



EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA APLICACIÓN DE VACUNA RB 51 DE BRUCELLA ABORTUS EN BOVINOS PREVIAMENTE VACUNADOS CON CEPA 19.

*Di Lorenzo¹, C.; Diez, C.; Miceli, G.;
 Larsen, A.; Cabral, M.; Argenio,
 L y Romero, J.*

¹ Laboratorio de Inmunología - Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP – Argentina - Calle 60 y 118 (1900) La Plata.

RESUMEN

La interferencia diagnóstica de los anticuerpos séricos provocados por la vacunación de terneras fuera de término o la vacunación de adultos, junto a la sobrevaloración asignada a la vacunación en el control de la brucelosis bovina genera la permanente búsqueda de nuevas cepas vacunales. En el caso de la Cepa RB51 de *Brucella abortus*, el carácter rugoso originado por el proceso de selección utilizado y las mutaciones genómicas que posee, evitan la expresión de la cadena O del LPS, manteniendo sin embargo el perfil proteico común al género *Brucella*. Los bovinos pueden ser vacunados sin límites de edad manteniéndose la serología negativa a las pruebas de seroaglutinación estándar, incluso en los animales adultos. Los esquemas de vacunación recomendados incluyen varias estrategias posibles entre ellas: una dosis a terneras entre 4 a 10 meses de edad con revacunación entre los 12 y 16 meses, aceptándose también la revacunación de vaquillonas o adultos, previamente vacunados con cepa 19. El objeto de este trabajo fue determinar el posible recuerdo inmunológico generado con la aplicación de dos dosis de cepa RB51 a animales que previamente recibieron Cepa 19. Los resultados obtenidos demuestran que la aplicación posterior de dos dosis de cepa RB51 no interfiere con la memoria humoral generada por la vacunación con cepa 19 en terneras en un establecimiento libre de brucelosis.

INTRODUCCIÓN

La Brucelosis animal es una enfermedad que afecta varias especies domésticas y de la vida salvaje. Varias especies de *Brucella* pueden infectar al hombre constituyendo así una enfermedad zoonótica, altamente prevalente en los trabajadores rurales, de la industria frigorífica y médicos veterinarios. El género *Brucella* spp. está integrado por bacterias Gram negativas, de vida intracelular facultativa; situación que marca ciertas particularidades en torno a su patogénesis, respuesta inmune y consecuentes prácticas de control en las poblaciones animales afectadas. Los microorganismos se presentan según las distintas especies en forma lisa, rugosa o mucóide. Los organismos lisos (*Brucella abortus*, *Br. suis* y *Br. melitensis*) poseen moléculas de LPS que contienen una cadena polisacárida "O" mientras que el LPS de los organismos mucóides (*Brucella canis* y *ovis*) carece de esta cadena, compartiendo un LPS de tipo rugoso. La cadena-O, presente en la variedades de interés pecuario,

representa un antígeno inmunodominante capaz de inducir anticuerpos en la mayoría de los animales expuestos, indistinguibles de los presentes en la respuesta inmune humoral consecuente con la vacunación con cepa 19. Las pruebas serológicas denominadas clásicas tales como BPA, seroaglutinación en tubo y 2 Mercaptoetanol, se basan en la detección de anticuerpos dirigidos mayoritariamente contra esta cadena.

Los anticuerpos anti cadena-O que se desarrollan después de la infección ó después de la vacunación con cepa 19, poseen desde el punto de vista de la protección un valor relativo. La inmunidad que protege contra la infección es la inmunidad de tipo celular. Esta inmunidad se basa en la producción de Linfocitos T (CD4+) que se activan, produciendo interleuquinas (IL), entre ellas IL2, IL12, IL14 e interferón gama, con capacidad de activación macrofágica, entre otras.

Las características del género y su consecuente patogénesis, tal como ha sido referido mas arriba condiciona la selección de las características de los inmunógenos utilizados para su control. Las ventajas en la utilización de agentes vacunales vivos atenuados de *Brucella* spp radica en las características del estímulo antigénico generado en el hospedador, requeridas para la obtención de una sólida y permanente respuesta inmune celular, mediada por los linfocitos T de memoria.

La vacuna más exitosa que se ha utilizado para el control de la brucelosis bovina en el mundo es sin lugar a dudas la cepa 19 de *B. abortus*, organismo atenuado de morfología lisa. La presencia de cadena-O en la cepa 19, explica la seroconversión postvacunal que solo interfiere con el diagnóstico de la enfermedad cuando no es respetado el lapso adecuado para su aplicación, ubicado entre los 4 y 8 meses de edad. Se han evaluado vacunas con bacterias inactivadas, ó con fracciones antigénicas, sin embargo, su eficiencia ha sido baja, dada entre otras por las causas a las que se ha hecho referencia. La interferencia diagnóstica de los anticuerpos séricos de origen vacunal, provocados por la vacunación de terneras fuera de término o la vacunación de adultos, y la exagerada importancia asignada a la vacunación en el control sanitario, estimulo la búsqueda de nuevas cepas vacunales. Una cepa rugosa que se utilizó inactivada fue *B. abortus* cepa 45/20 sin mayores éxitos ni aceptación generalizada. Un adecuado grado de atenuación y el carácter rugoso de la cepa vacunal caracterizaron el desarrollo de la cepa RB 51, derivado originado a partir de *B. abortus* cepa 2308, mediante el cultivo y selección de mutantes frente a distintas concentraciones de Rifampicina y Penicilina. La cepa RB 51, por lo anteriormente expresado es resistente a la Rifampicina, condición que debe ser ampliamente difundida, dado que el tratamiento mas generalizado a nivel preventivo como curativo de la brucelosis en el hombre es a base de esta droga. El carácter rugoso originado por el proceso de selección utilizado y las mutaciones genómicas, (contiene por lo menos 2 mutaciones que interfieren con la síntesis y ensamblaje



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

de la cadena "O"), evitan la expresión de la cadena O del LPS, manteniendo sin embargo el perfil proteico común al género *Brucella*. La vacunación con RB51 no genera anticuerpos contra la cadena-O y por lo tanto, no interferiría con el diagnóstico serológico, pos vacunal. Los animales pueden ser vacunados sin límites de edad manteniéndose la serología negativa a las pruebas clásicas, incluso en adultos. La cepa RB51 es la vacuna oficial contra la brucelosis bovina en U.S.A. y su uso ya se ha implementado en varios países Latino-Americanos como Méjico, Chile, Colombia y Venezuela. La vacuna cepa RB51 protege al ganado bovino y a los cerdos contra la infección con *B.abortus* y *B.suis* respectivamente. El esquema de vacunación adoptado por estos países, es la vacunación de terneras entre 4 a 10 meses de edad con revacunación entre los 12 y 16 meses de edad ó previo al entore, aceptándose la revacunación de adultos evitando la vacunación de machos y hembras preñadas. No se han reportado interferencias al revacunar con cepa RB51 animales adultos que han sido vacunados con cepa 19 como terneras. Sin embargo, como contraparte se ha comunicado que la vacunación de ganado infectado con cepa RB51 no enmascara la infección, en otras palabras, los animales infectados seroconvierten. El objeto de este trabajo es el de establecer el grado de correspondencia entre los perfiles proteicos de *B.abortus* cepa 19 y *B.abortus* cepa RB51, con el fin de determinar el posible recuerdo inmunológico generado con la aplicación de dos dosis de RB51 a animales que previamente recibieron Cepa 19, tal cual se expresa como forma recomendada de aplicación en los países donde se utiliza esta última cepa en los programas de vacunación de terneras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la evaluación a campo se utilizaron 25 terneras, seronegativas, provenientes de un establecimiento libre de brucelosis, las que recibieron una dosis de vacuna B.Abortus Cepa 19 a los 6 meses de edad y dos dosis de RB 51, a los 12 y 18 meses respectivamente.

Perfil Proteico

Se realizaron las corridas electroforéticas en SDS-PAGE (Equipo Mini gel BioRad). Utilizando suspensiones sonicadas de ambas cepas vacunales, de origen comercial. Debidamente controladas desnaturalizadas a 95°C y tratados con buffer de muestra con 2 Me como agente reductor. Una vez finalizada (45 miliamper, 45 minutos), los geles fueron teñidos con Comassie Blue.

Determinación de la respuesta inmune humoral

Realizada mediante las pruebas de seroaglutinación: Buffer Plate Antigen (BPA), Seroaglutinación en tubo SAT) y 2 Mercaptoetanol(2Me).

Según el presente esquema:

- Sangrado N°1: al momento de la vacunación con cepa 19.
- Sangrado N°2: al momento de la vacunación con la primer dosis de cepa RB 51
- Sangrado N°3 : S3.1 a los 15 días pos vacunales

S3.2 a los 30 días pos vacunales

S3.3 a los 45 días pos vacunales

- Sangrado N°4 : S4.1 Al momento de la vacunación con la segunda dosis de RB51

S4.2 a los 15 días pos vacunales

S4.3 a los 30 días pos vacunales

RESULTADOS

Las muestras de suero obtenidas, en cada uno de los cuatro muestreos realizados resultaron negativas tanto después de la aplicación de la primera como de la segunda dosis de vacuna RB51. Solo 3 animales identificados como : Id 05, Id09, Id 12 resultaron positivos al BPA, presentando un título 1/25 a la prueba SAT, durante toda la experiencia.

Los perfiles proteicos obtenidos presentan un alto grado de correlación, la electroforesis de la Cepa 19 demostró una serie de 15 bandas comprendidas entre los 16 y 97 kDal. El perfil proteico obtenido de la cepa RB51 demostró la presencia de múltiples bandas agrupadas en 3 fracciones bien definidas comprendidas entre los 32 y 40 kDal ; 49 a 60 y 62 kDal. Las principales fracciones reconocidas por los Imunoglobulinas Ig G de animales vacunados con una dosis de *B.abortus* Rb 51 estuvieron comprendidas entre los pesos moleculares 45 y 66 kDal, principalmente. Esos mismos muestras aplicadas en el Westernblot realizado con *B.abortus* Cepa 19, reconocieron las mismas fracciones.

CONCLUSIONES

Si bien las mutaciones que posee la cepa RB 51 producen la falta de expresión de la cadena O del LPS Esta diferencia estructural no se traslada al perfil proteico de ambas cepas.

Las fracciones proteicas de membrana de la Cepa 19 descriptas hace años como correspondientes a las bandas I y II (Dubray 83), hoy identificadas y reclasificadas como Omp (Omp25, Omp31 Omp2a/Omp2b, Omp89,etc)

se encuentran en ambos patrones proteicos y su falta de reactividad antigénica a modo de rappel ante la aplicación de dos dosis de RB 51 podría explicarse por la imposibilidad de expresión de estas fracciones en los cepas lisas, por la interferencia de tipo espacial o de tipo esterico que la cadena O ejerce sobre ellas estructuralmente. Tal como se demostrara en el modelo ratón, con anticuerpos monoclonales.

SUMMARY

The diagnostic interference of the serum antibodies, caused by the vaccination of cattle outside of finish or the vaccination of adults, and the importance assigned to the vaccination in the control of the bovine brucellosis generated the permanent search of new vaccine. In the case of the strain RB51 of *Brucella abortus*, your rough



character originated by the used selection process and the genomic mutations produced the lack possesses the expression of the chain O on the LPS, maintaining the protein profile however common to *Brucella* spp. The animals can be vaccinated without you limit of age maintain the negative serologic to the classic tests, even in adults. The vaccination outlines include several strategies a dose to calves among 4 to 10 months of age with revaccination between the 12 and 16 months, being accepted too the heifers revaccination or adults previously vaccinated with strain 19. The object of this work was determining the possible immunology memory generated with the application of two doses from strain RB51 to animals that previously received strain 19. The obtained results demonstrate that the later application of two RB51 dose doesn't interfere with the humoral memory generated by the vaccination with strain 19 in calves in herd free of brucellosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alton, G. G., L. M. Jones, R. D. Angus, & J. M. Verger, 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
2. Allardet-Servent, A., G. Bourg, M. Ramuz, M. Pages, M. Bellis, & G. Roizes 1988. DNA polymorphism in the strains of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, 170: 4603-4607
3. Bricker, B. J. & S. M. Halling, 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 2660-2666
4. Cloeckaert, A., J. M. Verger, M. Grayon & O. Grépinet. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, 141: 2111-2121.
5. Cloeckaert, A., J. M. Verger, M. Grayon, & N. Vizcaino. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 1-8.
6. Corbel M. J. & W. Brinley-Morgan. J. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Holt JG, editor. *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 1. Baltimore (MD) Williams and Wilkins, 377-388
7. Corbel, M. J. *Microbiology of the genus Brucella*. En: Young EJ, Corbel MH, editors. *Brucellosis; clinical and laboratory aspects*. Boca Ratón. CRC Press Inc., 1989, pag. 54-72
8. Ficht, T. A., S. W. Bearden, B. A. Sowa, & H. Marquis. 1990. Genetic variation at the omp2 porin locus of the *Brucellae* species-specific markers. *Mol. Microbiol.*, 4: 1135-1142
9. Huerta-Peña M. & A. López-Merino. 1989. Clasificación de las cepas de *Brucella* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Brucelosis del INDRE. *Rev Lat-amer Microbiol* 31: 195 - 198
10. Joint FAO/WHO 1986. Expert Committee on Brucellosis. Six Report. World Health Organ Tech Rep Ser No 740. Geneva: World Health Organization
11. World Health Organization. 1998. The Development of new /Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting.