



VACUNACION EN TERNERAS CON UNA CEPA MUTANTE DE BRUCELLA ABORTUS Y DESAFIO DURANTE LA GESTACION CON B. ABORTUS 2308: VIABILIDAD DE TERNEROS Y AISLAMIENTOS BACTERIOLOGICOS

Fiorentino^{1*} A, Paolicchi¹ F, Campero¹ C, Malena¹ R, Campos² E, Arese² A, Cravero² S, Rossetti² O.

¹Grupo de Sanidad Animal, INTA, CC 276. (7620) Balcarce, Argentina. *Becaria Doctoral CONICET, mafioentino@balcarce.inta.gov.ar

²Instituto de Biotecnología, CICVyA, Buenos Aires. Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el grado de protección de una cepa mutante de *Brucella abortus* S19 (MS19) en hembras bovinas. Se seleccionaron 41 terneras, no vacunadas y seronegativas a brucelosis. A los 6-8 meses de edad se dividieron en: grupo A (n=14) vacunadas con cepa S19; grupo B (n=11) vacunadas con cepa MS19; grupo C (n=12) y grupo D (n=4) controles sin vacunar. A los 15-17 meses de edad las vaquillonas fueron servidas y a los 5 meses de preñez se desafiaron las vacunadas y 12 controles vía conjuntival con 100µl de una suspensión de 5x10⁷ bacterias/ml *B. abortus* 2308. Las vaquillonas del grupo D fueron vacunadas a los 5 meses de preñez con MS19. Los grupos fueron separados al momento del desafío. Iniciados los abortos/pérdida de terneros, se obtuvieron muestras de: líquido de abomaso y pulmón de fetos/terneros no viables y de mucus cérvico-vaginal y calostro de las madres. Finalizada la parición, los terneros logrados fueron: grupo A 11/14 (78.6%); grupo B 5/11 (45.5%); grupo C 3/12 (25.0%), grupo D 4/4 (100%). Todas las hembras del grupo B eliminaron *B. abortus* 2308 en las secreciones analizadas. Estos resultados indican que bajo estas condiciones, la cepa MS19 no provee una adecuada protección. Futuros ensayos deberían realizarse con el fin de investigar la utilidad de MS19 como cepa vacunal.

SUMMARY

The purpose of the present work was to evaluate the protection rate of a mutant strain *Brucella abortus* S19 (MS19) in bovine female. Forty one female calves, non vaccinated and seronegative to brucellosis. At 6-8 months old were grouped in: group A (n=14) vaccinated with strain S19; group B (n=11) vaccinated with strain MS19; group C (n=12) and group D (n=4) non-vaccinated control. At 15-17 months age, heifers were naturally service and at 5 months of pregnancy all the vaccinated heifers and 12 controls were conjunctively challenged with 100µl of 5x10⁷ viable cells/ml of *B. abortus* 2308. Heifers of group D were vaccinated at 5 months of pregnancy with MS19. Groups were separated at challenge time. When abortion/perinatal losses started, samples were taken from: abomasal fluid and lung of fetuses and cervico-vaginal mucus and colostrum of dams. At the end of calving season, calves obtained were: group A 11/14 (78.6%); group B 5/11 (45.5%); group C 3/12 (25.0%), group D 4/4 (100%). All females of group B shed *B. abortus* 2308 in the secretions analyzed. These results suggests that under conditions of this trial, strain MS19 do not provide adequate protection. Further works should be done in order to clarify the potential role of this vaccine candidate strain.

INTRODUCCION

Brucella abortus es el agente causal de la brucelosis bovina. Esta enfermedad considerada la causa más frecuente de abortos en Argentina (Campero et al., 2003). Se estima que entre un 10 a 13% de los establecimientos están infectados y la tasa individual es del 2 al 5%. A partir de 1998, con la diferenciación de precio para la leche proveniente de tambos libres de brucelosis, se observa una disminución de la prevalencia de la enfermedad en esta categoría (prevalencia individual entre 2 y 2,5%) (Samartino, 2002). La vacunación de terneras entre los 3 y 8 meses de vida con la cepa de *B. abortus* S19 es obligatoria en nuestro país. Esta vacuna confiere un 70% y 55% de protección contra el aborto e infección, respectivamente (Alton, 1978). Existen pese a ello algunas limitaciones sobre su uso dada la persistencia de títulos serológicos en animales vacunados a mayor edad (Brincley Morgan and Mackinnon, 1979; Herr et al., 1982), riesgo de infección humana (Alton et al., 1988), que el desarrollo de nuevos inmunógenos. Mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante se obtuvo una cepa mutante de *B. abortus* S19 (MS19). Dicha cepa posee mutaciones que afectan a dos proteínas, una de 26 kDa (BP26) y otra de 18 kDa (BMP18), de las cuales se desconoce su función biológica (Campos et al., 2002). La proteína BP26 es reconocida en los sueros de bovinos infectados y, en mucho menor grado, por sueros de bovinos vacunados (Rossetti et al., 1996). La ausencia de anticuerpos contra dicha proteína en los sueros de animales vacunados con esta cepa mutante, permitiría discriminarlos de los animales infectados con las cepas de campo. Por otro lado, la falta de expresión de la proteína BMP18 en la cepa vacunal MS19 hace que la misma resulte más atenuada que la S19. En ratones esta cepa mutante confirió una protección semejante a la otorgada por la *B. abortus* S19 ante el desafío con *B. abortus* 2308 (Campos et al., 2002). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el grado de protección de esta cepa mutante MS19 mediante la vacunación en terneras y posterior desafío con una cepa patógena de *B. abortus* durante la gestación.

MATERIALES Y METODOS

Animales, vacunación y servicio

Se seleccionaron 41 terneras Aberdeen Angus, Hereford o sus cruza, provenientes de un rodeo seronegativo de las Reservas ganaderas del INTA, Balcarce, Argentina, de 2 a 4 meses de edad, no vacunadas contra brucelosis y serológicamente negativas a la enfermedad. A la edad de 6-8 meses fueron agrupadas a saber: grupo A (n=14) vacunadas con cepa S19 comercial por vía subcutánea (sc) con 2 ml de una suspensión de 2x10¹⁰ unidades formadoras de colonias (UFC); grupo B (n=11) inmunizadas por igual vía, volumen y concentración de UFC que las del grupo A pero con la cepa mutante MS19; grupo C (n=16) terneras controles sin vacunar. A los 15-17 meses de vida, las vaquillonas fueron servidas en forma natural durante 45 días con 4% de toros sanos provenientes de rodeos libres de brucelosis. Una vez confirmada la preñez, todas las vaquillonas se mantuvieron



juntas en un lote de pastura artificial con buena disponibilidad y bajo observación diaria hasta el momento del desafío.

Técnicas de laboratorio, desafío

Cuando las vaquillonas alcanzaron los 5-6 meses de preñez, se desafiaron todas las vacunadas y a 12 de las controles, mediante instilación por vía conjuntival con 100 µl de una suspensión de 5×10^7 bacterias/ml con la cepa B. abortus 2308. Cuatro animales controles sin vacunar (Grupo D) fueron vacunados en esta instancia con la cepa mutante MS19 por vía sc con 2 ml de una suspensión de 3×10^{10} UFC, estos animales no fueron desafiados con la cepa 2308 de B. abortus.

Post desafío los grupos de animales se separaron en potreros independientes hasta finalizada la parición realizando observaciones diarias (4 veces por día).

Al momento del aborto o nacimiento de terneros, se obtuvieron muestras de mucus cérvico-vaginal (MCV) y calostro materno (punción de la glándula mamaria a nivel de la cisterna con tubos Vacutainer® para cultivo bacteriológico. Cuando fue factible, se recolectaron muestras de placentas, fetos/terneros prematuros no viables para aislamiento de B. abortus (líquido de abomaso, pulmón, bazo y placentomas). Los tejidos fueron cultivados en placas de agar sangre Columbia y agar Skirrow e incubadas a 37°C en atmósfera con 10% de CO₂ y observadas cada 48 hs durante 7 días, en busca de colonias sospechosas de B. abortus identificándose las colonias adecuadamente (Alton et al., 1988, Terzolo, 1991). En forma similar, dicho material fue procesado para el diagnóstico de otros patógenos de la reproducción (Campe-

ro et al. 2003). Si bien los fetos o natimortos fueron procesados mediante técnicas de necropsia e histológicamente, dicha información no se presenta en este trabajo. Las pruebas realizadas para la el diagnóstico serológico de brucelosis fueron: Buffer Plate Antigen (BPA), Seroaglutinación en tubo (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2-ME) (SENASA, 1995).

RESULTADOS

Todas las vaquillonas utilizadas en este estudio fueron serológicamente libres de evidencia de brucelosis al momento de la vacunación, no observándose reacciones adversas locales y/o generales, ocasionadas por la vacunación. Todos los animales inmunizados desarrollaron respuesta serológica postvacunación a las pruebas realizadas, los títulos desaparecieron al momento del desafío con B. abortus 2308. Luego de desafiadas, todas las vaquillonas vacunadas y 11/12 de las controles presentaron serología positiva denotando respuesta inmune a la infección con la cepa virulenta B. abortus 2308 (datos no presentados). A partir de los 30 días post desafío se observaron abortos (Tabla 1), nacimientos de terneros prematuros, muertes perinatales en cada grupo experimental.

En el grupo C, una de las vaquillonas no presentó evidencia de infección por *Brucella abortus* postdesafío, las pruebas serológicas fueron negativas, parió en la fecha prevista un ternero normal y los cultivos bacterianos de calostro y MCV fueron negativos a dicha bacteria.

Los aislamientos de B. abortus a partir de fluidos mater-

Tabla 1: Pérdidas reproductivas y terneros logrados en cada grupo finalizada la parición

Grupos	N° de vaquillonas	Terneros logrados	Pérdidas reproductivas	
			Abortos	Prematuros y muertes perinatales
A: vacunadas con S19	14	11 (78.6%)	0	3
B: vacunadas con MS19	11	5 (45.5%)	1	5
C: controles sin vacunar	12	3 (25.0%)	2	7
D: controles vacunadas MS19 en la gestación	4	4 (100.0%)	0	0

Tabla 2: Aislamientos de B. abortus 2308 de fetos y vacas abortadas o con terneros no viables

Grupos	MCV	Calostro	Pulmón-Bazo	Líqu. de abomaso
A	2/3	1/3	1/3	1/3
B	6/6	4/6	4/6	2/3
C	9/9	8/9	9/9	5/8

Tabla 3: Eliminación de *B. abortus* al momento del parto en vaquillonas con terneros viables

Grupos	MCV	Calostro	Aislamiento de <i>B. abortus</i>
A	4/11	3/11	Cepa 2308
B	5/5	3/5	Cepa 2308
C	0/1	0/1	S/A*
D	2/4	2/4	MS19

* S/A: sin aislamiento

nos y órganos fetales se detallan en las Tablas 2. En la Tabla 3 se detallan los aislamientos de *B. abortus* en fluidos maternos de vaquillonas con terneros viables.

DISCUSION

Se confirma que la dosis, vía de inoculación y el momento de la gestación de la cepa utilizada para el desafío fueron adecuados considerando los aislamientos y las pérdidas provocadas en el grupo control, en coincidencia con otros autores (Richard et al, 1987; Cheville et al, 1993). Los tejidos y fluidos seleccionados para el aislamiento bacteriológico de *B. abortus* fueron adecuados en concordancia con otros estudios (Richard et al, 1987, 1990). Considerando el elevado número de aislamientos a partir del calostro, se sugiere su incorporación en el diagnóstico de rutina de la brucelosis. Se confirma la presencia de resistencia natural a la enfermedad en 1/12 (8.3%) vaquillonas controles no vacunadas y desafiadas. En el presente trabajo, los porcentajes de protección contra el aborto y la infección en el grupo vacunado con S19 fueron levemente mayores a los descriptos por otros autores (Acha y Szyfres, 1986; Alton, 1978; 1986; Torioni de Echaide et al., 1988).

Las vaquillonas del grupo B tuvieron el mayor porcentaje de terneros no logrados y aquellas que lograron terneros viables, eliminaron *B. abortus* 2308 en al menos una de las secreciones muestreadas. Por ello se infiere que, bajo las condiciones de estudio, la protección contra la infección y el aborto no fue la adecuada. En cuanto al riesgo de utilización de la vacuna con MS19 en hembras preñadas con 5 meses de gestación, si bien no se produjeron abortos, 2/4 eliminaron la cepa vacunal al momento del parto (MCV y calostro). Futuros ensayos deberían realizarse a los fines de mejorar la protección lograda con el antígeno vacunal utilizado en el presente trabajo.

REFERENCIAS

- Acha P.N. y B. Szyfres. 1986. Bacteriosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y los animales. Segunda edición. OPS. E.U.A. p:14-36.
- Alton, G.G.. 1978. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. Aust Vet J. 54:551-557.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and J.M. Verger. 1988. The production of *Brucella abortus* vaccines. In: Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. Paris. p.:143-155.
- Bringley Morgan, W.J. and D.J. Mackinnon. 1979. Brucellosis. In: Fertility and Infertility in domestic animals. Edited by J. A. Laing. London. pp:186-189.
- Campero C.M., Moore D.P., Odeón A.C., Cipolla A.L. and E. Odriozola. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet Res Communications 27: 359-369.
- Campos E., Cravero S.L., Delgui L., Mora I., Khan N., Arese A.I. and O.L. Rossetti. 2002. *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 (Δbp26:luc (Δ)bmp18 double mutant lacking drug resistance markers. Vet Microbiol. 87: 1-13.
- Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen A.E., Tatum F.M. and S.M. Halling 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strain of *Brucella abortus*. Am J Vet Res. 54:1591-1597.
- Herr S., Roux D. and M. Pieterse. 1982. The reproducibility of results in bovine brucellosis serology and their correlation with isolation of *Brucella abortus*. Onderstepoort. J Vet Res. 49:79-83.
- Richard P.C., Adams L.G. and J.D. Williams. 1987. Relationship of fetal age at conjunctival exposure of pregnant heifers and *Brucella abortus* isolation. Am J Vet Res. 48: 755-757.
- Richard P.C., Adams L.G. and B.E. Richardson. 1990. Effect of dose of *Brucella abortus* strain 19 in yearling heifers on the relative risk of developing brucellosis from challenge exposure with strain 2308. Am J Vet Res. 51: 1837-1840.
- Rossetti, O.L., Arese, A.I., Boschioli, M.L. and S.L. Cravero. 1996. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. J Clin Microbiol. 34:165-169.
- Samartino, L. 2002. Brucellosis in Argentina. Vet Microbiol. 90: 71-80.
- SENASA. 1995. Manual de Procedimientos. Diagnóstico serológico de brucelosis bovina. (Res. 1269/93). mimeo, 66 pp.
- Terzolo H.R, Paolicchi F.A., Moreira A.R. and A. Homse. 1991. Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. Vet Rec. 129: 531-532.
- Torioni de Echaide, S., D.H. Aguirre y E.J.A. Späth. 1988. Respuesta serológica a la vacunación con *Brucella abortus* cepa 19 en bovinos *Bos taurus* (Hereford y Criolla) y *Bos indicus* (Nelore). Rev Med Vet. 69:28-33.