

31_Salud Animal

Curva de anticuerpos en cabras vacunadas con *Brucella melitensis* Rev-1: resultados preliminares

Monzón, Nolly María; Cipolini, María Fabiana; Lottero Lanari, Eduardo; Martínez, Diana Elina; Robles, Carlos Alejandro
Universidad Nacional del Nordeste

Resumen

La Brucelosis caprina es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, producida por *Brucella melitensis*. Esta bacteria tiene al ovino y caprino como huéspedes naturales, pero al ser la *Brucella* spp más inespecífica del género puede infectar una gran cantidad de otras especies animales, entre ellas al ser humano. El objetivo del trabajo fue evaluar la evolución de los títulos de anticuerpos en cabras (con previo diagnóstico negativo a brucelosis) vacunadas por diferentes vías de administración con *B. melitensis* Cepa Rev-1. El ensayo de vacunación de Brucelosis en caprinos se realizó en un establecimiento ubicado en la localidad de Empedrado, Corrientes con 58 animales de raza Boer, de 3-5 meses de edad. Los mismos fueron divididos en tres (3) grupos homogéneos de los cuales, el Grupo 1 fue vacunado de forma Conjuntival, el Grupo 2 - Subcutáneo, y el Grupo 3 el Testigo. A continuación se realizó un muestreo seriado de los tres grupos los días: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 75, 90, 120, 150 y que continua hasta el día 360 de iniciado el estudio. La técnica diagnóstica utilizada para el seguimiento serológico fue ELISA indirecto desarrollado por el INTA Bariloche. Ambas vías de administración evidencian respuesta humoral positiva entre los días 14 y 75 post vacunal, medible por la técnica de ELISA indirecto. Al día 75 postvacunación ambos grupos manifestaron Porcentajes de Positividad (PP) menores al 30%, por lo que deberían dejar de interferir en los diagnósticos serológicos de rutina. Se concluye que la técnica de ELISA indirecto se muestra como un diagnóstico serológico efectivo para determinar el estatus sanitario en animales vacunados con *B. melitensis* Rev-1, pasados los 75 días postvacunación.

Palabras clave: brucelosis, serología, enzimoimmunoensayo

Introducción

La Brucelosis caprina es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, producida por *Brucella melitensis*. Esta bacteria tiene al ovino y caprino como huéspedes naturales, pero al ser la *Brucella* spp más inespecífica del género puede infectar una gran cantidad de otras especies animales, entre ellas al ser humano. La brucelosis afecta fundamentalmente a caprinos sexualmente maduros. En las hembras los principales signos clínicos son el aborto en el último tercio de gestación, retención de placenta y nacimiento de cabritos débiles o natimortos. En los machos la infección se manifiesta por inflamación de testículos, epidídimo y vesículas seminales y semen de mala calidad (Alton, 1990). La principal fuente de contagio en caprinos y ovinos se debe a la ingestión de forrajes y agua contaminados por fetos abortados, envolturas fetales y secreciones vaginales. Estos productos pueden contener entre 10^{10} a 10^{13} bacterias/gramo (Crespo León, 1994). La presencia de caprinos infectados con *Brucella melitensis* en los hatos o majadas implica un alto riesgo de infección para las familias que se dedican a este tipo de producción por encontrarse en contacto con los animales enfermos, así como también es riesgoso para las poblaciones vecinas por consumo de leche y quesos no pasteurizados (Ministerio de Salud de la Nación, 2013). Existe una gran variedad

de pruebas serológicas para diagnosticar la brucelosis en caprinos. En Argentina las pruebas serológicas oficiales se clasifican en grupos de acuerdo al tipo de reacción que ocurre durante la ejecución de la técnica: 1) Aglutinación: dentro de ellas podemos mencionar a la Aglutinación rápida en placa con Antígeno Bufferado (BPA), la Aglutinación lenta en tubo (SAT) y Aglutinación lenta en tubo con 2-mercaptoetanol (2ME), 2) Referencia Internacional: Fijación de Complemento y 3) Nuevas Generación (de unión primaria): Fluorescencia polarizada (FPA) y Enzimoimmunoensayos (ELISAs) (SENASA, 2002; Nicola y Elena, 2009). Todas las pruebas mencionadas presentan el inconveniente de no poder diferenciar anticuerpos vacunales de aquellos generados por infección natural durante un tiempo determinado, siendo más prolongado en los grupos 1 y 2. Para el control de la enfermedad en pequeños rumiantes, se cuenta con una vacuna viva, efectiva, denominada *Brucella melitensis* Rev-1, la cual es recomendada por OIE (2016). La misma debe ser aplicada a las categorías jóvenes, de 3-5 meses de edad por vía conjuntival o subcutánea. La dosis estándar debe estar comprendida entre 0.5×10^9 a 2×10^9 organismos viables. La inmunidad conferida es aceptable pero presenta el problema que interfiere con las técnicas diagnósticas durante un tiempo determinado, generando resultados falsos

positivos (Fensterbank y col., 1982), por lo que se recomienda vacunar hasta los 5 meses de edad (OIE, 2016), o en forma masiva a todos los animales del hato cuando la prevalencia es alta o si se quiere inmunizar a todo el hato de manera inmediata. La vacunación subcutánea genera respuestas serológicas fuertes y duraderas, a diferencia de la vía conjuntival cuya respuesta es un poco más débil y de corta duración, tal cual lo expuesto por Fensterbank y col. (1982) que demostró que utilizando la vía subcutánea, la interferencia alcanzaba los 17 meses, en cambio con la vía intraconjuntival la interferencia llegaba hasta los 4 meses postvacunación, siempre utilizando los diagnósticos serológicos de Aglutinación, Rosa de Bengala y Fijación de Complemento. Es por ello, la importancia de determinar a partir de cuándo las nuevas técnicas serológicas como el ELISA indirecto y la FPA, tienen la capacidad de diferenciar animales vacunados de aquellos infectados naturalmente. Recientemente el SENASA ha aprobado la Resolución N°372/2017 que instituye el control obligatorio de la brucelosis caprina en todo el país. Dicha resolución establece un marco legal para el control de la enfermedad, habilitando el uso de varias técnicas diagnósticas y a su vez, establece la necesidad de generar datos epidemiológicos acerca de la enfermedad

en las regiones donde los datos son insuficientes. Si bien la técnica de ELISA ha sido validada para su uso en caprinos, la OIE recomienda estandarizar el uso de este tipo de diagnósticos en cada región donde serán aplicados de rutina, por lo tanto para poder llevar adelante los diagnósticos serológicos aprobados por SENASA, es necesario evaluar el comportamiento de las técnicas diagnósticas en caprinos de la región NEA, buscando los puntos de corte óptimos que permitan diferenciar animales positivos y negativos, y de acuerdo con lo estandarizado, determinar la prevalencia de la enfermedad en la región

Objetivos

Evaluar la evolución de los títulos de anticuerpos en cabras (con previo diagnóstico negativo a brucelosis) vacunadas por diferentes vías de administración con *B. melitensis* Cepa Rev-1.

Materiales y Métodos

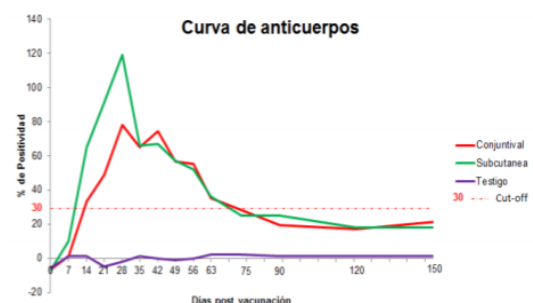
El ensayo de vacunación de Brucelosis en caprinos se realizó en un establecimiento ubicado en la localidad de Empedrado, Corrientes con 58 animales de raza Boer, provenientes de una cabaña sin registro serológico ni clínico de brucelosis. Los animales fueron confinados en corrales durante todo el ensayo. Los mismos fueron divididos en tres (3) grupos

homogéneos de los cuales, el Grupo 1 fue vacunado de forma Conjuntival, el Grupo 2 - Subcutáneo, y el Grupo 3 el Testigo. A continuación se realizó un muestreo seriado de los tres grupos los días: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 75, 90, 120, 150 y que continua hasta el día 360 de iniciado el estudio. La vacuna utilizada fue OCUREV®, importada desde España y proporcionada por SENASA, con la cual se instiló un gota en cada animal del grupo Intraconjuntival, y una dosis diluida en diluyente de cepa 19 en una proporción 1/50 de 2 ml vía Subcutánea a los animales del grupo 2. La técnica diagnóstica utilizada para el seguimiento serológico fue ELISA indirecto desarrollado por el INTA Bariloche, que midió los anticuerpos generados por la vacuna en el periodo de 6 meses. Esta técnica consiste en 5 pasos: 1) Pegado del antígeno a la microplaca de ELISA, 2) Agregado de sueros controles y sueros problemas, incubación (27°C durante 60 minutos bajo agitación constante) 3) Adición del conjugado (Proteína A/G recombinante), incubación (27°C durante 60 minutos bajo agitación constante) 4) Agregado del Sustrato-Cromógeno e incubación (27°C durante 8-10 minutos bajo agitación constante) 5) Lectura en equipo de absorbancia. Los resultados de los sueros control y problema, fueron expresados como Porcentaje de Positividad (PP) de la densidad óptica

producida por cada suero problema respecto a la media de la densidad óptica producida por el suero control positivo fuerte. El software utilizado fue el programa SPEIA desarrollado por el Animal Disease Research Institute, Canadá.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos a partir de la medición de los anticuerpos postvacunales hasta el día 150 en ambos grupos tratados y el grupo control se muestran en la figura 1. Figura 1. Curva de anticuerpos en 3 grupos de cabras inoculadas con *B. melitensis* cepa Rev.1, desde los 0 a los 150 días post-vacunación.



Los resultados obtenidos por medio de la técnica de ELISA Indirecto, permiten comprobar la generación de anticuerpos luego de la inoculación de la vacuna *B.melitensis* Rev-1, tanto en el grupo subcutáneo como en el conjuntival. Los datos mostrados en el gráfico 1, son el resultado de un promedio obtenido teniendo en cuenta lo resultante por animal, por grupo y por día de muestreo.

Utilizando un punto de corte de 30% para la técnica realizada, se puede observar que los animales del grupo testigo se mantuvieron por debajo del mismo hasta el último día de muestreo (día 150), manteniendo su condición durante todo el ensayo.

Con respecto a los animales de los grupos vacunados, ambas curvas comienzan su elevación a partir del día 7 postvacunal, y se detectan picos de máxima producción de anticuerpos en el día 28 donde el promedio para el grupo Conjuntival fue de 78PP y 119PP para el grupo Subcutáneo. Al día 75 postvacunación ambos grupos manifestaron $PP < 30\%$, por lo que deberían dejar de interferir en los diagnósticos serológicos de rutina, de igual forma que lo reportado por Díaz Aparicio y col. (1994) quienes realizaron un ensayo vacunal en cabras (3-6 meses de edad) con Rev-1 y testeos serológicos correspondientes y demostraron que a los 60 días postvacunación, los animales resultaban negativos a la prueba de ELISA.

A su vez, Fensterbank y col. (1982) propone que la administración de la vacuna utilizando diferentes vías, como la parenteral (inyectable) y la conjuntival, tendrían diferentes comportamientos en lo referente a la duración de los anticuerpos vacunales post-aplicación, pero de acuerdo a los resultados preliminares que se están obteniendo en este ensayo,

ambas vías de administración evidencian respuesta humoral positiva entre los días 14 y 75 post vacunal, medible por la técnica de ELISA indirecto.

En cambio, Giraudo y col. (2009), llevaron adelante un ensayo con Rev-1 aplicando a grupos de cabrillonas y a cabras adultas, utilizando las vías Intraconjuntival y Subcutánea, y los resultados serológicos obtenidos determinaron que la vía subcutánea y el grupo conformado por animales adultos, mantuvieron durante mayor tiempo la respuesta positiva frente al diagnóstico de rutina. Los anticuerpos generados por la vacuna no pueden ser distinguidos por los inducidos por una infección con cepa silvestre, por lo que los resultados de las pruebas diagnósticas deben ser interpretados en función del estado de vacunación del hato. (OIE, 2004, Marín y col., 1999).

Conclusiones

Se concluye que la técnica de ELISA indirecto se muestra como un diagnóstico serológico efectivo para determinar el estatus sanitario en animales vacunados con B. melitensis Rev-1, pasados los 75 días postvacunación.

Bibliografía

-Alton, G.G. (1990) *Brucella melitensis*. En: Animal Brucellosis, Ed. por Nielsen y Duncan. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. -Díaz-Aparicio, E.; Marín, C.;

AlonsoUrmeneta, B.; Aragón, V.; PérezOrtíz, S.; Pardo, M.; Blasco, J. M.; Moriyón, I. (1994) Evaluation of Serological Tests for Diagnosis of Brucella melitensis Infection in Goats. Journal of Clinical Microbiology. 32 (5), 1159-1165. - Fensterbank, R.; Pardon, P.; Marly, J. (1982) Comparison between Subcutaneous and Conjunctival Route of Vaccination with Rev-1 Strain against Brucella melitensis infection in ewes. Ann. Rech. Vét. 13 (4), 295- 301. -Giraudó, J.; Magnano, G.; Schneider, M.; Macías, A.; Sticotti, E.; Macio, M.; Bergamo, E.; Perez Zavala, V.; Zanella, F.; Combina, E. (2009) VI Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica, Mar del Plata, Argentina. -Marín, C. M.; Moreno, E.; Moriyón, I., Díaz, R.; Blasco, J. M. (1999) Performance of Competitive and Indirect Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays, Gel Immunoprecipitation with Native Hapten Polysaccharide, and Standard Serological Tests in Diagnosis of Sheep Brucellosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 269-272. - Ministerio de Salud de la Nación. (2013) Enfermedades Infecciosas Brucelosis Diagnóstico de Brucelosis, Guía para el equipo de salud. Extraído de: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guiamedica-brucelosis.pdf> - i o a ena an a e ia n sti o sero i o e a brucelosis bovina SENASA. Laboratorio de Referencia de OIE para

brucelosis. Argentina. -Resolución N°150. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentario, Buenos Aires, Argentina, 06 de febrero de 2002. -Resolución N°372-E. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentario, Buenos Aires, Argentina, 09 de junio de 2017. -Software SPEIA – Animal Disease Research Institute. Canadá -World Organization for Animal Health (OIE). (2004) Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis). OIE Terrestrial Manual. -World Organization for Animal Health (OIE). (2016) Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis) (Infection with B. abortus, B. melitensis and B. suis). OIE Terrestrial Manual.

