

COMPARACION DE LA EFICACIA DE DOS VACUNAS VIVAS ATENUADAS CONTRA LA BRUCELOSIS CAPRINA EN MEXICO ¹

Dr. George M. Baer,² Ricardo Flores C.,³ Adán Cortés N.,³ y Héctor Morales S.⁴

La vacuna Rev. 1, introducida a fines del decenio de 1950, parece ser más eficaz que la 899B para proteger de la brucelosis al ganado caprino y ovino. Aquella confiere inmunidad por cuatro años y medio, como mínimo, aunque en algunas ocasiones es excretada en la leche de los animales vacunados y provoca el aborto si se emplea en un tiempo determinado de la preñez.

La brucelosis es una enfermedad de incidencia indeterminada en México, pero los pocos informes disponibles (1-5) revelan que la mayoría de los casos humanos registrados se deben a la *Brucella melitensis*. Naturalmente, más de la mitad de los casos de brucelosis humana notificados cada mes corresponden a los estados en que más abunda el ganado caprino (1-5). Dada la acostumbrada tasa de infección de rebaños, que en muchos estados excede del 10%, y a la infección de por lo menos un 38% de los rebaños (1), la manera más eficaz de abordar el problema sería vacunando estos animales. Las dos vacunas disponibles para su evaluación en México eran la vacuna Rev.1, ensayada por primera vez en ganado caprino en 1957 (6) y en otras numerosas ocasiones subsiguientes (7-13), y la vacuna 899B, elaborada en México, experimentada primero en animales de laboratorio (14) y recientemente en cabras (15).

Materiales y métodos

Animales

Se emplearon para el estudio cabras negras, del tipo granadino, de 12 a 15 meses

de edad, nacidas en cautiverio en Durango, y que presentaron resultados negativos en las pruebas de aglutinación de brucelas. Un mes antes de la cría fueron inoculados 18 animales con vacuna Rev. 1, 17 con vacuna 899B y otros 18 sirvieron de testigo. Todas las cabras fueron marcadas al frío con nitrógeno líquido, procedimiento empleado satisfactoriamente en otras especies (16).

Vacunas

Se aisló Rev. 1⁵ como una mutante no dependiente de la estreptomycinina de una población de *Br. melitensis* dependiente de la estreptomycinina (17). Se cultivó en un medio de agar tripticasa soya y se recolectó en solución diluyente de Zobell (18). Se inyectó por vía subcutánea, en el lado izquierdo del cuello del animal, un ml de inóculo de bacterias diluido en agua destilada estéril.

La vacuna 899B⁶ consistía en una cepa lisa de *Br. melitensis* atenuada mediante varios centenares de transferencias en un medio de agar que contenía bilis de buey o sales biliares (14). Se aplicaba una gota (1/28 ml) de la vacuna diluida en agua destilada estéril en el ojo derecho del animal, inoculando 7.5×10^{12} organismos por cabra.

¹ Este trabajo fue financiado en parte por el Banco Nacional Agropecuario, y se realizó cuando G. M. Baer prestaba servicios como consultor del Centro de Control de Enfermedades y de la Organización Panamericana de la Salud en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (I.N.I.P.).

² Jefe, Unidad de Investigaciones de Laboratorio, Centro de Control de Enfermedades, Servicio de Salud Pública, Secretaría de Salud, Educación, y Bienestar, Atlanta, Georgia, E.U.A.

³ Del Laboratorio de Microbiología General, I.N.I.P.

⁴ Del Banco Nacional Agropecuario, México, D. F.

⁵ El Dr. S. S. Elberg, Universidad de California, facilitó gentilmente la vacuna.

⁶ Suministrada gentilmente por el Dr. Alberto P. León, Instituto de Enfermedades Tropicales, México.

Pruebas de aglutinación

Se obtuvieron muestras de suero de las 53 cabras 50 días antes de la vacunación, 52 días después y a los 7, 21, 33, 43, 53, 63 y 73 días después de la confrontación. Esta se efectuaba a los 73 días después de la vacunación.

La prueba de aglutinación en tubo se practicó empleando un antígeno de *Br. melitensis* (cepa 16M) estandarizado con arreglo al suero patrón internacional, anti-*Br. abortus*, según el método recomendado por la OMS (30). Un título de 1:40 o superior se consideró como prueba de la conversión de negativo en positivo.

Confrontación

La confrontación se efectuó introduciendo una gota (previamente medida a 1/50 cc) de una suspensión de cepa H38 virulenta de *Br. melitensis*, en el párpado inferior de la cabra; esta gota contenía 4.03×10^6 organismos, determinados por los recuentos de viabilidad efectuados inmediatamente después de la confrontación.

Se hizo la confrontación en primer lugar con un animal anteriormente inoculado con vacuna 899B, a continuación, con otro que había recibido Rev. 1 y luego con un testigo, y así sucesivamente. El procedimiento de confrontación duró 30 minutos.

Extracción de órganos y pruebas bacteriológicas

En el momento del aborto o del parto, se recogía el feto y la placenta (o se mataba al animal recién nacido), y se examinaba el hígado, el bazo, los pulmones y el contenido estomacal de todos los fetos y animales recién nacidos. Se sacrificaba a la cabra y se le extraían asépticamente los siguiente tejidos y secreciones: nódulos linfáticos, submaxilares, parótidos, retrofaríngeos, pre-escapulares, precurales, popliteales, retro-mamarios e ilíacos, los nódulos hepáticos y mediastinales y los pulmones, el bazo, el hígado y las mamas, leche, exudado vaginal, cotiledones y sangre. Se hizo un cultivo en placa de cada tejido en un medio de Kuzdas y Morse (19) ligeramente modificado, que contenía 10 mg de actidiona, 2,500 unidades de bacitracina, y 600 unidades de B/100 ml de polimixina de medio de base. Las colonias obtenidas en este medio se tiñeron con la coloración de Gram y Hansen y se cultivaron en placas en un medio de McConkey; por último, se practicaron pruebas de aglutinación con suero anti-*Br. melitensis* monoespecífico. Todas las colonias de brucelas resultaron gramnegativas pero se tiñeron con la coloración de Hansen; no se proliferaron en el medio de McConkey y se aglutinaron con antisuero monoespecífico. Además, todos los tejidos infectados pertenecientes al grupo que recibió vacuna

CUADRO 1—Títulos medios de aglutinación en tubo en tres grupos de cabras (uno inoculado con Rev. 1, otro con vacuna 899B y otro que sirvió de testigo) sometidas a la confrontación de *Br. melitensis*, cepa H38.

Días después de la vacunación (confrontación)	Títulos de antígeno de <i>Br. melitensis</i> (Cepa 16M)		
	Rev. 1	899B	Testigos
52	1:77	1:13	<1:10
73	Confrontación	Confrontación	Confrontación
80 (7)	1:38	1:14	<1:10
94 (21)	1:40	<1:10	<1:10
106 (33)	1:53	<1:10	<1:10
116 (43)	1:43	<1:10	1:17
126 (53)	1:23	<1:10	1:27
136 (63)	1:20	<1:10	1:37
146 (73)	1:28	<1:10	1:57

Rev. 1 se sometieron a un medio de cultivo en placa que contenían 2.5 ml de estroptomina o cinco unidades internacionales de penicilina por ml para distinguir las cepas vacunales de las de confrontación.

Si seis o más tejidos resultaban infectados por *Br. melitensis*, se consideraba que la cabra sufría una infección generalizada.

Resultados

Serología

Se observó una notable diferencia entre los títulos de aglutinación del grupo testigo y de los dos grupos vacunados (cuadro 1). En el grupo inoculado con vacuna Rev. 1, el título medio de aglutinación en tubo descendió de 1:77 (52 días después de la vacunación) a 1:23 (126 días después de la vacunación, 53 días después de la confrontación), a continuación de un ligero aumento durante el primer mes subsiguiente a la confrontación. Los títulos medios de las cabras inoculadas con vacuna 899B se mantuvieron a un nivel inferior a 1:10 a partir del 94° día, habiendo comenzado a un bajo nivel de 1:13 al 52° día después de la vacunación; no se registró ningún aumento de titulación con posterioridad a la confrontación. El grupo testigo acusó un título medio inferior a 1:10 hasta 43 días después de la confrontación en que aumentó a 1:17; al cabo de 30 días había ascendido a 1:57.

Bacteriología

En el cuadro 2 se enumeran los fetos y

CUADRO 3—Infección por brucelas en tres grupos de cabras adultas (grupo 899B, grupo Rev. 1 y grupo testigo) confrontadas con *Br. melitensis*, cepa H38.

Vacuna	Cabras infectadas por brucelas	Cabras no infectadas	Total de animales infectados
Rev. 1	6	12	6/18 (33.3%)
899B	12	5	12/17 (70.6%)
Testigos	14	4	14/18 (77.8%)

las crías recién nacidas, de los que se aislaron *Br. melitensis*. También se indica el número de preñeces. En el grupo testigo había numerosos fetos y crías infectados (9 de 19, o sea 47.3% del total de fetos y crías), unas cuantas crías infectadas en el grupo inoculado con vacuna 899B (un total de 4/17, o sea 23.6%), pero sólo un feto infectado en el grupo inoculado con Rev. 1 (1/18 o sea 5.5%). Ocurrieron numerosos abortos no específicos, probablemente debidos al envío de animales inmediatamente antes de la confrontación; muchos de ellos se observaron inmediatamente después de la llegada de las cabras a los locales de aislamiento del Instituto.

En los cuadros 3 y 4 se resume la tasa de infección en las cabras adultas sacrificadas después del aborto o el parto, incluido el período entre la confrontación y la autopsia. La tasa de infección en las cabras que recibieron vacuna 899B resultó prácticamente idéntica a la de los animales testigo (70.6 y 77.7%, respectivamente) mientras que la de las inoculadas con vacuna Rev. 1 fue decididamente menor (33.3%). Los órganos infectados fueron más numerosos en las

CUADRO 2—Abortos y partos en tres grupos de cabras (grupo 899B, grupo Rev. 1 y grupo testigo) confrontadas con *Br. melitensis*, cepa H38.

Vacuna	No. de preñeces	Total de abortos y partos	Abortos debidos a las brucelas	Total de abortos (infectados y no infectados)	Crías infectadas por brucelas ^c	Total de crías (infectadas y no infectadas)	Total de abortos y crías asociados a las brucelas	
							No.	Porcentaje
Rev. 1	16	18 ^a	1	7	0	11	1/18	5.6
899B	18	17	0	5	4	12	4/17	23.5
Testigos	16	19 ^b	6	9	3	10	9/19	47.4

^a Incluidos dos pares de gemelos.

^b Incluido un par de gemelos.

^c Además de los abortos por brucelas.

CUADRO 4—Alcance de la infección por brucelas en grupos de cabras adultas (grupo 899B, grupo Rev. 1 y grupo testigo) confrontadas con *Br. melitensis*, cepa H38.

Vacuna Rev. 1		Vacuna 899B		Testigos	
Sacrificadas días después de la confrontación	No. de órganos infectados	Sacrificadas días después de la confrontación	No. de órganos infectados	Sacrificadas días después de la confrontación	No. de órganos infectados
25	—	25	4	25	—
27	—	30	— ^a	38	1
48	—	39	11	39A	19
55	1	48	1	39A	26
59A ^b	23	56	2	40A	11
60	—	59	—	41	—
62	5	60C ^c	21	48	1
67	—	67	—	55	—
73	—	68	4	55C	16
73	11	68	4	55	6
77	—	68	1	60A	19
83	2	71	—	71A	13
91	2	73C	2	73C	8
95	—	73	1	77A	21
95	—	73CC	7	77C	18
102	—	91	4	95	2
102	—	102	—	96	2
				102	—

^a Número de brucelas detectadas.
^b *Br. melitensis* aislada de fetos (A, aborto).
^c *Br. melitensis* aislada de crías (CC, crías).

cabras testigo (cuadros 4 y 5). Si bien la mitad (7/14) de las cabras testigo infectadas excretaban *Br. melitensis* en la leche y en el exudado vaginal, no ocurrió lo mismo en los animales infectados en cualquiera de los grupos vacunados. Se aisló cepa Rev. 1 del hígado de la primera cabra sacrificada de ese grupo.

Se observó muy poca relación entre la presencia de *Br. melitensis* en los tejidos de cabra y la presencia de un considerable título (1:40) de aglutinación en tubo (cuadro 6). Una de las cabras vacunadas con Rev. 1 que acusaba un bajo título mostró brucelas en los tejidos, mientras que 12, cuyos títulos eran de 1:40 o mayores, no revelaron la

presencia de ninguno; por el contrario, en los animales vacunados con vacuna 899B 10 cabras con títulos terminales inferiores a 1:40 tenían brucelas en los tejidos, y sólo dos con títulos de 1:40 o mayores no mostraron esos organismos.

Discusión

La infección de *Br. melitensis* constituye un grave problema en muchos lugares del mundo desde que se descubrieron esos organismos en Malta en 1886. Se han hecho numerosas tentativas para elaborar una vacuna inocua y activa, capaz de estimular una inmunidad prolongada. La vacuna Rev. 1,

CUADRO 5—Gravedad de la infección por brucelas en tres grupos de cabras adultas (grupo 899B, grupo Rev. 1 y grupo testigo) confrontadas con *Br. melitensis*, cepa H38.

	Vacuna Rev. 1	Vacuna 899B	Testigos
Cabras infectadas	6/18	12/17	14/18
Cabras con infección generalizada ^a	2/18	3/17	10/18

^a Seis órganos, o más, infectados.

CUADRO 6—Relación del título de aglutinación terminal en tubo (1:40 o mayor) y la presencia de *Br. melitensis, post mortem* en cabras sometidas a la confrontación después de la inoculación con vacuna Rev. 1 o vacuna 899B, y el grupo testigo.

Grupo de vacuna	<i>Brucella melitensis</i> Recobrada de cabras con:		<i>Brucella melitensis</i> No recobrada de cabras con:	
	Título <1:40	Título ≥1:40	Título ≥1:40	Título <1:40
Rev. 1	4	1	12	0
899 B	1	10	2	5
Testigos	9	4	1	4

introducida a fines del decenio de 1950, parece ser la que más se aproxima a esta idea entre todas las vacunas elaboradas hasta la fecha. Esa vacuna conferirá protección al ganado caprino (7-13) y ovino (20-22), contra graves confrontaciones, y confiere inmunidad por cuatro años y medio, como mínimo (10), aunque a veces es excretada en la leche de animales vacunados (28) y causa el aborto cuando se emplea en un momento determinado de la preñez (23). Estos factores no parecen propagar la cepa entre los animales vacunados (24) ni tampoco causan reversión de la cepa a una forma más virulenta ni siquiera en las condiciones más extremas (25, 29, 30). La eficacia de la vacuna Rev. 1 en el ganado caprino se ha demostrado en muchos lugares del mundo, pero su eficacia en América Latina no ha sido todavía ensayada, con excepción de un estudio limitado sobre el terreno efectuado en la Argentina (26). El ensayo descrito en esta ocasión confirma una vez más los datos existentes en apoyo de la eficacia de la vacuna Rev. 1 para el ganado caprino.

La vacuna 899B no fue ensayada en las cabras hasta recientemente (15), y se suponía que era una vacuna inocua y activa que ofrece una inmunidad de por lo menos dos años. Los datos de estos ensayos son un poco difíciles de interpretar, pero no parecen apoyar lo suficientemente estas conclusiones: en el primer experimento efectuado en caprinos (vacunación subcutánea y confrontación artificial) sólo fueron vacunados 8 animales (3 hembras y 5 machos); en los dos experimentos en que la exposición sobre el terreno a cabras afectadas por una infección natural fue el método de confrontación (después de la vacunación por vía oral y conjuntival), los resultados no pueden compararse estadísticamente. En los tres experimentos mencionados con la vacuna 899B, se juzgaron los resultados de la confrontación a base de que se presentara o no reacción serológica, y no se informó de ningún examen bacteriológico. León también informó que la vacuna no causa el

aborto en animales preñados, pero puede ser excretada en la leche si se administra hasta 15 días antes del parto.

En este estudio, la vacuna Rev. 1 resultó más eficaz para reducir los abortos y las infecciones en las crías recién nacidas; la vacuna 899B redujo la tasa de infección en estos animales, aunque en menor medida. Ambas vacunas lograron disminuir la excreción de bacterias en la leche y en el exudado vaginal. Sin embargo, en lo que se refiere al grado de infección en los animales adultos, se infectaron prácticamente el mismo número en el grupo de vacunados con 899B que en el grupo testigo, mientras que las cabras infectadas vacunadas con Rev. 1 fueron muchas menos. Así, pues, la vacuna Rev. 1 confirió la mejor protección contra la posibilidad de infección de una cabra en un exposición en la que se infectaron los 18 animales testigo, con excepción de cuatro, y redujo también notablemente el total de abortos y de crías infectados. Estos resultados pueden compararse favorablemente con otros antes mencionados obtenidos con la misma especie.

En una primera serie de experimentos, León y Cano (27) vacunaron a cabras con polisacárido aislado de *Br. melitensis* adsorbiéndolo a fosfato de aluminio, y concluyeron que la infección caprina de *Br. melitensis* va acompañada invariablemente de un aumento significativo del título de la reacción de aglutinación de los animales positivos a causa de la vacunación o de una infección anterior, y de la conversión de los reactores negativos en reactores positivos.

En el estudio no se observó esta relación pero en cambio se halló que si bien la inmensa mayoría de las cabras vacunadas con 899B, con un título de aglutinación en tubo menor de 1:40, resultaban infectadas con la cepa de confrontación, sólo dos de los animales con un título de 1:40 o superior estaban exentos de brucelas. Por el contrario, los animales vacunados con Rev. 1 mostraron en gran parte un elevado título de aglutinación ($\geq 1:40$) sin la presencia de

brucelas derivadas de la confrontación, mientras que sólo dos mostraron brucelas en presencia de un título menor de 1:40. Los resultados serológicos no bastan, decididamente, para juzgar el estado de infección de un animal; puede ocurrir que animales que experimenten un aumento del título sean negativos y que, en cambio, otros que no acusen ninguno, estén infectados.

Resumen

Cabras adultas fueron vacunadas con dos tipos de vacuna atenuada de brucela, Rev. 1, una mutante no dependiente de la estreptomycinina tomada de una población de *Br. melitensis* dependiente de estreptomycinina, y 899B, una cepa lisa atenuada por medio de

varios centenares de transferencias en medio de agar que contenía bilis de buey y sales biliares.

Las cabras se criaron en cautividad y subsecuentemente se confrontaron. La vacuna Rev. 1 resultó ser más eficaz al reducir los abortos e infecciones relacionados con brucelas en las cabras jóvenes y la infección en las cabras adultas. □

Agradecimientos

Los autores hacen constar su reconocimiento al Dr. S. S. Elberg y al Dr. L. Jones por la asistencia prestada en la planificación y estudio de este trabajo, así como al Dr. Godfrey Alton por la colaboración en el diseño de los experimentos y en la prueba de confrontación, y su análisis crítico del manuscrito.

REFERENCIAS

- (1) Cárdenas Lara, J. *Salud Pública México* 11: 635-639, 1969.
- (2) de la Garza, A. *Salubridad y Asist* 7:611-623, 1947.
- (3) Elizondo, L. IX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Higiene, 1955.
- (4) Galván C., Salvador. *Bol Epidem* 20:86-91, 1956.
- (5) Ortiz Mariotte, C. *Bol Epidem México* 20: 113-125, 1956.
- (6) Elberg, S. y Faunce, W. K. *J Bact* 73:211-217, 1957.
- (7) Alton, G. G. *Brit Vet J* 115:251-260, 1959.
- (8) Alton, G. G. *Res Vet Sci* 2:232-239, 1961.
- (9) Alton, G. G. *J Comp Path* 76: 241-253, 1966.
- (10) Alton, G. G. *J Comp Path* 78:173-178, 1968.
- (11) Elberg, S. S. *Bull WHO* 20:1033-1052, 1959.
- (12) Jones, L. M., et al. *J Comp Path* 68:275-287, 1958.
- (13) Morgan, W. J. B., et al. *Bull WHO* 34:33-40, 1966.
- (14) León, A. P. *Rev Inst Sal Pública (México)* 26:215-234, 1966.
- (15) León, A. P. *Rev Inst Sal Pública (México)* (En prensa).
- (16) Macpherson, J. W. y Penner, P. *Canadian J Comp Med Vet Sci* 31:271-274, 1967.
- (17) Herzberg, M. y Elberg, S. L. *J Bact* 69:432-435, 1955.
- (18) Zobell, C. E. y Zobell, M. H. *J Infect Dis* 50:538-541, 1932.
- (19) Kuzdas, C. D. y Morse, E. V. *J Bact* 66: 502-504, 1953.
- (20) Entessar, F., et al. *J Comp Path* 77:367-376, 1967.
- (21) Jones, L. M., et al. *J Comp Path* 74:17-30, 1964.
- (22) Orlov, E. S. et al. *Trude vses. Inst eksp Vet* 31:3-7, 1965.
- (23) Elberg, S. S. y Meyer, K. F. *Bull WHO* 19: 711-724, 1958.
- (24) Ne'eman, L. *Refuah Vet* 25:265-269, 1968.
- (25) Elberg, S. S. y Faunce, W. K. *Bull WHO* 26: 421-436, 1962.
- (26) Szyfres, B., et al. *Zoonos Res* 1:145-153, 1962.
- (27) León, Alberto P. y Cano, C. "Antígeno artificial anti-brucella: sus propiedades inmunológicas". *Rev Inst Salub Enferm Trop XVIII* (2), 1958.
- (28) Alton, G. G. y Elberg, S. S. *J Comp Path* 77:293-300, 1967.
- (29) Alton, G. G. y Elberg, S. S. *The Vet Bull* 37, 1967.
- (30) Alton, G. G. y Jones, L. M. *Laboratory techniques in brucellosis*. Organización Mundial de la Salud, Series de Monografías No. 55.

Comparison of the efficacy of two attenuated live vaccines against caprine brucellosis in Mexico (Summary)

Adult female goats were vaccinated with two types of attenuated brucella vaccine; Rev. 1, a non-streptomycin dependent mutant from a population of streptomycin-dependent *Br. melitensis*, and 899B, a smooth strain attenuated by several hundred transfers on agar medium

containing ox bile or bile salts. The goats were bred and subsequently challenged. Rev. 1 vaccine was the more effective vaccine in reducing brucellae-associated abortions and infection in kids, and infection in the adult females.

Comparação da eficácia de duas vacinas vivas atenuadas contra a brucelosis caprina no México (Resumo)

Cabras adultas foram vacinadas com dois tipos de vacina atenuada de brucela, Rev. 1, uma mutante não dependente da estreptomicina tomada de uma população de *Br. melitensis*, dependente de estreptomicina, e 899B, uma cêpa lisa atenuada por meio de várias

centenas de transferências em meio de agar contendo bilis de boi e sais biliares.

As cabras foram criadas em cativeiro e subsequentemente confrontadas. A vacina Rev. 1 resultou ser mais eficaz ao reduzir os abortos e infecções relacionadas com brucelas nas cabras jovens e infecção nas cabras adultas.

Etude comparée de l'efficacité de deux vaccins vivants atténués contre la brucellose caprine au Mexique (Résumé)

Des caprins adultes femelles ont été vaccinés avec deux types de vaccin atténué de brucella: le vaccin Rev. 1, un mutant non dépendant de la streptomycine, prélevé sur une population de *Br. melitensis* dépendant de la streptomycine, et le 899B, une souche unie atténuée au moyen de plusieurs centaines de transferts sur un milieu d'agar contenant de la bile de boeuf ou des sels biliaires.

Les caprins femelles ont été élevés en captivité et comparés par la suite. Le vaccin Rev. 1 a été le vaccin le plus efficace pour réduire le nombre d'avortements et d'infections se rattachant à la présence de brucellas chez les jeunes caprins femelles et d'infections chez les caprins femelles adultes.