnóstico precoz y en el control de la brucelosis y el productor depende de su pericia sobre la epidemiología de la brucelosis para la aplicación de las medidas de bioseguridad y biocontención en el manejo del rodeo.

Se requiere un sistema de vigilancia epidemiológica y de información y comunicación activo, dotado de suficientes recursos humanos bien capacitados y con efectivo apoyo logístico.

Los rodeos grandes, tanto lecheros como de ganado de carne, en condiciones de manejo sanitario ineficiente son los más predispuestos a la diseminación de la infección/enfermedad y en los que es más difícil y prolongado controlarla y eliminarla.

En rodeos de cría grandes infectados y especialmente con alta densidad hay siempre un número suficiente de animales excretores de brucelas en la fase de gestación-parición y a su vez hay un número expresivo de animales susceptibles expuestos a la infección que contribuyen a mantener activo el ciclo infeccioso.

Las haciendas pequeñas o medianas y "cerradas" al ingreso externo de animales favorecen el proceso de saneamiento y eliminación de la brucelosis.

En el país la gran faena de hembras bovinas que representan próximo al 48% del total de animales faenados anualmente contribuye a una mejor dinámica y renovación del rodeo bovino, el cual estará formado por categorías de edades más jóvenes favoreciendo el programa sanitario.

El control de la brucelosis bovina y su erradicación es un proceso continuo que exige responsabilidad, dedicación y esfuerzo conjunto del productor/empresario rural, el veterinario privado, el servicio veterinario nacional, la red de laboratorios y todos los segmentos de la cadena de comercialización pecuaria, con principal referencia al vacuno.

Sin la cooperación integrada de estos segmentos el programa de control y erradicación tendrá pocas probabilidades de éxito y exigirá mayor tiempo.

1. Factores epidemiológicos

Varios factores determinan el tiempo que un animal individualmente puede ocultar, de manera silenciosa, la infección antes de ser diagnosticada.

La dificultad de poder predecir el período de incubación y de descubrir un animal que está incubando la enfermedad favorece su diseminación en el rodeo y luego exigirá un extenso período de saneamiento.

Ninguna prueba serológica es capaz de detectar el 100% de los animales infectados en una única intervención.

Es por ello necesario repetir sistemáticamente las pruebas de saneamiento aplicando el criterio de tratar el "rodeo o rebaño como una unidad epidemiológica".

1.1 Período de incubación

La incubación es el período que transcurre desde que el animal es expuesto al agente infeccioso hasta la aparición de los signos y manifestaciones clínicas de la enfermedad. En la brucelosis los signos clínicos de la infección/enfermedad se evidencian por aparición de anticuerpos específicos en las pruebas diagnósticas, ocurrencia de aborto, retención de placenta y parto prematuro en la fase avanzada de la gestación. Hay fuerte tendencia a la esterilidad temporal o permanente y la brucela puede invadir y afectar las articulaciones con bursitis y cojera, ocasionalmente, en las vacas infectadas y más frecuentemente en el toro infectado.

Si bien no se puede depender de los signos clínicos, ellos son valiosos para de-

terminar las probabilidades de la presencia de la infección/enfermedad.

En la brucelosis, el período de incubación es muy variable y puede ser tan breve como 10 días y tan largo como 280 días. Con mayor frecuencia se sitúa entre 30-60 días.

1.2 Exposición a la infección y su evolución

Los animales infectados no siempre muestran signos clínicos o ellos se manifiestan en determinadas etapas de sus vidas, como ciertas fases del estado de gestación.

En la brucelosis hay animales que desarrollan infección subclínica.

Durante el período de incubación un animal puede excretar y diseminar las brucelas pero es inseguro hacer el diagnóstico con una única intervención.

Los síntomas clínicos y la presencia de una reacción positiva no siempre se presentan al mismo tiempo.

En una hembra en fase subclínica la aparición de la reacción positiva en la prueba serológica dependerá del período de incubación, dosis infectante, estado inmunitario, madurez sexual, fases de la gestación.

Una hembra infectada puede abortar antes de dar reacción positiva pero con mayor frecuencia la reacción positiva se presenta antes de que aborte.

Una hembra preñada puede ser negativa o de título bajo de anticuerpos en la prueba serológica efectuada dentro de las dos semanas siguientes al aborto (signo obvio para alertar sospecha de brucelosis) o a la parición normal o anormal de un ternero.

Una prueba negativa efectuada dentro de ese período no da garantía que el animal no está infectado.

Se impone una prueba después de las dos semanas del aborto o parición.

1.3 Infección en hembras jóvenes

La mayoría de los animales jóvenes que no han alcanzado la madurez sexual y las hembras jóvenes que no han comenzado a ciclar regularmente son resistentes a la brucelosis.

Sin embargo, una excepción a esta regla son las terneras nacidas de madres infectadas "in útero" por brucelas de las cuales cierto porcentaje (hasta 10%), permanecerá con infección latente e incubarán la infección hasta la madurez sexual y preñez.

Las vaquillonas con infección latente usualmente no reaccionan en las pruebas serológicas ni muestran signos de enfermedad hasta la parición o aborto, fase en la cual diseminarán la infección.

La transmisión congénita de la madre al feto ocurre en una tasa baja difícil de predecir y la infección evoluciona en forma latente hasta la primera gestación de la vaquillona. Las manifestaciones clínicas de la infección pueden ser la excreción de brucelas por las secreciones mamarias pre-parto o por el aborto y la aparición de las reacciones serológicas específicas.

En rodeos infectados las terneras pueden también infectarse tempranamente en forma latente por ingestión de leche de hembras infectadas excretoras de brucelas o por exposición a productos contaminados de la parición de vacas infectadas.

Un ternero/a recién nacido de una hembra infectada puede, ocasionalmente, infectarse congénitamente antes del nacimiento o también, a menudo, en el parto puede estar cubierto con exudado repleto de microorganismos *Brucella* y además, luego de ingerir el calostro contaminado su tracto digestivo contendrá brucelas las cuales serán eliminadas en el meconio y heces fecales al medio externo. Por lo tanto, los recién nacidos de madres infectadas durante su primer mes de vida constituyen un peligro como diseminadores temporales de brucelas si conviven con otros animales susceptibles o son transferidos a rodeos indemnes de infección. Los animales jóvenes que han ingerido calostro de madres infectadas pueden inicialmente ser seropositivos pero luego se convertirán en seronegativos.

Como regla usual el animal joven elimina la infección durante el primer mes de vida siempre que no continúe ingiriendo leche contaminada y se evite su exposición a otros materiales contaminados con

brucelas (fetos abortados, descargas de las hembras infectadas). La mayoría es resistente hasta que alcanza la pubertad aunque puede haber alguna excepción en animales jóvenes severamente expuestos a la reinfección en los cuales las brucelas pueden alojarse temporalmente en ganglios linfáticos.

Las vaquillonas, también, pueden infectarse más tardíamente, luego de 10- 12 semanas de edad al llegar a la madurez sexual.

En el animal joven nacido de madre indemne la resistencia natural cesa después que el animal alcanza la madurez sexual y en la hembra la susceptibilidad aumenta en el estado de preñez.

Alcanzada la madurez sexual no hay edad que limite la infección de un animal susceptible.

1.4 Infección en hembras adultas

La categoría de hembras de cría es la más importante en la transmisión y diseminación de la infección. Una vez infectadas diseminarán una enorme cantidad de brucelas en el periodo de gestación-parición.

Las vacas y vaquillonas preñadas son muy susceptibles pero en un rodeo de cría infectado hay hembras que no se infectan o la infección es transitoria dependiendo de la dosis infecciosa de exposición y del estado inmunitario del animal.

La mayoría de las hembras que se infectan permanecen «reaccionantes» durante varios años o por toda su vida y pueden permanecer excretoras intermitentes de brucelas.

Cuanto más avanzado es el estado de preñez mayor es la susceptibilidad de la hembra a sufrir una infección fulminante de brucelosis y una reducción notable en el periodo de incubación. Los tejidos placentarios y fetales son electivos y predilectos para el desarrollo masivo de la infección por brucelas.

En cambio, la exposición a la infección en una hembra no preñada o recientemente preñada resulta en un período de incubación más largo siendo más difícil identificar rápidamente el animal infectado.

1.5 Vigilancia epidemiológica, intervalo de pruebas de saneamiento

En la presente situación epidemiológica de la brucelosis en el país, con presencia de conglomerados de focos activos de brucelosis en algunos Departamentos (Rocha, San José, Artigas) y dispersión de focos aislados en el territorio nacional se impone intensificar la vigilancia epidemiológica para identificar con la mayor celeridad las haciendas afectadas por la enfermedad y extremar su saneamiento.

La imposibilidad de predecir la duración del periodo de incubación y de la formación de los anticuerpos específicos dificulta conocer con certeza si el animal en venta o recientemente comercializado es libre de infección y cuán largo debe ser el periodo de cuarentena de un animal sospechoso y el período de interdicción de un establecimiento afectado por la brucelosis.

La exigencia de examinar los animales previos a su venta cumple un importante propósito ya que muchos bovinos con brucelosis pueden ser descubiertos en estos muestreos de vigilancia. Así, el rastreo epidemiológico permite identificar el grupo o tropa y el establecimiento de origen del animal problema y a su vez se logra evitar el riesgo que constituye el animal infectado.

Sin embargo, una única prueba o examen negativo no permite saber si el animal está o no incubando la enfermedad.

La única manera de descubrir su condición y tener una mayor seguridad es probando nuevamente el animal luego de 60-120 días después de la compra o ingreso.

Una segunda prueba permitirá detectar un buen número de animales infectados y evitará que su ingreso en el rodeo ocasiona la diseminación silenciosa y perniciosa de la infección.

En un brote de brucelosis, durante el periodo de activa infección se requieren pruebas frecuentes en el rodeo para acelerar la eliminación de "reaccionantes" y de esa manera disminuir en el rodeo la oferta de dosis infecciosas originada por la excreción continua o intermitente de brucelas.

En esta fase los intervalos entre las pruebas del rodeo deben ser más breves, 40-60 días, con faena sanitaria rigurosa de los animales “positivos” en los mataderos autorizados por la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG/MGAP).

Estos intervalos pueden variar de acuerdo a las observaciones epidemiológicas que se presenten en la unidad problema, como aparición de un número mayor de animales infectados, alteraciones en las gestaciones, abortos.

Especial atención debe ponerse en los “rodeos o rebaños problemas” en los cuales la infección persiste a pesar de la rigurosa aplicación de las medidas sanitarias. En estos rodeos, que representan un muy bajo porcentaje de los rodeos infectados, pueden coexistir animales infectados sero-negativos o de título bajo de anticuerpos, difíciles de identificar. Debe investigarse la posible presencia de animales portadores con infección crónica y con bajo tenor de anticuerpos, los cuales permanecen “ocultos” en pruebas de rutina y que será necesario revelar su condición por pruebas complementarias.

1.6 Interdicción/cuarentena

En general el procedimiento de interdicción/cuarentena es más efectivo y de menor duración en las enfermedades agudas con cortos períodos de incubación y en las enfermedades que cursan con signos clínicos manifiestos y observables.

En cambio, es prolongado y de alto costo en las enfermedades que cursan con períodos prolongados de incubación, como es el caso de la brucelosis bovina.

La interdicción/cuarentena es un serio inconveniente para el productor/empresario rural pero es imprescindible desde el punto de vista sanitario.

La interdicción /cuarentena es un estado de aislamiento sanitario forzado del establecimiento afectado por la brucelosis. La cuarentena por brucelosis se aplica por el Servicio Veterinario Nacional para aislar la hacienda con animales infectados de manera que no se disemine la infección/enfermedad a otros rodeos.

La interdicción debe determinar la manera que el productor podrá continuar co-

mercializando sus animales con destino a la faena sanitaria en mataderos/frigoríficos oficialmente aprobados.

La interdicción/cuarentena debería aplicarse por el Servicio Veterinario Oficial en los siguientes casos:

- Cuando se compruebe que la brucelosis está presente en el rodeo de un establecimiento.
- Si la brucelosis es rastreada hasta el establecimiento de origen por medio de animales oriundos comercializados en ferias, “remates por pantalla” o venta partic”.
- Si resultan “positivos” animales faenados en frigoríficos o mataderos y son rastreados hasta el establecimiento de origen.
- Si animales que egresan de un establecimiento se demuestra que son “positivos” previo o al momento de ingreso a otro establecimiento de destino.
- Si los animales “positivos” que ingresan a otro establecimiento de destino entran en contacto directo con animales del rodeo de destino deberá efectuarse también la interdicción del establecimiento que recibe los animales “positivos”.
- Si el rodeo de un establecimiento con brucelosis entra en contacto de riesgo directo con rodeos de establecimientos vecinos deberá también interdictarse el establecimiento vecino.

En la brucelosis bovina se ha demostrado que establecimientos vecinos, y adyacentes - los cuales se separan por un único alambrado- se infectan próximos a un 20% por el contacto con el rodeo infectado.

Los establecimientos vecinos a establecimientos afectados por brucelosis deben aplicar medidas de vigilancia y bioseguridad estricta y mantener separado su rodeo de los contactos de riesgo.

1.7 Cese del período de interdicción

El cese del período de interdicción dependerá de la razón que determinó la medida de cuarentena.

Si la razón fue una sospecha de infección una única prueba negativa del rodeo sospechoso resultará en el cese de la interdicción.

Si el establecimiento fue interdictado por el ingreso de animales sospechosos de padecer infección una prueba negativa después de los 45-60 días liberará los animales.

En el presente se exige un mínimo de 120 días de intervalo entre una prueba de rodeo negativa y la última prueba negativa previo al cese de la interdicción y cuarentena. Un intervalo de 180 días (6 meses) ofrece mayores garantías sanitarias y debería ser aplicado.

En el proceso de saneamiento es imprescindible eliminar los animales clasificados como positivos con destino al sacrificio sanitario previa marcación indeleble. No debe haber ninguna excepción y el movimiento o venta con otro destino es un fraude de muy graves consecuencias.

En una hacienda con brucelosis el período de interdicción/cuarentena se levantará cuando el total del rodeo, después de eliminado el último animal “reaccionante”, haya sido negativo en dos pruebas efectuadas con un intervalo de 180 días.

Estas dos pruebas negativas del rodeo es un compromiso que resulta del conocimiento disponible del período de incubación de la enfermedad (el cual puede exceder los 180 días) que permite detectar casos de brucelosis residual y de un sistema que sea práctico y tolerable para el productor.

La aplicación de esta norma de dos pruebas negativas con intervalo de 180 días debe ser rigurosa y no debería ser abreviada.

Luego de cesar la interdicción, como medida de biocontención final, realizar una prueba adicional de la hacienda a los 180 días posteriores al levantamiento de la interdicción o cuarentena que da una mayor garantía que la brucelosis ha sido eliminada de la hacienda y estará en condiciones de ser “certificada libre” por el servicio veterinario nacional.

A medida que disminuye significativamente el número de rodeos infectados la exposición a la infección es menor. En esta fase, es necesario mantener la interdicción o cuarentena por períodos más largos, de 10 a 12 meses, a fin de detectar la posible presencia de un animal o ani-

males con períodos de incubación extremadamente extensos.

1.8 “Certificación de libre de brucelosis”

1. La certificación inicial de establecimiento libre de brucelosis debería exigir, por lo menos, dos pruebas consecutivas de sangre negativas de todo el rodeo con intervalo de 10 a 14 meses.

El Certificado de establecimiento libre de brucelosis deberá ser válido por el término de 12 meses.

La aplicación de los criterios antes expuestos se reflejará en un más efectivo control de la brucelosis.

2. Despoblación animal del establecimiento problema.

Comprende la eliminación por sacrificio sanitario de todos los animales de especies susceptibles que integran el rodeo infectado. Su destino será un matadero oficialmente autorizado aplicando estrictas medidas higiénicas, sanitarias y de protección del personal.

El establecimiento debe mantenerse desactivado (“vacío sanitario”) por un período razonable, no mínimo de 60 días, para proceder a la higiene, desinfección y eliminación de las fuentes de contaminación ambiental.

Se podría aplicar en rodeos con altas tasas de infección y en “rodeos problemas” con infección crónica de larga duración y difícil saneamiento en la fase final de la erradicación de la brucelosis en una zona, región o país.

Es un procedimiento severo que causa un fuerte impacto económico y social.

Debe indemnizarse al propietario de la hacienda.

En países o zonas libres que sufren la ocurrencia de un brote de infección circunscrito es el procedimiento más conveniente para eliminar la infección de inmediato y evitar su diseminación.

También es un procedimiento aplicable en los últimos focos residuales de una zona o país en la fase de consolidación hacia la erradicación.

3. Reemplazos, ingresos y egresos de animales.

La mejor garantía sería comprar ingresos de establecimientos “certificados libres de brucelosis” pero esta condición es muy limitada en el país y prácticamente imposible de ser utilizada, salvo para casos puntuales.

No adquirir animales procedentes de establecimientos sospechosos o afectados por brucelosis.

Hacer los esfuerzos necesarios para aislar los ingresos de animales de origen sanitario desconocido y efectuar las pruebas de diagnóstico para demostrar que los ingresos de animales a un establecimiento demuestren, preferentemente en los 30 días previos, que las pruebas diagnósticas han sido negativas.

Los ingresos de riesgo (hembras destinadas a la reproducción, hembras preñadas y toros) deben ser aislados en potreros o establos suficientemente separados durante por lo menos 3-4 semanas de cuarentena y ser sometidos a dos pruebas serológicas con resultado negativo antes de ser incorporados al rodeo.

Debe evitarse el contacto físico directo con animales oriundos del establecimiento, así como el uso de bebederos y comederos comunes y evitar el contacto con secreciones y excreciones peligrosas.

Observar diariamente los animales en cuarentena para detectar cualquier alteración o signo clínico en su estado de salud.

Omisiones a estas reglas sanitarias son de rutina en las condiciones de alto dinamismo del mercado, diversos sistemas de comercialización, extraordinario movimiento de semovientes y cambio de propiedad.

Es necesario ejercer una vigilancia activa para evitar estas graves omisiones que favorecen la diseminación de la brucelosis.

4. Ingreso de animales desde fuentes externas.

Origen del foco: Usualmente la brucelosis se transmite de un establecimiento a otro por el ingreso de animales infectados cuyo origen es un rodeo infectado. El descarte de animales infectados comercializados fraudulentamente a precios bajos crea un comercio de reemplazos de alto riesgo.

4.1 Rastrear los animales fuentes de infección que proceden de establecimientos infectados o sospechosos. Estos animales se deben tener como potencialmente expuestos a la infección y deben ser sometidos a pruebas sanguíneas con resultado negativo 10-30 días previos al ingreso a la hacienda de destino y luego en el ingreso al establecimiento de destino, en condiciones de aislamiento en cuarentena, repetir la prueba serológica a los 45-60 días.

4.2 Los animales “reaccionantes” deben ser marcados y enviados a la faena sanitaria. Los animales negativos deben ser sometidos a otra prueba antes de su incorporación al rodeo o ható.

4.3 Las vacas y vaquillonas que ingresan a un establecimiento con destino a la reproducción deben ser examinadas previo a su entore o inseminación y si son negativas se examinarán nuevamente por lo menos 60 días antes de la parición y si son negativas se re-examinarán 30-60 días después de la parición. Esta secuencia de pruebas con resultados “negativos” ofrece garantías que están aptas para incorporar al rodeo del establecimiento.

En el ingreso inter-haciendas es importante tener en consideración que un animal o grupo de animales que durante el período de pruebas consecutivas permanezca con animales infectados o con animales cuya condición sanitaria es desconocida las pruebas negativas no aseguran que el animal se encuentre libre de infección, ya que puede estar en el período de incubación silencioso.

En cambio, si el animal o grupo de animales está separado durante el período de pruebas consecutivas los resultados negativos dan una mayor garantía de su condición de indemne a la infección. Dependiendo de las circunstancias, dos pruebas negativas consecutivas de los ingresos de hembras vacías (vaquillonas o vacas) mantenidas aisladas será suficiente garantía para habilitar el ingreso al rodeo; mientras que si las hembras están preñadas podría ser necesario efectuar mayor número de pruebas consecutivas negativas.

4.4 Los animales procedentes de establecimientos afectados por la brucelosis son de alto riesgo, aún cuando sean negativos, y la mejor medida es no aceptar ingresos de estas haciendas.

5. Establecimientos vecinos.

Los establecimientos vecinos y linderos en contacto directo de riesgo con rodeos infectados deberán ser sometidos a pruebas serológicas para vigilar y comprobar su estado sanitario en relación a la brucelosis.

Vigilar y mantener los alambrados y cercas en buen estado y evitar el intercambio, pasaje y contactos de animales inter-haciendas especialmente con las hembras preñadas y en fase de parición y con los toros.

2. Procedimientos y recomendaciones de manejo sanitario en un establecimiento clasificado como sospechoso o infectado

1. En un rodeo sospechoso o infectado se deben examinar por pruebas serológicas todos los bovinos mayores de 12 meses de edad.

Se exceptúan los novillos y las hembras castradas, categorías que deben mantenerse en potreros separados de las hembras de cría.

En la fase de saneamiento las pruebas de rodeo o rebaño deben repetirse con intervalos de 90-120 días. Pruebas del rodeo a intervalos más breves pueden acelerar la eliminación de animales infectados detectados como "reaccionantes" o "positivos" especialmente en la fase de diseminación activa del brote infeccioso.

2. La repetitividad de las pruebas del rodeo en intervalos cortos incide en el aumento de los costos del plan y debe analizarse las mejores posibles alternativas dentro del plan.

3. En todos los casos en que se compruebe la ocurrencia de abortos deben ser efectuadas pruebas de diagnóstico de brucelosis. En muestras de sangre remitidas a un laboratorio para el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas, por ejemplo, Leptospirosis, Campylobacteriosis, Diarrea Viral Bovina, Neosporo-

sis, Leucosis bovina, Trichomoniasis, etc. deberán, además, ser realizadas las pruebas diagnósticas de brucelosis.

4. Los muestreos estratégicos de vigilancia efectuados para hacer el seguimiento de la prevalencia de otras enfermedades pueden ser también utilizados para reforzar la vigilancia epidemiológica de la brucelosis.

5. En cualquier caso o foco se deberá obtener muestras biológicas para ser remitidas al laboratorio con la finalidad de aislar e identificar el agente infeccioso *Brucella* y, si es posible, su biotipo. Los materiales biológicos de elección para el cultivo y aislamiento de brucelas incluyen muestras de leche de cada cuartito, ganglios, en especial ganglios supramamarios, recolectados en el momento de la faena, feto abortado, cuajo de feto abortado, descargas uterinas y vaginales, placenta y cotiledones, líquido sinovial de bursitis e higromas, exudado supurativo en la región del ligamento supraespinoso ("mal de cruz").

3. Manejo de la hacienda problema

1. Recomendar servicio de entore/inseminación estacional estricto, toda vez que sea posible.

2. Es conveniente llevar a cabo 30 días antes el sangrado y prueba de rosa de Bengala en las hembras seleccionadas para entorar/inseminar y segregar toda hembra que resulte positiva a esta prueba. Esta medida es de gran valor para evitar entorar/inseminar hembras infectadas que serían un peligro en la diseminación de infección en el proceso de gestación-parición.

3. Iniciar el servicio (natural o por inseminación) con las vaquillonas dos semanas antes de las vacas.

4. El servicio estacional estricto es más beneficioso para el saneamiento de la hacienda ya que en la estación de parición los vacunos estarán expuestos por algunas semanas y será posible concentrar las medidas sanitarias del plan y a su vez se obtienen lotes más uniformes de terneros. Las pariciones espaciadas y con "cola" perjudican la eficacia de las medidas sanitarias al prolongar los períodos de exposición masiva a las brucelas excretadas.

5. Hacer diagnóstico estratégico de preñez de preferencia por ecografía o también por tacto, con rigurosa aplicación de las medidas higiénico-sanitarias para evitar la infección del operador.

Debe efectuarse el diagnóstico de preñez y poner especial atención en las hembras con condición sanitaria cuestionable. El diagnóstico por ecografía ofrece mayores garantías y puede hacerse más tempranamente en la fase de gestación.

6. La brucelosis se disemina en la hacienda principalmente durante la estación de parición. Una importante característica de la epidemiología es el derrame de enorme número de brucelas durante las primeras dos a cuatro semanas que siguen al parto o aborto de la hembra infectada con densa contaminación del ambiente externo. En casos de brucelosis activa se ha demostrado que un alto porcentaje de vacas infectadas eliminan las brucelas más de ochenta días después del parto o aborto. Los animales que cohabitan en ese ambiente ingieren enormes cantidades de bacterias al lamer los fetos, placentas, vulva y descargas uterinas y al ingerir alimentos y agua contaminados.

7. Separar por categorías las vacas y vaquillonas preñadas. Hacer una vigilancia cuidadosa de las hembras preñadas desde el 3° o 5° mes hasta el final de la gestación y parición. Separar y escalonar las hembras preñadas tres a cinco semanas antes de la fecha estimada de parición.

Agrupar cada categoría por fechas similares o aproximadas de parición estimada para facilitar su observación y atención.

Intensificar la vigilancia y observación diaria a medida que se aproxima la temporada de partos.

Las hembras con gestación avanzada deben ser observadas diariamente para descubrir cualquier parto o aborto.

8. Con la aplicación de este sistema de manejo se obtienen gradualmente grupos de animales negativos en diferentes períodos, se disminuye su exposición a las brucelas y reduce el número de pruebas.

9. Separar y aislar el grupo de vaquillonas hijas de madres infectadas las cuales deben manejarse con estrictas medidas de bioseguridad y vigilancia permanente. Es aconsejable y prudente no destinar para el servicio esta categoría de hembras de riesgo, ya que pueden padecer infección latente.

Es conveniente destinarlas para engorde, aislarlas en potreros separados y posterior comercialización para la faena.

10. En la brucelosis la mayoría de los abortos ocurre en el tercer trimestre, de 6 a 9 meses de preñez. Sin embargo, pueden presentarse abortos precoces entre 3 a 5 meses de gestación. El aborto y la expulsión prematura del feto es el signo clínico principal y tiene mayor significación cuando ocurre repetidamente o en serie en el mismo rodeo. La ocurrencia de abortos en la primera fase de la gestación es menos probable que sean causados por la infección brucélica.

11. Una hembra puede parir un ternero a término, aparentemente normal, expeler su placenta. No obstante, la madre y el hijo pueden estar infectados con brucelosis. La infección de los terneros es temporal pero excretan brucelas al ambiente y luego la infección se extingue en la mayoría de los animales jóvenes.

12. Hay hembras infectadas que se inmunizan en el curso de la enfermedad y no abortan. Las siguientes pariciones pueden ser normales pero la hembra infectada crónicamente debe ser eliminada.

13. Hembras parturientas dan generalmente una alarma con signos clínicos visibles previos al aborto y al parto con aparición externa de "bolsa placentaria", salida del cordón seguida por descargas vaginales. Es por ello, imprescindible la recorrida diaria del rodeo preñado.

14. En la hembra preñada los sitios de infección masiva de brucelas son el endometrio uterino y la placenta fetal. Generalmente, las zonas inter-cotiledones de la placenta están espesadas y con exudado gelatiniforme amarillento y a veces apariencia de cuero fino. Los cotiledones placentarios pueden presentar necrosis de color amarillo-grisáceo con exudado mucoso oscuro en la superficie.

15. Todas las hembras que muestran signos de aborto deben ser segregadas de inmediato y aisladas en la enfermería o separadas convenientemente del rodeo preñado. El lugar elegido debe ser fácil de limpiar y desinfectar.

16. Las vacas infectadas generalmente abortan una sola vez pero un cierto porcentaje pueden abortar en otra parición y otro porcentaje puede presentar esterilidad e infertilidad. Transcurrido un mes desde el aborto o aparición normal o anormal cesan en eliminar las brucelas de su tracto genital pero cierto porcentaje permanece infectadas y excretoras de brucelas y sus secreciones (leche y calostro) y sus descargas son peligrosas, aún cuando, la excreción de brucelas es intermitente. En cualquiera de los casos es necesario identificarlas de forma indeleble y eliminarlas con destino a la faena sanitaria.

17. Los fetos abortados están inflamados con tinciones sanguinolentas subcutáneas y en las cavidades internas y el cordón umbilical se puede presentar engrosado e inflamado; una lesión interna importante es la neumonía fibrinosa.

18. Los fetos y membranas placentarias deben ser colocados en bolsas de plástico y enterrados profundamente de inmediato y cubiertos de cal viva y tierra, o incinerados, salvo las muestras biológicas que se quieran remitir para análisis de laboratorio. Las descargas de líquidos uterinos y vaginales y placenta de las madres infectadas y sus fetos abortados o el recién nacido contienen "millones" de brucelas y son vehículos de alto peligro en la transmisión de la infección y contaminación del ambiente.

19. Las hembras recién paridas deben separarse hasta que pasen una prueba de brucelosis negativa dos semanas después del parto. No deben efectuarse las pruebas de inmediato al parto pues puede haber una caída temporal de los anticuerpos en el suero sanguíneo.

20. Hembras que han abortado deben permanecer aisladas hasta que se examinen después de dos semanas y si resultan negativas se esperan dos semanas más para ser nuevamente examinadas.

21. Las hembras que retienen la placenta o tienen descargas uterinas o vaginales,

luego del parto deben ser aisladas y manejadas de la misma manera que las hembras que han abortado hasta que su condición sanitaria es determinada.

22. Toros. Proteger el toro, evitando su infección. Mantener los toros en lugar seguro con buenos alambrados o cercas y alejados del ganado de cría y en gestación durante el reposo post-servicio.

Mantener estricta separación de los toros durante la estación de parición que es de alto peligro para la exposición e infección de los reproductores.

El diagnóstico de brucelosis en el toro puede ser incierto ya que un bajo porcentaje de toros infectados no acusa títulos serológicos suficientes para el diagnóstico. Los títulos altos son significativos y de fácil interpretación pero hay reproductores infectados que dan títulos bajos y hay que recurrir a pruebas confirmatorias y hacer también en estos reproductores sospechosos pruebas con el plasma seminal.

En los toros los títulos bajos pueden ser de valor indicativo de infección.

El toro infectado, especialmente en la fase aguda, y con lesiones en el aparato reproductor excreta por largo tiempo un gran número de brucelas en su semen de forma intermitente. Las lesiones predominan en el tracto genital y sus ganglios, con orquitis e inflamación de los testículos y focos necróticos de proporción variable. En la fase avanzada de la infección se presenta cojera debido a la bursitis e higromas (crónico).

Muchos toros se infectan pero en la monta natural solamente un bajo porcentaje son diseminadores de la infección. Cuando la infección se localiza en el testículo y epidídimo y órganos adyacentes del tracto genital las brucelas son excretadas en el líquido seminal y el toro se convierte en un peligroso diseminador, especialmente en la inseminación artificial.

Es necesario sangrar todos los toros del establecimiento o cabaña y hacer las pruebas serológicas del grupo de toros y si todos son negativos es aconsejable repetir las pruebas a los 90 días para tener mayor seguridad de su condición sanitaria.

Si resultan uno o más toros positivos se deberán marcar de forma indeleble y remitir a la faena sanitaria. En este caso, el grupo de toros se clasifica como sospechoso y debe someterse a pruebas con mayor frecuencia, a intervalos de 90 días, hasta que todo el grupo resulte negativo. Luego, confirmar la condición de negatividad del grupo con otra prueba efectuada a los 180 días.

El uso "inadvertido" de semen de toro infectado en la inseminación artificial constituye un riesgo especialmente importante ya que puede diseminar la infección en muchos rodeos. El criterio diagnóstico que se aplica a los toros cuyo semen se destinará a la inseminación artificial debe ser estricto.

En un toro negativo perteneciente a un rodeo o cabaña clasificada como infectada con brucelosis la certeza absoluta de la infección solamente se puede establecer por el cultivo y aislamiento de *Brucella* en materiales biológicos de lesiones de órganos, ganglios, líquidos de lesiones sinoviales o semen de un animal vivo o en el examen post-mortem de un cadáver o una carcasa y sus ganglios linfáticos y órganos, en especial de la reproducción.

23. Infección de otras especies animales susceptibles. En casos de excepción puede ocurrir la migración de *Brucella abortus* e infectar otras especies animales que poseen una pronunciada resistencia natural, pero si conviven en ambientes densamente contaminados podrían actuar como reservorios de brucelas. Por ejemplo, en los caninos con localización en los ganglios de la cabeza, amígdalas y región faríngea, en los equinos con localización en el ligamento supraespinoso, bursitis y lesiones oculares, en los porcinos que poseen considerable resistencia a la infección pero hembras preñadas podrían infectarse y abortar si se alimentan con desechos contaminados. En casos de "rodeos problemas" debe indagarse sobre estos casos que se presentan con muy poca frecuencia.

4. Medidas higiénico-sanitarias ambientales

Brucella abortus es un agente infeccioso obligatorio y en el medio externo puede permanecer viable por tiempo variable

(horas, días, semanas, meses) dependiendo de las condiciones climáticas y materias contaminadas.

En condiciones de bajas temperaturas, humedad y no exposición a rayos solares directos y protección por materias orgánicas como placenta, feto, leche y en el estiércol líquido puede permanecer viable por 6 a 8 meses. Expuesta a la luz solar directa solamente sobrevive hasta 4 horas; mientras que en el estiércol líquido almacenado en tanques a baja temperatura se ha demostrado un período de sobrevivencia de por lo menos ocho meses. (Anexo 2 "Viabilidad de *Brucella* en condiciones ambientales diversas"

1. Deben designarse operadores de campo adecuadamente adiestrados, confiables y responsables para manejar las pariciones y abortos. Deben usar botas y guantes de goma, overoles y delantales impermeables. En establos y lugares cerrados de establecimientos con brucelosis con alta densidad animal usar protectores oculares, nasales y bucales ya que es posible la transmisión por aerosoles.

2. Las vestimentas deben ser lavadas y desinfectadas.

3. Debe disponerse de suficiente reserva de desinfectantes, los cuales deben almacenarse en lugares cercanos a los potreros o establos de cuarentena. Preparar soluciones frescas y seguir las instrucciones indicadas por los fabricantes.

4. Limpiar los lugares contaminados y tratar con desinfectantes. Los corrales y establos deben ser tratados con desinfectantes en aerosol.

5. Potreros donde hayan ocurrido varios abortos es conveniente dejarlos libres de animales durante dos a tres meses.

6. El estiércol de animales infectados debe ser almacenado durante varios meses para permitir su fermentación y autoesterilización.

Puede usarse en la agricultura luego de 6 meses y debe prohibirse su uso en los lugares donde pastorean animales.

7. Vehículos de transporte y maquinaria deben ser cuidadosamente lavados y desinfectados.

8. El sacrificio sanitario de animales "reaccionantes" identificados y marcados de forma indeleble, debe ser llevado a cabo

en los mataderos habilitados por la DGSG/MGAP y de acuerdo a las normas higiénico-sanitarias vigentes.

9. Para proteger a los operarios, en la faena durante la extracción del cuero y abertura de la carcasa de los animales "reaccionantes" no debe incidirse la ubre y órganos uro-genitales los cuales se deben colocar "in toto" en recipientes a prueba de pérdidas de líquidos y luego se esterilizan en digestor de decomisos.

10. Especiales medidas deben adoptarse y cumplirse para proteger el personal que trabaja en el establecimiento afectado por la brucelosis, transporta animales clasificados como "brucelosos" y el personal de la industria que procesa la faena de sacrificio sanitario y que opera en usinas de productos lácteos de riesgo.

5. La brucelosis bovina es una zoonosis

La brucelosis en el humano esta vinculada a la infección en los reservorios animales.

Los programas de control de la brucelosis del bovino reducen la incidencia de los casos de infección humana por *Brucella abortus*.

En los humanos hay una tendencia a la resistencia natural la cual es mayor hasta la edad de la pubertad. La exposición severa a las brucelas y la variación de la susceptibilidad individual puede producir el quiebre de la resistencia natural.

Los hombres son más frecuentemente infectados que las mujeres debido a sus ocupaciones de mayor exposición a la infección; pero esta tendencia puede cambiar debido al ingreso de las mujeres en tareas similares de riesgo.

La brucelosis bovina constituye una importante fuente de infección para los humanos, especialmente para aquellos grupos de personas que, por razones de su ocupación, están más expuestos al contacto con animales infectados, sus excreciones y despojos.

La fuente más común de infección de los humanos es el contacto directo o indirecto con animales infectados y sus excreciones que contienen enorme número de brucelas; el contacto con fetos abortados, placenta y descargauterinas de hembras infectadas durante el parto y

posparto y el aborto; la ingestión de leche cruda y quesos contaminados; la manipulación durante el proceso de faena en frigoríficos y mataderos de órganos (órganos genitales, principalmente útero, y la ubre) y carcasas de animales infectados.

La bacteria penetra principalmente a través de las mucosas del trato alimentar, por vía conjuntiva, por la piel con lesiones (abrasiones o heridas) y por inhalación de aerosoles contaminados en lugares cerrados con concentración de animales infectados.

En general, el período de incubación dura de una a tres semanas pero puede prolongarse por varios meses. El curso agudo inicial presenta signos clínicos con fiebre continua o intermitente, escalofríos, sudores profusos, cefalalgia, dolores articulares y musculares, astenia y fatiga.

La brucelosis en el humano sin tratamiento médico puede evolucionar a un estado crónico de larga duración y de diagnóstico complicado.

REFLEXIONES FINALES

Un programa de control / erradicación se basa en un efectivo y continuo sistema de vigilancia epidemiológica, información y comunicación; en el rastreo y examen sistemático y riguroso del rodeo del es como sospechoso o afectado por la brucelosis.

El saneamiento continuará hasta lograr el cese del endemismo y la eliminación total de la infección-enfermedad.

Las pruebas serológicas individuales no reflejan el estado del rodeo o rebaño sino que expresan la respuesta individual de un animal en un momento dado de su vida.

En un plan- programa de control/erradicación se aplica el criterio de diagnóstico de rodeo (rebaño) y el análisis epidemiológico integral con el seguimiento serológico periódico del rodeo animal caracterizado como una unidad.

El plan sanitario y su manejo es laborioso, exige dedicación y tiempo para instrumentarlo pero resulta en una gran re-

compensa al hacer factible la eliminación más eficaz y rápida de esta zoonosis que incide en la cría y procreo de manera importante en las haciendas afectadas, causa grandes pérdidas económicas, representa un factor de alto riesgo para las haciendas indemnes que predominan en el país e interfiere negativamente en el comercio internacional de animales y productos pecuarios.

El apoyo de los productores y empresarios rurales y sus gremiales es imprescindible y ningún plan sanitario tendrá éxito sin la activa participación y aceptación del sector ganadero. Es fortalecido cuando están plenamente informados, alertados y con conciencia de sus responsabilidades y de las enormes pérdidas económicas y de productividad del rodeo de cría, "cerno" de la producción vacuna; de los beneficios que resultan del control y obtención de rodeos libres de brucelosis y de la eliminación del grave riesgo recóndito y permanente que constituye la brucelosis para las haciendas indemnes y libres.

Resumen sobre viabilidad de *Brucella* en condiciones ambientales diversas

Raúl Casas Olascoaga

Montevideo, Septiembre de 2007.

Brucella

1. Exigencias para su crecimiento

Para el crecimiento necesita tiamina, niacina, cistina, histidina, tirosina, fenilalanina, triptofano y sales de magnesio (McCullough *et al.*, 1947).

Para un crecimiento máximo es esencial tener otros nutrientes como fuentes de asparagina, ácido glutámico o histidina (Gerhardt, 1958).

Los medios de cultivo contemporáneos contemplan esas necesidades.

Brucellae tiene una tasa relativamente lenta de multiplicación.

La tasa inicial de multiplicación puede ser muy lenta especialmente cuando en el inóculo hay escaso número de brucelas. Las placas de cultivo deben mantenerse por lo menos durante 10 días antes de proceder al descarte del intento inicial de aislamiento.

2. Viabilidad de *Brucellae* en el ambiente

La sobrevivencia de las brucelas en el ambiente externo en diferentes condiciones ha sido investigada por varios investigadores.*

Estos ensayos fueron efectuados para determinar si las brucelas podrían ser recuperadas en condiciones ambientales controladas y en intervalos variables.

En la mayoría de los ensayos se utilizó un inóculo muy grande y sin determinar el porcentaje del número de células bacterianas que permanecieron viables.

Morales Otero (1948) expuso suspensiones de *B. abortus* en tubos de cuarzo a la luz solar, observando inactivación rápida de las bacteria a los 30 minutos hasta completa esterilización en el término de 3-6 horas según la intensidad de la luz solar. El efecto de la luz ultravioleta

proveniente de una lámpara colocada a un pie de distancia de los tubos conteniendo la suspensión de brucelas causó la esterilización completa en 30 minutos.

Kuzdas & Morse** (1954) llevaron a cabo una investigación en la cual realizaron la titulación de los microorganismos viables a intervalos específicos. Estos resultados demostraron de forma obvia que si bien las brucelas cultivadas sobrevivían, ocurría una reducción constante de células viables en las condiciones del estudio, salvo la excepción de varios materiales mantenidos en congelación en los cuales se demostró una larga viabilidad de las brucelas.

Las carcasas de animales infectados han sido examinadas para verificar la sobrevivencia del agente infeccioso en el bazo. Las carcasas fueron depositadas en el suelo y también fueron enterradas. En el estudio fueron comparados los resultados en las estaciones de verano e invierno. *Brucella* sobrevivió por 44 días en las carcasas colocadas sobre el suelo en los meses de invierno comparado con 29 días cuando la carcasa fue enterrada en el verano.

En la carcasa infectada de cobayo colocada en el suelo en el verano la brucela sobrevivió un día.

King (1957), demostró que en el estiércol líquido almacenado en tanques la *Brucella* sobrevivió no más de 4 horas, con una temperatura que alcanzó a 66° C en el invierno y 78° C en el verano cuando el estiércol en el tanque tenía un nivel de un cuarto del total.

La viabilidad de las brucelas en las descargas excretadas al ambiente externo depende de muchos factores. En condiciones apropiadas el microorganismo es capaz de sobrevivir por largos períodos en el ambiente.

No se multiplica pero puede persistir viable. En cambio, la combinación de factores desfavorables determina una sobrevivencia limitada fuera del hospedero. Por otra parte, comparada con otros microorganismos saprofiticos, la *Brucella* no es un buen competidor por los nutrientes disponibles y es fácilmente sobrepasada por el crecimiento de otros contaminantes aún en condiciones óptimas de nutrientes.

En tejidos frescos de animales o cadáveres la enorme densidad y concentración de las brucelas favorece su aislamiento y diagnóstico.

Brucella es muy susceptible a la luz solar, al calor y a la desecación, condiciones que conducen a la rápida pérdida de la viabilidad y destrucción de la bacteria.

Boak y Carpenter demostraron que son suficientes 20 minutos a 60° C para inactivar la *Brucella*, siendo, en su experimento, *B. suis* la más resistente.

Con un tiempo de 10 minutos de exposición a 60° C las tres especies clásicas se mantuvieron viables. También, comprobaron que a 63° C durante 10 minutos y a 70° C en segundos ocurría la inactivación.

Brucella es muy susceptible a la pasteurización estándar de la leche; es rápidamente muerta en el proceso de pasteurización a 63° C durante 15 minutos o a 72° C durante 15 segundos.

La bacteria es relativamente susceptible a los desinfectantes comunes y es inactivada en condiciones de acidez a pH <5.5.

Puede persistir muy bien en condiciones de congelamiento o condiciones de frío intenso o en lugares fríos protegidos de la luz solar directa.

En condiciones favorables las brucelas pueden persistir viables en materiales

* Cameron, Hugo Stuart. 1932. The viability of *Brucella abortus* Cornell Vet., 22:212-224.

** Kuzdas, C. D., and Morse, E.V. 1954. The survival of *Brucella abortus*, USDA strain 2308, under controlled conditions in nature. Cornell Vet. 44:216-228.

orgánicos especialmente en fetos abortados, placenta, estiércol húmedo o líquido y leche, hasta por seis meses u ocho meses.

En tiempo de bajas temperaturas la brucela puede mantenerse viable en los fetos abortados hasta 75 días y hasta 37 días en suelos desecados lentamente y 120 días en materias fecales desecadas lentamente en lugares oscuros.

Las brucelas sobreviven solamente un corto período en los pastos y potreros a

menos que se encuentren protegidas en estiércol húmedo o materias orgánicas que las protegen de la acción solar y se mantenga adecuada humedad para que su viabilidad pueda persistir temporalmente.

La posible viabilidad de la brucela en el ambiente externo ha sido demostrada en condiciones favorables y apropiadas; pero los estudios realizados y las observaciones de campo en los programas de control no han demostrado que la bruce-

la persista en concentraciones significativas como para crear un riesgo de reinfección de los animales susceptibles reintroducidos en los establecimientos que han sido adecuadamente saneados y sometidos a cuarentena. El reconocimiento de condiciones tales como impropio tratamiento de los fetos y otras descargas orgánicas densamente contaminadas es un factor que debe ser corregido para evitar la posible persistencia de peligros en el ambiente externo.

VIABILIDAD DE LA BRUCELLA EN CONDICIONES DIVERSAS

(Períodos máximos comprobados experimentalmente por varios investigadores).

Luz solar directa	37° C	4 ½ horas
Orina de bovino	4 días	
Orina de bovino	37° C pH 8.5	12 horas
Orina de bovino	8° C pH 8.5	6 días
Estiércol	no tratado y a -3° C	121 días
Estiércol	no tratado y a 37° C	0 día
Estiércol	no tratada y a 25° C	29 días
Estiércol	no tratado y a 8° C	385 días
Estiércol	no tratado y a -40° C	670 días
Estiércol	esterilizado y a 37° C	188 días
Estiércol	verano (Rusia)	1 día
Estiércol líquido	verano (Rusia)	108 días
Estiércol líquido	invierno (Rusia)	174 días
Estiércol	invierno (Rusia)	53 días
Feto abortado (invierno)		75 días
Suelo (tierra) seco en habitación		<4 días
Suelo (tierra) secado lentamente		37 días
Suelo (tierra) húmedo en sótano frío		66 días
Estopa (arpillera) en lugar frío		30 días
Estopa en habitación a temperatura ambiente		5 días
Adobe y tierra congelada		29 días
Congelamiento en laboratorio		824 días
Agua	a 25° C	10 días
Agua estéril a temperatura ambiente		67 días
Agua corriente	a -4° C	114 días
Leche cruda	a 37° C	1 día
Leche cruda	a 25° C	1 día
Leche cruda	a 8° C	2 días
Leche	a 10° C	10 días
Leche cruda	a -40° C	800 días
Helado de crema	a 0° C	30 días
Manteca	a 8° C	142 días
Manteca con crema cruda		120 días
Queso Emmenthal		100 días
Queso Gruyere		100 días
Queso Tylsit		50 días
Queso Munster		20 días
Queso Camembert		18 días
Queso Roquefort		60 días

Brucelosis bovina (Anexo 1)

ANÁLISIS DE RIESGO Y PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL (Modelo simplificado)

1. Análisis de riesgo

Pérdidas por interdicción y cuarentena.
Pérdidas de producción lechera.
Pérdidas de producción de carne.
Interferencia en el ciclo anual de reproducción-cría.
Disminución de procreo (abortos, pérdida de recién nacidos, terneros débiles, esterilidad, infertilidad, prolongación de periodo de transición-anestro).
Pérdidas por descarte de hembras de reproducción-cría y gastos de reposición.
Pérdidas genéticas por descarte de reproductores machos y hembras.
Gastos de reposición de reproductores y vientres de valor genético.
Costos de saneamiento.
Interferencia en el manejo del establecimiento.
Manejo complicado del rodeo infectado.
Interferencia y riesgo en el comercio de animales y productos de origen animal.
Interferencia en el movimiento de animales.
Riesgo para los establecimientos indemes y libres.
Riesgo para los establecimientos linderos.
Aumento de gastos de vigilancia sanitaria.
Desprestigio del productor.
Desprestigio del servicio veterinario nacional y privado.
Incidencia en el estatus sanitario del país.
Riesgo de zoonosis: posible ocurrencia de casos de brucelosis humana de evolución aguda y crónica en los segmentos involucrados desde el establecimiento rural al proceso de transporte, faena en mataderos y frigoríficos y en usinas de productos lácteos.

2. Puntos críticos de control

Identificación individual del ganado para el seguimiento, rastreabilidad/ trazabilidad individual y grupal.
Tratar el rodeo como unidad epidemiológica integral.
Detección de positivos en las pruebas presuntivas de PAL y PMV (en predios rurales, ferias, remates por pantalla, venta particular, frigoríficos y mataderos) con rastreo epidemiológico al establecimiento problema.
Ingresos de animales sin pruebas diagnósticas.
Prueba y cuarentena de ingresos.
Pruebas positivas en ingreso de animales.
Pruebas positivas de brucelosis en el rodeo.
Recolección y remisión de muestras biológicas para análisis de laboratorio.
Pruebas sistemáticas para el saneamiento de la hacienda.
Cronograma de intervalos ente sangrado y pruebas de saneamiento.
Control sanitario de los toros.
Usar en la inseminación semen comprobado libre de patógenos.
Programar servicio estacional de monta natural/inseminación.
Pruebas serológicas en hembras de cría previas al inicio del período de servicio natural y/o inseminación.
Seguimiento de fase de gestación de vaquillonas y vacas.
Segregación de la reproducción de hembras jóvenes hijas de madres infectadas.
Vigilancia de hembras gestadas y durante partos (ocurrencia de abortos y partos prematuros, terneros débiles, muerte de terneros en los primeros 7 días de vida)
Medidas sanitarias ante ocurrencia de abortos seriados.
Eliminación y enterramiento de fetos y otros materiales contaminados peligrosos.

Separación, segregación (refugio), marcación indeleble y eliminación de animales sospechosos y positivos.

Sacrificio sanitario de animales positivos en mataderos autorizados oficialmente.

Vigilancia de ocurrencia de casos humanos en el establecimiento rural, personal de transporte, frigoríficos y mataderos, usinas de producción de lácteos.

Tratamiento del estiércol.

Medidas de higiene y desinfección.

Limpieza y desinfección de lugares contaminados como sala de ordeño, establos, maquinaria, pasajes de animales infectados, lugares donde han ocurrido abortos y pariciones de animales infectados,

3. Límite

Saneamiento sistemático y continuo hasta lograr cero caso de brucelosis en el ingreso de animales y cero caso de brucelosis en el rodeo del establecimiento.

Cese de interdicción.

Pruebas de confirmación de libre de brucelosis.

Obtención del certificado oficial de libre de brucelosis.

4. Monitoreo

Manejo sanitario racional del establecimiento.

Organización y planificación continuas.
Medidas de bioseguridad continuas para prevenir el ingreso de la brucelosis.

Prueba inicial en el rodeo y cuarentena y prueba de ingresos.

Medidas de biocontención para el saneamiento intra- rodeo.

Control sanitario estricto de los toros.

Semen controlado y libre de agentes patógenos.

Selección de hembras aptas para la reproducción y cría.

Programa de educación y entrenamiento continuos del personal

5. Medidas correctivas

Evaluación y revisión periódica del plan de acción.

Biocontención y saneamiento sistemático con pruebas periódicas hasta la eliminación de la infección/enfermedad.

Medidas higiénicas de limpieza y desinfección.

Sacrificio sanitario de los animales "reaccionantes".

Eliminación y enterramiento de fetos abortados, de terneros prematuros muertos, etc.

Decomiso de calostro y leche de hembras infectadas.

Prohibir el uso de leche y calostro contaminados en la alimentación animal y humana.

6. Registros

Identificación individual de los animales del rodeo.

Identificación indeleble (letra B) de animales infectados (positivos).

Llevar registros y documentación del plan de saneamiento y sus resultados.

7. Verificación

Administración competente, participativa y efectiva.

Pruebas anuales de saneamiento por sangrado de las categorías de riesgo.

Revisión del plan de saneamiento y sus resultados.

Selección de personal con vocación e interés en el cumplimiento del plan de saneamiento.

Educación y entrenamiento continuo del personal.

VACUNACIÓN CON CEPA 19 DE TERNERAS A DIFERENTES EDADES

Dosis completa de vacuna con 40 a 60 mil millones viables de *Brucella abortus cepa 19*.

Permanencia de reacciones de aglutinación.

Edad terneras vacunadas (meses)	Porcentaje de reacciones después de la vacunación
4 a 6	100% Negativas a los 6 meses
6 a 8	95% Negativas a los 12 a 24 meses
9 a 12	80% Negativas a los 12 meses 20% Positivas 5% Positivas a los 24 meses
12 a 16	80% Positivas a los 12 meses 50% Positivas a los 24 meses 20% Positivas a los 36 meses

Informe sobre vacunas y vacunación contra brucelosis bovina

Raúl Casas Olascoaga

Miembro Titular de la Academia Nacional de Veterinaria

Montevideo, 6 de Agosto de 2003.

Vacuna cepa RB51

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a información personal recibida del Dr. Steve Olsen el objetivo inicial de la investigación para la búsqueda de una nueva vacuna contra la brucelosis para reemplazar la vacuna Cepa 19, fue eliminar el problema causado por la retención de títulos serológicos generados por la vacunación de terneras con la cepa 19. En EE.UU la edad de vacunación de terneras con cepa 19 es de 4-12 meses. El proyecto de investigación no fue diseñado para comparar la vacunación de terneras con cepa 19 y cepa RB51. Sin embargo, la cepa 19 fue usada en el inicio del proyecto como control positivo. Se obtuvieron datos limitados para ambas vacunas (n=29 y 20 animales vacunados respectivamente para cepa RB51 y Cepa 19) los cuales sugieren aproximadamente 8% menor infección en los vacunados con Cepa 19 y 3% menor tasa de abortos que con la cepa RB51. Debido al número reducido de animales utilizados en este estudio existen dudas de que la diferencia de animales que abortaron sea significativa mientras que para la tasa de infección la diferencia es significativa. El criterio de infección en el examen bacteriológico fue estricto ya que el aislamiento de una sola colonia de la cepa virulenta de desafío en el momento de la necropsia (en el momento del parto o el aborto) determinó la clasificación del animal como infectado. Es necesario destacar que en el estudio pareado, en el grupo de la RB51, con la excepción de 1 aborto la recuperación del número de bacterias de la cepa virulenta de desafío fue extremadamente bajo, predominantemente de los ganglios linfáticos que drenan el ojo. La cepa virulenta de desafío fue la cepa *Brucella abortus* 2308, administrada conjuntamente a la dosis de 1×10^7 UFC (unidades de bacte-

rias formadoras de colonias) entre 170 y 180 días de gestación, aproximadamente 12 semanas previas a la parición.

El beneficio verdadero de la RB51 es la capacidad de permitir identificar serológicamente los animales infectados aún cuando ellos hayan sido vacunados con la cepa RB51. Sin embargo, es necesario informar que animales vacunados con la RB51 pueden sero-convertirse cuando son expuestos a las cepas virulentas de campo de *Brucella abortus*; mientras que la incidencia de los abortos será muy baja.

La vacuna *B. abortus* Cepa 19 confiere protección completa contra la infección en 65-75% de los animales vacunados y en el 25-35% restante una protección relativa. En un porcentaje superior al 95% la vacunación evita el aborto en hembras que se han infectado. El aborto constituye un alto peligro para la propagación de la infección en el rodeo afectado y en los rodeos de establecimientos vecinos, cuando no hay un aislamiento correcto entre los rodeos colindantes o hay intercambio de animales.

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.

La Cepa 19 posee cierta patogenicidad para los humanos y debe usarse con precaución para evitar la infección del operador. También han ocurrido infecciones

accidentales con la cepa RB51 pero no hay conocimiento de signos adversos causados por la infección. La patogenicidad de la cepa RB51 para los humanos esta aún pendiente de determinación.

Ambas vacunas deben ser administradas bajo la responsabilidad de un veterinario.

La ventaja de la RB51 comparada con la cepa 19 es que no induce la formación de anticuerpos los cuales son detectados por las pruebas estándar de diagnóstico de brucelosis. Por lo tanto, los animales infectados pueden ser más fácilmente identificados.

La vacuna RB51 ha sido aprobada recientemente como vacuna oficial para el bovino por el Animal and Plant Health Inspection Services/ Departamento de Agricultura de Estados Unidos (APHIS/USDA).

COMPARACIÓN DE DOSIS DE APLICACIÓN DE LAS VACUNAS

En el cuadro 1 se aprecia la comparación de las dosis de vacuna de Cepa RB51 y Cepa 19.

En EE.UU. a partir de 1980, se ha usado las dosis reducidas de Cepa 19 las cuales figuran en el cuadro que precede. La dosis tradicional de Cepa 19 era muy alta: 50-60 mil millones de bacterias viables en el momento de la aprobación de la serie de vacuna y 25 mil millones hasta la fecha de expiración de la vacuna. A fin de disminuir las reacciones serológicas residuales causadas por esta alta concentración de células viables contenidas en la dosis de vacuna, luego de estudios experimentales en bovinos, se determinó el uso de la dosis reducida. La vacunación de las terneras con dosis reducida se estableció en 4-12 meses de edad siendo la dosis óptima de 5 mil millones de bacterias viables administrada subcutáneamente y la edad óptima de vacunación 5 meses.

Cuadro 1.

	Bovinos jóvenes (dosis bacterias viables) Vía subcutánea	Bovinos adultos (dosis bacterias viables) Vía subcutánea
Vacuna Cepa RB51	1-3.4 x 10 ¹⁰	1-3.4 x 10 ⁹
Vacuna Cepa 19 (dosis reducida usada desde 1980)	3-10 x 10 ⁹	3-10 x 10 ⁸

En las hembras adultas la dosis reducida óptima es de 500 millones de bacterias viables por vía subcutánea.

En Uruguay, la vacuna Cepa 19 se usó únicamente a la dosis alta tradicional para la vacunación de terneras (3-8 meses de edad), desde 1964 hasta la suspensión de la vacunación a fines de 1996. La cepa 19 a dosis alta inducía inmunidad durante la vida útil de la hembra, ya que las terneras vacunadas mantenían la resistencia a la infección frente a cepas virulentas de *Brucella abortus* por siete años y probablemente por un tiempo mayor. Por lo tanto, no era necesaria la revacunación, lo cual reducía significativamente el costo de la vacunación en la vida del animal. La dosis alta induce una mayor protección pero la formación y persistencia de anticuerpos residuales se prolonga mayor tiempo cuando se vacunan animales mayores de 8 meses de edad.

En terneras de 3-8 meses de edad vacunadas con dosis alta de Cepa 19, el 90% se convierte en sero-negativas 9 meses después de la vacunación. En terneras vacunadas con Cepa 19 a edades superiores a 9 meses de edad los títulos serológicos de anticuerpos persisten por mayor tiempo. En Uruguay el uso de la dosis alta y el no cumplimiento estricto de la edad de vacunación provocó un aumento y mayor persistencia de anticuerpos residuales en las poblaciones de terneras vacunadas por encima de los 8 meses de edad.

Los datos sobre la persistencia de la inmunidad conferida por la vacunación con RB51, durante la vida útil en hembras bovinas vacunadas desde terneras, son aún limitados y deberán ser complementados mediante investigaciones experimentales futuras e informaciones de su uso en campo.

En EE.UU. se ha sustituido gradualmente la vacuna Cepa 19 por la Vacuna RB51 que actualmente es la vacuna oficial.

VACUNACIÓN DE ANIMALES ADULTOS

La vacunación del rodeo de hembras adultas (vaquillonas y vacas) se puede aplicar selectivamente para la prevención y control de la brucelosis bovina.

La vacunación de hembras adultas en establecimientos infectados o en establecimientos sometidos a alto riesgo de infección debe combinarse con pruebas serológicas previas a la vacunación para la identificación y eliminación por sacrificio de los animales infectados. Las hembras no reaccionantes en las pruebas serológicas estándar corrientes serán vacunadas con vacuna RB51. Durante el acto de la vacunación las hembras adultas deben ser identificadas en forma permanente ya sea por tatuaje o por la aplicación de caravanas.

En cada establecimiento infectado debe aplicarse un Plan de Saneamiento preparado y ejecutado según lo establecido en el Artículo 16° por el Poder Ejecutivo en el Decreto del 22 de enero de 1998 sobre Programa de Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis en todo el territorio nacional. La vacunación debe ser autorizada por la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG /MGAP).

Un inconveniente importante de la vacunación de hembras adultas es el estado de preñez.

La vacunación de hembras en estado avanzado de preñez podría causar aborto. A medida que avanza el período de gestación la administración de vacuna ofrece mayores peligros de causar abortos. Por lo tanto, es aconsejable vacunar

las hembras serológicamente negativas antes del servicio. Cuando el plan de control de la brucelosis en el establecimiento lo establezca, los animales preñados se vacunarán preferentemente en el inicio de la gestación, en el cual el peligro de aborto es muy bajo.

En rodeos con infección activa y creciente la vacunación de hembras preñadas puede ser conveniente y oportuna para disminuir y/o evitar la serie de abortos que suele causar la brucelosis.

La vacunación del rodeo de hembras adultas induce protección inmediata contra la brucelosis ya que los animales obtienen inmunidad 3-4 semanas después de la vacunación, lo cual acelera el proceso de control de la enfermedad.

En los establecimientos infectados, la vacunación de adultos disminuirá la diseminación de la infección dentro del rodeo a medida que los animales reaccionantes infectados se eliminen con destino al sacrificio en matadero/frigorífico habilitado oficialmente por los servicios veterinarios de DGSG/MGAP. Los animales confirmados como reaccionantes deben ser marcados a fuego con la letra B (brucelosis). El procedimiento de pruebas serológicas en serie permite la remoción de los animales infectados del rodeo y la vacunación ofrece protección a los animales libres de infección.

Otra ventaja importante de la vacunación de adultos es el beneficio derivado de la protección contra el aborto en muy alto porcentaje de las hembras preñadas. Esta protección contra el aborto ofrece tres ventajas importantes: un mayor procreo de terneros, una menor aparición de animales infectados y una importante disminución de las fuentes de infección por *Brucella abortus* virulenta. El resultado será que progresivamente habrá menor número de animales reaccionantes removidos con destino al sacrificio sanitario.

En establecimientos de alto riesgo de infección – libres de infección pero con alta probabilidad de ser expuestos a la brucelosis- la vacunación puede prevenir la introducción de la infección en el rodeo.

INFORME TÉCNICO DE VACUNACIÓN DE VACUNOS CON CEPA *Brucella abortus* RB51

Comité técnico para la evaluación
de la vacuna
Unidad Enfermedades Zoonóticas

USDA/ARS/NADC
2300 Dayton Rd., PO Box 70
Ames, IA 50010
Revisión de 16 de agosto de 2000

Comité de Investigación del ARS

Steven C. Olsen (Presidente, medicina/
inmunología)
Norman F. Cheville (patología)
Betsy Briker (biología molecular)
Allen E. Jensen (bacteriología)
Mitchell Palmer (patología)
Mark Stevens (inmunología)

Asesores Técnicos de Transferencia

Gerhart Schurig, Virginia P.I.
Fred Enright, Louisiana State University
Mike Gilsdorf, APHIS Cattle Disease
Phillip O'Berry, ARS Liaison

Versión en español

Raúl Casas Olascoaga, Academia Nacional de Veterinaria, Uruguay

ÍNDICE

Características de la RB51
Cepa RB51 en Vacunos
Eficacia de la Vacunación
Pruebas de campo en vacunos
La cepa RB51 en el búfalo americano y alce
Infección humana
Comercialización
Referencias

INFORME TÉCNICO SOBRE VACUNACIÓN DE VACUNOS CON *Brucella abortus* CEPA RB51

CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA RB51

Derivación

Brucella abortus cepa RB51 es una mutante rugosa de la cepa virulenta de *Brucella abortus* 2308 en cuya superficie bacteriana falta la cadena O de polisacáridos (residuos de perosamina). La cepa RB51 fue derivada naturalmente por pasajes en serie en medio que contenía rifampicina y por selección de colonias que poseían morfología rugosa.¹

El Dr. Schurig del Virginia Polytechnic Institute, quien desarrolló la cepa RB51, suministró en 1990 un cultivo de la cepa RB51 al National Animal Disease Center para su estudio ulterior. Este cultivo fue transferido una vez y el nuevo cultivo fue designado como Semilla Maestra (Master Seed) RB51/ARS-1. A partir de esta cepa maestra, se produjeron varios pasajes para ser usados en el estudio con bovinos.

Caracterización

El carácter rugoso de cepa RB51 se basa en la morfología, tinción con cristal violeta, aglutinación espontánea en solución salina, y aglutinación en solución de acriflavina.

La falta o muy baja expresión de la cadena O se demuestra por SDS-PAGE y tinción por plata, y por análisis en blot Western con anticuerpos monoclonales de la cadena-O¹. Los análisis sobre sulfato dodecil sódico- electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguidos de tinción por azul Coomassie dan perfiles similares a la *Brucella abortus* cepa 19 y cepa 2308 lo cual sugiere que los componentes proteínicos de la cepa RB51 no han sufrido cambios diferenciales. La cepa RB51 expresa las proteínas mayor y menor de la membrana externa como previamente han sido informados para otras cepas de *Brucella abortus*. La tinción de Gram de las preparaciones de RB51 muestra formas bacila-

res o cocobacilares las cuales son ligeramente menores que las de las cepa 19 y cepa 45/20. La cepa RB51 es urea positiva, utiliza oxidativamente la glucosa, crece en presencia de eritritol, y no requiere CO² o sangre para su crecimiento¹. La cepa RB51 al igual que la cepa 2308 (pero diferente a la cepa 19) crece en medio que contiene azul tionina (1:500.000) o penicilina (5U/ml).

Resistencia antibiótica

La cepa RB51 es sensible a los antibióticos usados en el tratamiento de la brucelosis humana (tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomycin, y doxiciclina) y a la amikacina, ampicilina, cloramfenicol, carbenicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, y trimetoprim-sulfametazol. La cepa RB51 es resistente a la rifampicina (esta resistencia la diferencia de otros aislamientos de *Brucella*) y a penicilina, cloxacilina, meticilina y oxacilina. La cepa RB51 no transporta el gene de resistencia a la estreptomycin el cual se presenta y expresa por ingeniería genética de mutantes de *Brucella* Tn5.

Genes bacterianos

El genoma de la cepa RB51 tiene diferencias menores que el genoma de la cepa madre *B. abortus* 2308 cuando se examina por las técnicas corrientes^{2,3}. La cepa RB51 contiene un gene funcional *eri* para el metabolismo del eritritol, el cual falta en la Cepa 19. El cultivo de laboratorio pasaje 70a de la cepa RB51 no difirió de la Semilla Maestra cuando fue examinado por las técnicas genéticas corrientes. La técnica en campo pulsado de gel la electroforesis de restricción de fragmentos genómicos derivados- endonucleasa revela que la cepa RB51 se asemeja estrechamente con otras cepas de *Brucella*².

Estabilidad en Vacunos

La cepa RB51 es genéticamente estable en vacunos; no revierte a la virulencia o a la forma lisa después del desarrollo en bovinos por lo menos durante 12 semanas⁴. También se ha demostrado que la cepa RB51 es estable *in vitro* después de > 100 pasajes en cultivo celular e *in vivo* luego de pasajes seriados en ratones¹.

Viabilidad durante la Liofilización y Almacenamiento

El proceso de liofilización de las suspensiones de cepa RB51 causa aproximadamente una pérdida de 4% de bacterias vivas. Aún después del almacenamiento a temperaturas de -25 o 4 C por hasta un año, la cepa RB51 liofilizada retiene una excelente viabilidad (>95% y 75%, respectivamente).⁵

Dosis de la Vacuna

Las dosis subcutáneas de cepa RB51 usadas para la vacunación son: terneras, 10 a 34 mil millones de bacterias vivas; adultos/hembras preñadas, 1.0 mil millones de bacterias vivas. Las dosis comparables de cepa 19 son: terneras de 4 meses a un año, 3 a 10 mil millones; vacunos adultos, 0,3 a 1.0 mil millones de bacterias vivas.³

La dosis estándar de cepa 19 era originalmente de 10 mil millones de células vivas/ml (50 mil millones/dosis) en la prueba inicial y no menos de 5 mil millones/ml (25 mil millones/dosis) a la fecha de expiración. Posteriormente se estableció una dosis reducida de cepa 19 en 3 a 10 mil millones de células vivas con edad límite para su aplicación de 4 a 12 meses de edad. La dosis reducida está basada en datos sobre estudios con una dosis protectora mínima de 90 millones a 4.5 mil millones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para terneras de 3-6 meses de edad, y 100 millones a 90 mil millones para terneras de 4 a 6 meses de edad.⁷

Se estima que 2:100,000 terneras vacunadas retienen la cepa 19 hasta la edad adulta.⁷ En 23 vacas adultas examinadas los tejidos en los cuales la cepa 19 fue retenida fueron: útero/placenta 10, leche/ubre 6, y contenido estómago fetal 2 con aislamiento de riñón, cápsula articular, ganglio linfático preescapular.⁸

Los tejidos de los cuales se recuperaron otros dos aislamientos de cepa 19 no fueron especificados.

En vacunos ha sido determinada la bioseguridad de la cepa RB51. Los experimentos fueron hechos en terneros para determinar la bioseguridad de varias dosis (1 millón a 60 mil millones de UFC SQ) y en vacas preñadas para determinar su abortogenicidad.

Cuadro 2. Criterios de Bioseguridad para Vacuna viva de *Brucella*.

1. No se presentan signos clínicos de la enfermedad luego de la vacunación.
2. La bacteria persiste en los ganglios linfáticos por >6 semanas pero <12 semanas.
3. La bacteria no persiste en la circulación sanguínea más allá de 3 días.
4. La bacteria no se presenta en las secreciones nasales, saliva, u orina.
5. Los anticuerpos séricos aparecen a los 14 días después de la infección
6. La inmunosupresión no causa recrudescencia.
7. No hay depleción linfoide en ganglios que drenan el punto de vacunación.
8. No hay cambios tisulares degenerativos o inflamatorios.
9. Las bacterias recuperadas después de 12 semanas de desarrollo en el huésped son genéticamente idénticas a la cepa de la vacuna.

VACUNACIÓN DE TERNERAS

Efecto clínico

La cepa RB51 es segura en todas las edades. No se presenta enfermedad clínica y no hay evidencias de efectos patológicos en tejidos cuando se administraron subcutáneamente dosis elevadas de RB51 a terneros de 3 y 6 meses de edad. La vacuna de cepa RB51 persiste por un período suficiente para desarrollar inmunidad y es luego eliminada de los tejidos del huésped sin riesgos de persistencia hasta la edad adulta.⁹

En la necropsia de terneros vacunados con cepa RB51 no fueron observadas lesiones patológicas. De acuerdo a información de la Colorado Serum Company, la vacuna cepa RB51 induce aproximadamente 1 reacción adversa por millón de dosis vendidas.

Persistencia

Experimentos de bioseguridad hechos con terneras Polled Hereford de 10 meses de edad demostraron que la replicación de cepa RB51 en los ganglios linfáticos que drenaban los lugares subcutáneos de vacunación fueron aproximadamente similares que para la cepa 19, luego

de una semana de la vacunación pero declinaron más rápidamente. La mayoría de los bovinos eliminó las dosificaciones de 10 mil millones de UFC de la cepa RB51 antes de las 12 semanas posvacunación.

Lesiones Tisulares

El examen microscópico de terneros infectados con la cepa RB51 demostró que no se presentaron lesiones en el cerebro, tracto genital, y en otras vísceras. Los ganglios linfáticos que drenan los sitios de vacunación no mostraron evidencias de destrucción linfoide. Artritis, una secuela que puede presentarse en la vacunación con cepa 19, no fue observada en terneros vacunados con RB51. Lesiones histológicas no fueron encontradas en cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos (12), pulmones, corazón, útero, testículos (Cuadro 3).

Diseminación de ternero a ternero

La cepa RB51 no se transmite de terneros vacunados a terneros no vacunados. Terneras no vacunadas estabuladas con terneras vacunadas no desarrollaron evidencias bacteriológicas o serológicas de infección con cepa RB51.

Cuadro 3. Número de *Brucella abortus* vivas en ganglio linfático preescapular que drena los sitios de vacunación (promedio de 6 biopsias).

	Semanas después de la vacunación					
	1	2	4	6	10	12
RB51	4,355	1,185	82	29	1	0
CEPA 19	3,748	21,896	1,205	43	2	0

Inmunosupresión

La supresión química de la inmunidad en terneros vacunados no causó recrudescencia de la cepa RB51. La administración de dexametasona en terneros 12 semanas después de la vacunación, no indujo crecimiento de RB51, ni cambios en la respuesta serológica, u otras evidencias de recrudescencia de la cepa de vacuna.⁴

VACUNACIÓN DE BOVINOS ADULTOS

Una dosis reducida de la cepa RB51 es eficaz en vacas adultas.¹⁰ Las vacas vacunadas con una dosis única de 3×10^9 o 1×10^9 UFC, o doble vacunación con 1×10^9 UFC previo al servicio fueron protegidas contra el aborto o contra el desafío de infección intraconjuntival con 1×10^7 UFC de la cepa virulenta 2308 (Cuadro 4).¹⁰

Cepa RB51 en vacas preñadas

La cepa RB51 causó 1 aborto en 820 vacas preñadas las cuales fueron vacunadas en condiciones de campo con 1 mil millones de UFC. A fin de examinar el efecto abortígeno de la vacunación usan-

do dosis y rutas de administración inapropiadas, se administraron dosis de 10 mil millones de UFC de RB51 por vía intravenosa a 10 vaquillonas preñadas a los seis meses de gestación.¹¹ Las vaquillonas fueron sacrificadas y fue efectuada la necropsia 6 semanas después de la inoculación (n=5) y en el parto normal (n=5). La mayoría de las vaquillonas se infectó con la cepa RB51 y desarrolló placentitis, pero solamente una vaquillona parió un ternero prematuro (Cuadro 5).

Brucella abortus cepa RB51 fue cultivada de tejidos de vacas y fetos 8 semanas después de la inoculación y en el momento del parto luego de la inoculación a los 180 días de la gestación.¹¹ Muestras de útero materno, placenta, hígado, bazo, y ganglios linfáticos supramamarios estaban infectados con la cepa RB51 en ambos tiempos de la toma de muestras. (Cuadro 6). De manera similar, muestras de hígado, bazo, pulmón, ganglios linfáticos brónquicos, e hisopos de recto fueron positivos para la cepa RB51 en ambos tiempos de la toma de las muestras. Muestras alantoideas fueron positivas 2/5 a las 8 semanas, pero todas las muestras alantoideas y amnióticas fueron ne-

gativas en las muestras recolectadas al momento del parto.

En un segundo estudio se investigó los efectos de la administración subcutánea de 1mil millones de UFC de la cepa RB51 o 3×10^8 de cepa 19 en la mitad de la gestación de hembras bovinas.¹² Las vacas vacunadas con cepa 19 o con cepa RB51 no abortaron ni tuvieron nacimientos prematuros (Cuadro 7). Los tejidos maternos y fetales recolectados en la necropsia fueron negativos en los cultivos para la detección de *Brucella* spp. y no presentaron lesiones histológicas de brucelosis.

OTRAS ESPECIES ANIMALES

En la mayoría de las especies evaluadas, la cepa RB51 se mostró atenuada y la eliminación de la bacteria fue más rápida comparada con otras cepas de vacunas de *B. abortus*. Una excepción es el búfalo americano ("bison") en el cual la cepa RB51 persistió un tiempo similar a la cepa 19.¹³ En estudios de inocuidad en ratones campestres, cuervos, venados, ardillas terrestres, la cepa RB51 fue eliminada de los tejidos esplénicos y hepáticos del venado, ratón y cuervo a las 12 semanas y no se observaron efectos nocivos de morbilidad o mortalidad. En la ardilla terrestre la administración oral de cepa RB51 no indujo enfermedad clínica o mortalidad, aun cuando la cepa de vacuna fue recuperada del bazo de 4 de 7 ardillas terrestres 12 semanas después de la infección oral.¹⁴

Cuadro 4. Vaquillonas Hereford (18 meses de edad) fueron vacunadas con *B. abortus* cepa RB51 inmediatamente después del servicio y desafiadas intraconjuntivalmente en la mitad de la gestación con *B. abortus* cepa 2308.

Dosificación	N	Número de preñadas	Número de abortos	Cepa 2308 recuperada de tejidos	
				Materno	Fetal
3x10 ⁹ UFC dosis única	6	4	0/4	0/4	0/4
1x10 ⁹ UFC dosis única	7	7	0/7	0/7	0/7
1x10 ⁹ UFC doble dosis	6	4	0/4	0/4	0/4
No vacunadas	6	6	4/6	6/6	4/6

Cuadro 5. Vacas preñadas (16 de 27 meses de edad) fueron inoculadas intravenosamente con 10 mil millones UFC de *B. abortus* cepa RB51 a los 180 días de preñez.

n=	Tiempo en semanas del examen después del desafío	Número de placentas infectadas	Número con placentitis	Número de abortos o terneros prematuros
5	8 semanas	4/5	4/5	0
5	en el parto	4/5	4/5	1 *

* terneros

Cuadro 6. Cultivos bacterianos de tejidos de vacas y fetos después de la administración intravenosa de 10 mil millones de UFC de *B.abortus* cepa RB51 a los 180 días de la preñez

Animal	Tejidos	Necropsia	
		8 semanas	Parto/nacimiento (n=5)
Vacas	Placenta	4/5	4/5
	Ganglios mamarios	2/5	0/5
	Leche	0/5	1/5
	Hisopos vaginales	0/4	1/5
Fetos	Pulmones	4/5	2/5
	Contenido del cuajo	2/5	1/4
	Sangre	0/5	2/5

Cuadro 7. Vacas preñadas (20 meses de edad) fueron inoculadas subcutáneamente con 1 mil millones de UFC de *B. abortus* cepa RB51 o con 3×10^8 de UFC de *B. abortus* cepa 19 a los 180 días de la preñez.

n=	Vacuna	Número de placentas infectadas	Número de placentitis	Número de abortos o terneros prematuros
5	Cepa RB51	0/5	0/5	0
5	Cepa 19	0/5	0/5	0

EFICACIA DE LA VACUNACIÓN EXPERIMENTAL DE VACUNOS CON CEPA RB 51

Efecto de la Vía de Vacunación

En el vacuno la inyección subcutánea es la única vía recomendada para el uso de la vacuna RB51. Según se ha demostrado, las terneras vacunadas subcutáneamente con RB51 quedan protegidas contra la infección y el aborto. La dosis de la cepa virulenta de desafío *B. abortus* 2308 (10^7 in 100ul) fue administrada en el saco conjuntival (50ul/ojo).⁹ La vacunación de vacunos con cepa 19 por vía conjuntival o intrapalpebral fue casi tan efectiva como la vacunación subcutánea pero no tan práctica. La vacunación oral con cepa 19 ha tenido éxito; mientras que los estudios de administración de la RB51 por vía oral están siendo efectuados. Estos experimentos de vacunación oral en vaquillonas con cepa 19 han demostrado protección contra el aborto: 0/20 vaquillonas preñadas vacunadas oralmente y

luego desafiadas con la cepa 2308 virulenta en la mitad de la gestación, no sufrieron aborto; mientras que 10/19 vaquillonas preñadas controles abortaron (14 dieron cultivo positivo).¹⁵

Los sistemas balísticos de aplicación de la vacuna RB51 liofilizada están siendo evaluados en el búfalo americano y en el alce.

Efecto de la dosis de vacunación

Dosis altas de cepa RB51 dan respuestas inmunes detectables más elevadas que las dosis mas bajas. A fin de exami-

nar el efecto de la dosis sobre la protección, grupos de terneras Polled Hereford fueron vacunadas por vía subcutánea a los 7 meses con una dosis alta (32 mil millones de UFC) o con dosis bajas (16 mil millones de UFC) de la vacuna RB51. Las terneras fueron desafiadas con la cepa virulenta 2308 a los 6 meses de preñez y fueron examinadas para detectar evidencias de infección y aborto. Los datos sugieren protección similar de la vacuna RB51 a las dosis de 16 y 32 mil millones de UFC (Cuadro 8).¹⁶

Terneras Polled Hereford fueron vacunadas subcutáneamente con 16 o 32 mil millones de bacterias vivas, fueron servidas a los 16 - 18 meses de edad, y desafiadas con la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308 a los 6 meses de gestación.¹⁶

Efecto de la Edad de Vacunación

A fin de determinar el efecto de la edad de vacunación, se utilizaron hembras Polled Hereford las cuales fueron vacunadas con 10 mil millones de UFC de la vacuna RB51 a las edades de 3, 5, 6, 7, y 10 meses de edad, se cubrieron a los 16-18 meses de edad, y fueron desafiadas con la cepa virulenta de *B. abortus* a los 6 meses de gestación.^{9,17,18} 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). Las hembras que recibieron la vacuna cepa 19 (n=22) estaban protegidas contra la infección en 95% mientras que las hembras no vacunadas controles (las cuales recibieron solución salina; n=47) tuvieron una alta incidencia de infección y aborto.

Cuadro 8. Eficacia de la Vacuna RB51 administrada a dos dosis diferentes.

Edad de vacunación	Vacuna (dosis)	n=	Brucella Aborto
7 meses	RB51- alta	6	0
7 meses	RB51- baja	6	0
20 meses	RB51- baja	3	0
7 meses	sol. salina	6	2

Cuadro 9. Eficacia de la Cepa RB51 usada en cinco edades diferentes de vacunación.

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

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

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

CEPA RB51 EN OTRAS ESPECIES

Un estudio de la eficacia de la vacuna RB51 (4×10^{10} UFC administradas subcutáneamente) en carneros contra *Brucella ovis* no demostró protección. Seis meses después de la vacunación, los carneros fueron desafiados con 3×10^9 UFC de *B. ovis* virulenta y fueron examinados 8 semanas más tarde. Tanto los controles como los vacunados con la RB51 fueron infectados en el 100%; mientras que se infectó el 68% de los carneros vacunados con la vacuna Rev-1 (Cepa Rev-1 de *Brucella melitensis*).

PRUEBAS EN VACUNOS EN CAMPO

Pruebas en campo llevadas a cabo por APHIS/USDA (Drs. Mike Gilsdorf,

Donald Evans) comenzaron en 1994 en Kansas y involucraron la vacunación de vacas adultas en un rodeo (rebaño) no infectado y en tres rodeos (rebaños) infectados (Cuadro 11). Las vacas recibieron vacuna liofilizada preparada en el National Animal Disease Center una dosis de 1 mil millones de CFU de *B. abortus* cepa RB51 (cepa ARS-1).

Los rodeos (rebaños) 1, 2, y 4 estaban cuarentenados en el momento de la vacunación debido a la identificación de bovinos infectados con *B. abortus*. Los rodeos (rebaños) 1 y 2 han sido despoblados. SD= Sin datos.

Como parte del proceso de obtención de la licencia (permiso, autorización), Colorado Serum Company efectuó pruebas de campo en las cuales fueron adminis-

Cuadro 11. Pruebas de campo con *B. abortus* cepa RB51.

Rodeo (rebaño)	n	Fecha de vacunación	Estatus	
			No. nacimientos	Cultivos Positivos
1	25	12-3-94	13	2
2	99	12-22-94	35	SD
3	57	3-20- 95	>18	0/22
4	15	7-27-95	SD	

tradas dosis de 1 mil millones de UFC de RB51 a más de 1500 bovinos adultos, de ellos más de 800, se confirmó, estaban preñados. Luego del examen bacteriológico, serológico e histológico de las muestras obtenidas después del aborto, la cepa RB 51 fue incriminada como causante de un aborto y se diagnosticaron otros 6 abortos que no fueron causados por la vacunación con la cepa RB51. El papel potencial de la cepa RB51 en dos abortos adicionales ocurridos en estos estudios se desconoce ya que no fueron obtenidas muestras para el análisis de laboratorio. Los efectos de la dosificación de la cepa RB51 en vacas preñadas es desconocido. Sin embargo, la cepa RB51 fue recuperada de tejidos fetales luego de distocia presentada en una vaquillona la cual fue vacunada con la dosis de ternera ($1-3.4 \times 10^{10}$ UFC) en la mitad de la gestación.²⁰

DETECCIÓN DE VACUNOS INFECTADOS EN LABORATORIO Y EN CAMPO

Pruebas Serológicas Estándar para Brucelosis

Los sueros de bovinos vacunados con cepa RB51 no contienen anticuerpos que reaccionen en las pruebas diagnósticas corrientes para brucelosis. En los vacunos, no son inducidos los anticuerpos de la cadena O los cuales reaccionan en las pruebas serológicas que usan lipopolisacáridos como antígenos (pruebas estándar en tubo, prueba de la tarjeta, rivanol, PCFIA).²¹ Los vacunos adultos no sufren seroconversión detectable en las pruebas de vigilancia. La vacunación con la cepa RB51 en bovinos adultos que habían recibido la vacunación con cepa 19 cuando eran terneras, no indujo respuestas serológicas en las pruebas convencionales de vigilancia.²² El fracaso de la cepa RB51 para producir anticuerpos de la cadena O también se ha demostrado en otras especies (caprino, conejo, ratón).¹

Vacunos vacunados con cepa RB51 e infectados con la cepa virulenta 2308 desarrollan anticuerpos los cuales reaccionan en las pruebas serológicas estándar. Los vacunos vacunados con cepa RB51, luego de desafiados con la cepa virulenta 2308 muestran respuestas po-

sitivas en la prueba estándar de tubo, pero a diferencia de las respuestas de los vacunos no vacunados e infectados, los títulos serológicos disminuyen progresivamente.

Pruebas serológicas para la cepa RB51

Las evidencias serológicas de la vacunación con cepa RB51 se hacen con la prueba del "dot blot" la cual detecta la respuesta de anticuerpos contra las proteínas bacterianas gamma- irradiadas de la RB51.²³ Los títulos de anticuerpos son significativamente más altos en los vacunos a los cuales se ha dado una dosis de 30 mil millones de CFU de la cepa RB51, comparados con los títulos de los vacunados con una dosis de 15 mil millones. Los vacunos vacunados con Cepa RB51 producen anticuerpos contra, por lo menos, la membrana proteica externa (superficiales) 4 o 5 de *B. abortus*. Estas proteínas han sido aisladas para usarlas en el desarrollo de una prueba diagnóstica más específica.²⁴

Prueba Cutánea

La prueba cutánea de sensibilidad específica por medio de inyección intradérmica de brucelina no distingue entre vacunos infectados con cepa 19 y aquellos infectados con una cepa de *B. abortus* virulenta de campo, ya que ambos grupos reaccionan dando pruebas cutáneas positivas. Los vacunos vacunados con RB51 no reaccionan a la inyección intradérmica de brucelina estándar.²⁴

Inmunidad celular mediada

Los vacunos vacunados con RB51 muestran in vitro evidencias de inmunidad mediada por células. Los linfocitos aislados de ganglios linfáticos de vacunos vacunados con RB51 responden de manera similar a aquellos procedentes de vacunos que recibieron cepa 19.²⁵

Identificación Bacteriológica

Los métodos presentes para el cultivo de la cepa RB51 incluyen el plaqueado en placas de agar triptosa conteniendo 5% de suero bovino. Usualmente, el desarrollo se presenta a los 4-5 días de incubación. El subcultivo es seguido por

la verificación de las características consistentes, morfológicas y bioquímicas de la cepa RB51. Se ha desarrollado un medio selectivo que facilita el aislamiento e identificación de la cepa RB51 y permite su diferenciación de las cepas de *B. abortus* experimentales y las cepas de campo.²⁶

Un prueba rápida (abortus, melitensis, ovis, suis: "AMOS" PCR TEST), basada en la tecnología de la cadena polimérica, puede ser usada para la identificación diagnóstica específica de la cepa RB51. La prueba "AMOS" distingue la cepa RB51 de otras cepas virulentas de *B. abortus* aisladas en el campo, en 8 horas, mientras que las técnicas bacteriológicas estándares requieren varios días para diferenciarlas. La prueba "AMOS" no permite diferenciar la cepa RB51 de su cepa madre 2308. El análisis genético ha demostrado una segunda redistribución genética, la cual diferencia la cepa RB51 de la cepa 2308. Esta redistribución es estable y ha sido mantenida en todos los aislamientos de la RB51 probados hasta el presente, y podría ser usado para desarrollar una prueba diferencial.²

CEPA RB51 EN EL BÚFALO AMERICANO Y EN EL ALCE

La infección con *B. abortus* del búfalo americano y el alce en el Yellowstone National Park es una fuente potencial de infección del vacuno y de la persistencia de la brucelosis en Estados Unidos. Los estudios en el búfalo americano indican que la cepa RB51 puede ser un efectivo agente inmunizante. Los búfalos americanos vacunados subcutáneamente con RB51, tienen un pico menor de número de bacterias en los tejidos de los ganglios linfáticos, más bajo título de anticuerpos, y eliminan las bacterias más lentamente que los vacunos^{12,27,28} La cepa RB51 se localiza predominantemente en los tejidos de los ganglios linfáticos de los búfalos y no parece causar lesiones histológicas adversas.²⁸

En los búfalos americanos la vacunación de terneros con la cepa RB51 no disemina la infección a terneros vírgenes estabulados con ellos o alojados en el mismo ambiente.²⁷ En los búfalos ha sido de-

mostrada la respuesta celular mediada a antígenos de *B. abortus* iniciándose a las 12 semanas y las respuesta son similares a las que se observan en los vacunos vacunados.²⁷ Las búfalas vacunadas con RB51 en la edad joven (terneras) quedaron protegidas contra la infección y aborto, cuando fueron desafiadas en la mitad de la gestación con la cepa virulenta 2308.²⁹

La vacunación con RB51 en la edad adulta de búfalas preñadas, la cepa RB51 indujo aborto (2/8) y placentitis cuando se aplicó a la dosis de 10⁹ UFC, dosificación que ha demostrada ser segura en bovinos.³⁰ Los datos sugieren que la búfala vacunada en el segundo trimestre de la gestación es probable que aborte.

INFECCIÓN HUMANA

Han ocurrido infecciones accidentales de humanos con *B. abortus* cepa RB51, si bien, no hay conocimiento de signos clínicos adversos que hayan sido informados al Center for Disease Control en Atlanta, GA. Sin embargo, la patogenicidad de la cepa RB51 para los humanos está aún pendiente de determinación.

COMERCIALIZACIÓN

No existe patente para la *B. abortus* cepa RB51. Los científicos e instituciones que desarrollaron (Dr. Schurig, Virginia Polytechnic Institute) y probaron (National Animal Disease Center, ARS) la cepa RB51 han publicado sus datos, y esto impide la adquisición y registro de patente.

El potencial del uso de la vacuna RB51 en Estados Unidos ha sido estimado en 10 millones de dosis anuales durante 10 años.

Actualmente la cepa RB51 se reconoce como vacuna oficial en 49 estados con, por lo menos, 20 estados que no autorizan el uso de la vacuna cepa 19. (Alaska no autoriza la vacunación de los vacunos contra la brucelosis).

Se anticipa que APHIS recomendará suspender el uso de la cepa 19, o alternativamente, reducir severamente su uso, una vez que la vacuna comercial de cepa RB51 obtenga aprobación oficial completa.

REFERENCIAS

- Schurig G.G., Roop R.M., Bagchi T., Boyle S., Buhrman D., Sriranganathan N. 1991, Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 28: 171-188.
- Jensen A.E., Cheville NF, Ewalt D.R., Payeur J.B., Thoen C.O. 1995. Application of pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of vaccine strain RB51 from field isolates of *Brucella abortus* from cattle, bison, and elk. Am. J. Vet. Res. 56: 308-312.
- Bricker B.J., Halling S.M., 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay: differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain RB51. J. Clin. Microbiol. 33: 1640-1642.
- Cheville N.F., Jensen AE, Halling S.M., Tatum F.M., Morfitt D.C., Hennager S.G., Frerichs W.M., Schuring G. 1992. Bacterial survival, lymph node changes and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 53 :1881-1888.
- Capsel R.L., Olsen S.C., Cheville N.F., Thoen C.O. Survival of *Brucella abortus* strain RB51 lyophilized and as liquid vaccine under different storage conditions. Biologicals (In Press).
- Deyoe B.L., Dorsey T.A., Meredith K. Garrett L. 1980. Reduced doses of *Brucella abortus* in cattle. Proc. USAHA Annl. Meet., pp 163-164.
- Jones L.M., Berman D.T. 1976. The role of living vaccines in prophylaxis. Develop. Biol. Standard 31: 328-334.
- Thomas B.L., Bracewell C.D., Corbel M.J. 1981. Characterization of *Brucella abortus* strain 19 culture isolated from vaccinated cattle. Vet. Record 108: 90-93.
- Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen AE, Tatum F.M., Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. AM. J. Vet. Res. 54 : 1591-1597.
- Olsen S.C. 2000. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. Res. Vet. Sci. (in Press)
- Palmer M.V., Cheville N.F., Jensen A.E. 1996. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB 51. Pathologic, bacteriologic and serologic findings. Vet. Path. 33: 682-691.
- Palmer M.V., Cheville N.F., Olsen S.C. 1997. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in pregnant cattle. Am. J. Vet. Res. 58: 472-477.
- Olsen S.C., Cheville N.F., Kunkle R.A., Palmer M.V., Jensen A.E. 1997. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of bison (*Bison bison*) vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51, J. Wildlife Dis. 33: 146-151.
- Jannuszewski M.C., Olsen S.C., McLean R.G., Clark L., Rhyan J.C. Biosafety of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in non-target species of birds and rodents. J. Wildlife Dis. (In Review).
- Nicoletti P., Milward F.W. 1983. Protection by oral administration of *Brucella abortus* strain 19 against an oral challenge exposure with a pathogenic strain of *Brucella*. Am. J. Vet., Res. 44: 1641-1646.
- Olsen S.C., Bricker B., Palmer M.V., Jensen A.E., Cheville N.F., 1999. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: Serology, clearance and efficacy. Res. Vet. Sci. 66: 101-105.
- 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, Am. J. Vet. Res. 57: 1604-1607.
- Olsen SC. 2000. Immune responses and efficacy following administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. Vet. Therapeutics (In Press).
- de Bacques M.P.J., Barberan M., Marin C.M., Blasco J.M. 1995. The *Brucella abortus* RB51 vaccine not confer protection against *Brucella ovis* in rams. Vaccine 13: 301-304.
- Van Metre D.C., Kennedy G.A., Olsen SC, Hansen GR, Ewalt DR. 1999. Brucellosis induced by RB51 vaccine in a pregnant heifer. J.A.V.M.A. 215: 1491-1493.
- MacMillan A. 1990, Conventional serologic tests, pp 153-197. In: Nielsen K., Duncan J.R. (eds.) Animal Brucellosis CRC Press, Boca Raton, FL.
- Olsen SC, Stevens MG, Cheville NF, Schurig G. 1997. Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. J. Vet. Diag. Invest. 9: 363-367.
- Olsen S.C., Evans D., Hennager S.G., Cheville N.F., Stevens M.G., 1996. Serologic Responses of Calftood Vaccinated Cattle to *Brucella abortus* strain RB51. J. Vet. Diag. Invest. 8: 451-454.
- Cheville N.F., Jensen A.E., Morfitt D.C., Stabel T.J. 1994. Cutaneous delayed hypersensitivity reactions of cattle vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*, using brucellins prepared from various brucellar strains. Am. J. Vet. Res. 55: 1261-1266.
- Stevens M.G., Olsen S.C., Cheville N.F. 1994. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. Vet. Immunol. Immunopathol. 44: 223-235.
- Hornsby R.L., Jensen A.E., Olsen S.C., Thoen C.O. 2000. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. Vet. Microbiol. 73: 51-60.
- Olsen S.C., Jensen A.E., Palmer M.V., Stevens M.G. 1998. Evaluation of serologic responses, lymphocyte proliferative responses, and clearance from lymphatic organs after vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51. Am. J. Vet. Res. 59: 410-415.

-
28. Roffe T.J., Olsen S.C., Gidlewski T., Jensen A.E., Palmer M.V., and Huber R. 1999. Biosafety of parenteral *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in bison calves. *J. Wildlife Management*. 63: 950-955.
29. Olsen S.C. and Palmer M.V. Efficacy of calfhooed vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 to protect bison against challenge with virulent *B. abortus* strain 2308. *J. Wildlife Dis.* (In preparation).
30. Palmer M.V., Olsen S.C., Gilsdorf M.J. Philo L.M., Clarke P.R., Cheville N.F. 1996. Abortion and placentitis in pregnant bison (*Bison bison*) induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1604-1607.