



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE DE BOVINOS
FRENTE A LA VACUNACION CON *BRUCELLA ABORTUS* CEPA RB51

CATHERINE ANDREA ROJAS JIMÉNEZ

Memoria para optar
al Título Profesional
de Médico Veterinario.
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

Financiamiento : IFS B/1800-2

PROFESOR GUIA : Dr. PEDRO ABALOS P.

SANTIAGO – CHILE

2005

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE DE BOVINOS
FRENTE A LA VACUNACION CON *BRUCELLA ABORTUS* CEPA RB51

CATHERINE ANDREA ROJAS JIMÉNEZ

Memoria para optar
al Título Profesional
de Médico Veterinario.
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

NOTA FINAL :

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : DR. PEDRO ABALOS
PROFESOR CONSEJERO : DR. LUIS MORAGA
PROFESOR CONSEJERO : DR. ULISES VERGARA

SANTIAGO – CHILE

2005

TABLA DE CONTENIDOS

I RESUMEN	4
II SUMMARY	6
III INTRODUCCION	8
IV REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 Generalidades de brucelosis bovina.....	10
4.2 Agente causal.....	11
4.3 Estructura de <i>Brucella</i>	12
4.4 Transmisión	13
4.5 Etiopatogenia y patología	14
4.6 Situación nacional y control	16
4.7 Vacunas usadas	17
4.7.1 Cepa 19.....	18
4.7.2 Cepa RB51	19
4.8 Diagnóstico	19
V HIPOTESIS DE TRABAJO	23
VI OBJETIVO GENERAL	23
VII OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
VIII MATERIAL Y METODOS	24
8.1. Animales.....	24
8.2. Muestreo.....	24
8.3. Detección de respuesta inmune humoral.....	25
a. Pruebas tradicionales	25
b. Pruebas no tradicionales.....	25
8.4. Detección de la respuesta inmune celular.....	27
8.5. Análisis de los resultados.....	28
IX RESULTADOS	30
9.2 Respuesta humoral a proteínas citosólicas de <i>Brucella</i>	32
9.3 Respuesta celular a proteínas citosólicas de <i>Brucella</i>	33
X DISCUSIÓN	34
XI CONCLUSIONES	37
XII BIBLIOGRAFÍA	38

I RESUMEN

La Brucelosis bovina es una enfermedad que ha llevado a los distintos países a establecer estrategias de control y prevención de la enfermedad. En Chile las estrategias establecidas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) son vigilancia, saneamiento y prevención en el ganado bovino. Esta última medida consiste en la vacunación con *B. abortus* cepa RB51. La ventaja de esta cepa es que no produce interferencia diagnóstica con pruebas que utilizan el lipopolisacárido liso (s-LPS) como antígeno.

El presente estudio caracterizó la respuesta inmune humoral y celular generada en el ganado bovino vacunado con esta cepa. Para esto se contó con un grupo de 25 terneras las cuales fueron vacunadas con $1-3 \times 10^{10}$ UFC de *B. abortus* RB51, entre la edad de 4 y 8 meses. Estas fueron mantenidas y manejadas en su rebaño durante el período de estudio en el cual se realizaron cuatro muestreos los días 0, 30, 180 y 360 post vacunación, recolectando dos muestras de sangre de cada animal una con y otra sin anticoagulante (heparina de sodio). Las muestras obtenidas fueron procesadas en cinco pruebas diagnósticas distintas y éstas son: rosa de bengala, ELISA indirecto, ELISA competencia las cuales detectan la respuesta inmune humoral al s-LPS de *Brucella*. También se usaron la prueba de ELISA citosol de RB51 que detecta la respuesta inmune humoral frente a proteínas del citosol de RB51 y finalmente la prueba de IFN γ bovino, que detecta la respuesta inmune celular frente a RB51.

Los resultados obtenidos, demostraron que la cepa RB51 no induce anticuerpos contra el s-LPS de *Brucella* tal como era esperado, pero sí induce anticuerpos frente a proteínas citosólicas de cepa RB51.

Durante el período de estudio, sólo una vaquilla arrojó resultados positivos a estas pruebas y esto se debió probablemente al resultado de una infección natural como consecuencia de la presencia de brucelosis en el rebaño.

Los resultados obtenidos frente a la prueba de IFN γ bovino demostraron que cepa RB51 induce respuesta inmune celular, detectable mediante la presencia de esta citoquina que fue liberada al plasma bovino por los linfocitos estimulados con el citosol de RB51.

La evolución del porcentaje de animales negativos a las pruebas que usan s-LPS como antígeno fue estable ya que, exceptuando la vaquilla positiva antes mencionada, todos los animales permanecieron negativos a los cuatro muestreos.

La prueba de ELISA citosol de RB51 muestra un evidente aumento en el porcentaje de animales positivos entre el primer y segundo muestreo, para luego permanecer constante en los muestreos siguientes, esto debido a los anticuerpos generados como respuesta post vacunatoria a las proteínas de RB51, que decaen con el tiempo.

Finalmente la prueba de IFN γ bovino muestra un aumento del porcentaje de animales positivos entre el primero y segundo muestreo y luego decrece en forma constante, hasta el último muestreo.

II SUMMARY

The bovine brucellosis is a disease to which many countries have established different control and prevention strategies. In Chile the strategies settled down by the Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) are based on surveillance, culling of and prevention. This last measure is performed by vaccination with *B. abortus* strain RB51. The main advantage of this strain is not to produce diagnostic interference with tests that use the smooth lipopolysaccharide (s-LPS) as antigen.

The present study characterized the humoral and cellular immune responses produced in cattle vaccinated with this strain. A group of 25 heifer-calves which were vaccinated with $1 - 3 \times 10^{10}$ UFC of *B. abortus* RB51, between 4 and 8 months of age. All animals were maintained and managed in their herd during the period of study in which four samplings in day 0, 30 180 and 360 post vaccination, were taken. Two blood samples of each animal were taken, one with and another without anticoagulant (sodium heparin).

The samples were processed in five different diagnostic tests: Rose Bengal test, indirect ELISA and a competitive ELISA, all which detect the humoral immune response to the s-LPS of *Brucella*. A citosol of RB51 ELISA test that detects the humoral immune response against the citosol of RB51 proteins and finally a test that detects the cellular immune response against RB51 by measuring the amount of IFN γ produces by sensitized white cell in whole blood.

The results, demonstrated that the strain RB51 doesn't induce antibodies against the s-LPS of *Brucella* as it was expected, but it induces antibodies against citosolic proteins of RB51.

During the period of study, one animal showed a s-LPS positive result to the tests and probably it was caused by a natural infection as consequence of the brucellosis present in the herd.

The results the bovine IFN γ test demonstrated that RB51 vaccine induces cellular immune response.

The percentage of negative animals to the tests that use s-LPS like antigen was stable, excepting the positive heifer before mentioned, all the animals remained negative to the four samplings.

The citosol of RB51 ELISA test showed an evident increase in the positive animals percentage between the first and second sampling, to remain constant in the following samplings, this due to the post vaccination antibodies generated as response to the proteins of RB51 that decrease in the time.

Finally, the IFN γ bovine test showed an increase of positive animals percentage between the first and second sampling and then it decrease in constant form, until the last sampling.

III INTRODUCCION

La brucelosis bovina es una enfermedad cuya importancia radica en las significativas pérdidas que se registran en la ganadería, principalmente en el ámbito reproductivo y además porque representa un riesgo para la salud humana.

Tradicionalmente las estrategias de control de esta enfermedad, han sido dirigidas hacia la detección de los bovinos infectados para considerar su eliminación de los rebaños y a la protección de los animales susceptibles mediante la vacunación.

Las pruebas oficiales en Chile para el diagnóstico individual de brucelosis bovina corresponden a las de Rosa de Bengala y Fijación del Complemento. También es utilizada la Prueba del Anillo de la Leche para la vigilancia epidemiológica de los rebaños. En el último tiempo se han validado algunas pruebas de enzimoimmunoensayo que se consideran a utilizar en forma oficial. Todas estas pruebas detectan anticuerpos contra el antígeno lipopolisacárido liso (s-LPS) de *Brucella*.

El uso de la vacuna Cepa 19 (C19) como vacuna oficial en Chile trajo consigo ciertos problemas debido a que ésta inducía la liberación de anticuerpos contra el s-LPS, similares a los liberados frente a la infección de campo, los cuales eran detectados por las diversas pruebas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis interfiriendo así en el diagnóstico de ésta enfermedad, arrojando resultados falsos positivos. Sin embargo, la posterior introducción de la vacuna Cepa RB51 (CRB51) como vacuna oficial, eliminó esta desventaja pues esta cepa no presenta este antígeno en su estructura. Por ello es importante conocer, en nuestras condiciones epidemiológicas, cómo se manifiesta la respuesta inmune tanto humoral como celular frente a esta vacuna.

El presente trabajo caracterizará la respuesta serológica de bovinos vacunados con CRB51, ante el antígeno s-LPS y proteínas de *Brucella*, utilizando pruebas tradicionales como Rosa de Bengala y otras de unión primaria como ELISA indirecto y de competencia. Para determinar la respuesta celular, se detectará la presencia de interferón gamma bovino (IFN γ), como un indicador de la respuesta de linfocitos sensibilizados a proteínas de *Brucella*.

IV REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Generalidades de brucelosis bovina

La brucelosis bovina es una enfermedad que afecta al ganado produciendo diversas manifestaciones, que incluyen abortos en hembras infectadas, nacimientos de animales inviábiles y alteraciones del aparato genital en los machos infectados. Todo esto lleva a una disminución en la productividad y por consiguiente, considerables pérdidas económicas. La enfermedad puede afectar además al ser humano provocando una infección crónica de difícil tratamiento que cursa con sudoración, fiebre intermitente y diversas manifestaciones clínicas como; adenopatías, hepato y esplenomegalia y complicaciones osteoarticulares, genitales y cardíacas (Blasco y Gamazo, 1994).

La brucelosis bovina es una enfermedad difundida en la gran mayoría de los países, Las tasas de infección varían considerablemente de un país a otro y en diferentes regiones de un mismo país. Sin embargo, la información disponible indica que ésta es una de las enfermedades más importantes en el ganado Sudamericano. También se puede encontrar en regiones de Africa, Asia y Australia (Matyas y Fujikura, 1983).

Un informe obtenido de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), analiza la situación zoonosanitaria de brucelosis bovina a nivel mundial entre los años 1996 al 2003 y revela que de 202 países, la gran mayoría tiene al menos un registro de la enfermedad en sus animales. Sin embargo, se puede observar también que una parte importante de éstos países lleva más de 10 años sin que se haya presentado un nuevo caso de brucelosis (OIE, 2004).

4.2 Agente causal

El agente causal de esta enfermedad es *Brucella abortus*, un cocobacilo Gram negativo perteneciente al Género *Brucella*. A pesar de ser las *Brucella* spp. un grupo muy homogéneo, las características de su superficie celular y sus preferencias por determinado rango de hospederos determina su división en seis especies que son: *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. melitensis* y *B. abortus* (Meyer, 1990). Ultimamente se han descrito dos nuevas especies las cuales se ha propuesto denominar *Brucella pinnipediae* y *Brucella cetaceae*, puesto que han sido aisladas de mamíferos marinos. Estas nuevas especies pueden afectar al ser humano (Sohn *et al.*, 2003).

Esta bacteria se dispone aislada, en pares o en cadenas cortas o bien en pequeños conglomerados y es un agente infeccioso intracelular facultativo, es decir, puede vivir dentro y fuera de las células, especialmente en células fagocíticas (Moriyón, 1990).

En general, todas las especies de *Brucella* son poco resistentes a las condiciones medioambientales extremas, siendo inactivadas por la pasteurización y muy sensibles a la luz solar directa. Sin embargo, cuando están incluidas en materia orgánica de origen proteico presentan gran resistencia a la desecación lo que les permite permanecer durante largo tiempo viables: 75 días en fetos abortados, 120 días en deposiciones bovinas, 200 días en exudados uterinos y hasta diez semanas en la paja y el polvo de los establos o en los alimentos como leche, queso y mantequilla (Crawford *et al.*, 1990).

4.3 Estructura de *Brucella*

Su envoltura celular está constituida por una membrana interna y otra externa siendo en esta última, donde se encuentran sus principales componentes antigénicos. Uno de estos componentes es el lipopolisacárido (LPS). Esta molécula se encuentra constituida por una porción lipídica llamada lípido A, una porción oligosacárida llamada “core” y una porción polisacárida denominada cadena O (homopolímero de perosamina) la cual se encuentra presente sólo en las brucelas que pertenecen al grupo de morfología lisa (como *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*) y constituye el antígeno inmunodominante en la respuesta serológica a las infecciones causadas por este tipo de brucelas (Cherwonogrodzky *et al.*, 1990).

Esta cadena O, sin embargo, no es exclusiva de las brucelas, ya que existen otras bacterias que poseen esta molécula en su superficie, como por ejemplo *Yersinia enterocolitica* (Caroff *et al.*, 1984).

Otras estructuras inmunológicamente relevantes presentes en la membrana de *Brucella*, son las proteínas de membrana externa (Omps) entre las que se encuentran Omp 10, Omp 16 y Omp 19 identificadas como lipoproteínas; Omp 2a/2b que corresponden a porinas. Estas Omps están poco expuestas en brucelas lisas, debido probablemente a que la cadena O las oculta, lo cual explica el por qué en experimentos realizados con anticuerpos monoclonales contra las Omps, se observó más baja unión en brucelas lisas que en rugosas y además se desprende el por qué este tipo de anticuerpos generados contra las Omps no confieren protección efectiva frente a la infección por brucelas lisas (Cloekaert, 1997).

Existen otras moléculas antigénicas como las proteínas del periplasma de *Brucella* denominadas BCSP 31, Cu-Zn superóxido dismutasa y BP 26/Omp 28. Esta última proteína es de interés en el diagnóstico de brucelosis ya que aparece como un antígeno

inmunodominante para bovinos, ovinos, caprinos y seres humanos infectados, aunque su capacidad protectora no ha sido evaluada (Cloeckaert, 1997).

Finalmente se encuentran las proteínas citoplasmáticas, las cuales son altamente conservadas en el género y no están presentes en otras bacterias distintas de *Brucella* lo que las hace importantes para el diagnóstico al disminuir los resultados falsos positivos por reacciones cruzadas (Cloeckaert *et al.*, 2002). En este grupo de proteínas citoplasmáticas, se reconocen alrededor de 20 proteínas distintas, entre las que encontramos las proteínas de “stress”, GroES, GroEL, DnaK, Htr A; las proteínas ssb y uvrA; bacterioferritina; proteínas ribosomales L7/L12 y proteínas de función desconocida como p15 , p17, 22.9 kDa y la proteína citoplásmica P39 reconocida como una proteína de unión. De todas éstas proteínas, las únicas capaces de inducir una protección parcial en el modelo murino de infección por *Brucella* son L7/L12, Cu-Zn superóxido dismutasa, P39, 22.9kDa, lumazina sintetasa y gliceraldehido dehidrogenasa, las cuales pueden inducir inmunidad celular a través de la estimulación de linfocitos Th₁ y la consiguiente liberación de IL₂ e interferón gamma (IFN γ) (Schurig *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002).

4.4 Transmisión

La fuente más importante de exposición a *B. abortus* son los fluidos uterinos, los fetos abortados y las membranas fetales, e incluso el ternero nacido vivo de una madre infectada. Sin embargo, existen otras fuentes como son los toros infectados cuyo semen puede ser usado para inseminación artificial, el transplante de embriones, la presencia de otros animales domésticos infectados y agentes diseminadores del material contaminado, principalmente perros. La exposición del ganado a estas fuentes de contaminación es el

inicio del proceso de transmisión de la enfermedad, siendo la vía oral, la vía de ingreso más importante. Sin embargo, el ingreso por la vía conjuntival y la vía congénita no deja de tener importancia (Crawford *et al.*, 1990).

El ser humano puede adquirir la enfermedad por vía indirecta a través del consumo de alimentos lácteos contaminados con el agente causal o por vía directa por medio de su inhalación, al ingresar la bacteria por la vía conjuntival o a través de heridas en la piel. Incluso puede penetrar piel intacta en personas que están en estrecho contacto con animales infectados (Blasco y Gamazo, 1994).

4.5 Etiopatogenia y patología

Según Enright (1990), al ingresar al organismo animal, *B. abortus* invade ganglios linfáticos regionales y desde allí, una vez vencida esta barrera protectora, se distribuye vía linfática o vía sanguínea hacia órganos como bazo, hígado y genitales. Si la bacteria es capaz de resistir el ataque del sistema inmunitario, comenzará a invadir distintos órganos en los cuales se multiplica, estableciéndose así la infección crónica.

Se ha podido observar que *B. abortus*, establece una masiva colonización y multiplicación en útero grávido lo que se puede explicar por la abundancia en éste órgano, de eritritol, polisacárido que estimula el crecimiento de brucelas y como *B. abortus* (Corner y Alton, 1981). Una vez aquí, la bacteria invade el epitelio trofoblástico que rodea al embrión produciendo placentitis y finalmente uno de los efectos más dramáticos de la infección por *B. abortus* en el ganado, es la inducción de aborto (Enright, 1990).

Respuesta inmune a la infección

La respuesta inmune más evidente, desarrollada por el organismo animal frente a la infección por *Brucella abortus* consiste en una respuesta de tipo humoral contra el s-LPS. Sin embargo, los anticuerpos no constituyen una respuesta inmune protectora por parte del hospedero, ya que no eliminan las bacterias intracelulares del organismo y sólo actúan como reforzadores de la capacidad de los fagocitos, al opsonizar brucelas libres (Sutherland y Searson, 1990). El hecho de que los anticuerpos sean incapaces de proteger al animal frente a *Brucella* intracelular hace necesaria la inducción de una respuesta inmune celular que sí puede eliminar bacterias intracelulares (Golding *et al.*, 2001).

Como ya se ha mencionado *Brucella abortus* es una bacteria intracelular facultativa, y esto es posible debido a que una vez ingerida por los macrófagos, logra resistir la fagocitosis al desencadenar un mecanismo capaz de impedir la unión fago-lisosoma evitando así su destrucción. Por lo general, los macrófagos de animales no inmunizados no son capaces de destruir estas bacterias, debido a que éstos son activados cerca de diez días después del surgimiento de la infección. Esta activación se produce debido a que al ingresar la *Brucella* al organismo, es detectada por una célula presentadora de antígeno la cual libera un mediador llamado Interleuquina 12 (Il-12) y es esta molécula la encargada de estimular la diferenciación de células Th 0 en Th1, secretando éstos a su vez IFN γ que es el principal activador del mecanismo destructivo de los macrófagos (Golding *et al.*, 2001). Los linfocitos T citotóxicos CD8+ que secretan IFN γ son útiles para destruir las brucelas de macrófagos infectados lo que es de gran importancia para la protección contra la infección por brucelas (Golding *et al.*, 2001).

4.6 Situación nacional y control

En el año 1975, el Ministerio de Agricultura realizó a través del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), un estudio para conocer la distribución de brucelosis a nivel nacional y poner en marcha un programa de control. Los resultados obtenidos permitieron establecer tres regiones de acción: Zona Norte que va desde la I a III Región y donde existe escasa presencia de la enfermedad y la ganadería bovina es escasa; Zona Austral que va desde las comunas de Palena y Chiloé (en la X Región) hasta la XII Región y que fue catalogada como “zona de escasa prevalencia” y finalmente la Zona Centro-Sur que comprende un territorio que va desde la IV a la X región y que resultó ser una zona de alta prevalencia y que concentra la mayor parte de la ganadería nacional (SAG, 1979).

Con los resultados obtenidos en este estudio y con el fin de controlar y erradicar esta enfermedad de la masa ganadera, el SAG inició un programa de control, enfocado inicialmente a la detección de rebaños infectados, eliminación de los animales reaccionantes y vacunación de terneras entre los 3 y 8 meses de edad con vacuna *Brucella abortus* Cepa 19 (C19). Con los años esto ha sido modificado con el fin de mejorar resultados y es por esto que en 1982 se focalizó en un “Programa de Certificación de Predios Libres”, el cual intensificó la vacunación de terneras y adoptó en 1994 la vacunación de vacas adultas con dosis reducida de C19 con el fin de reforzar la inmunidad frente *Brucella* y a la vez evitar la persistencia de anticuerpos circulantes (Pinochet *et al.*, 1991; SAG, 1995).

Posteriormente en 1997, fue decretado el uso de vacuna *Brucella abortus* Cepa RB51 (CRB51), como vacuna oficial en Chile hasta hoy y se suspendió el uso de C19 (SAG, 2000).

4.7 Vacunas usadas

Las vacunas utilizadas en los programas de control han debido ser modificadas a lo largo de los años, con el fin de mejorar la efectividad de la respuesta inmune generada frente a la vacunación. Se ha estudiado cuales deberían ser las características que debiera tener una vacuna ideal contra brucelosis bovina y se han establecido los siguientes requisitos (Nicoletti, 1990; Schurig, 1994):

- Que no induzca anticuerpos capaces de interferir con el serodiagnóstico de la infección de campo, independiente de la dosis vacunal, vía de inoculación, sexo o edad del animal.
- Debe ser altamente atenuada y no producir enfermedad o infección persistente en animales inmunizados y no ser patógena para humanos.
- Una única dosis vacunal debe inducir una fuerte y duradera protección contra la infección sistémica y uterina y por tanto, prevenir el aborto y la esterilidad.
- Debe ser estable y no revertir su virulencia tanto *in vivo* como *in vitro*.
- De bajo costo de producción.
- No debería ser transmitida a otros animales si la cepa de la vacuna establece una infección latente de largo plazo, ni ser capaz de contaminar productos cárneos o lácteos.

Hasta el momento la mayoría de las vacunas usadas exitosamente han sido aquellas atenuadas, derivadas de *Brucella abortus* (Schurig *et al.*, 2002).

4.7.1 Cepa 19

La primera vacuna utilizada en nuestro país fue *Brucella abortus* Cepa 19 (C19). Esta vacuna se caracteriza por ser una vacuna viva, atenuada, obtenida a partir de una cepa virulenta de *Brucella* de morfología lisa, la cual fue aislada de la leche de una vaca Jersey en 1923 y dejada a temperatura ambiente por todo un año en el laboratorio e incapaz de crecer en la presencia de eritritol (Schurig *et al.*, 2002). Es una cepa de baja virulencia, útil para inducir inmunidad protectora en el ganado y su efectividad varía dependiendo de la edad, dosis, vía de inoculación y prevalencia en predios vacunados (Nicoletti, 1990).

Sin embargo, una de sus desventajas radica la interferencia diagnóstica que genera, ya que la cepa vacunal es estructuralmente similar a la cepa de campo con un s-LPS cuya cadena O induce una respuesta inmune humoral similar a la generada frente a una infección y precisamente es ésta respuesta, la que se detecta al realizar el diagnóstico de brucelosis. Esto lleva a que tanto los individuos vacunados como los enfermos expresen anticuerpos contra epítopes de esta cadena haciendo difícil la diferenciación entre unos y otros. Estudios realizados han detectado que estos anticuerpos pueden persistir por meses, incluso por más de un año post-vacunación (Pinochet *et al.*, 1985)

Su uso se ve inicialmente limitado a terneras entre los 3 y 8 meses de edad, de manera que al año y medio de edad arrojen resultados negativos a la presencia de anticuerpos. Sin embargo, con esta medida, se limita la protección de animales adultos, lo que hace necesario fortalecer la inmunidad, especialmente en predios con altas prevalencias. Para solucionar este problema se han realizado diversos estudios de los cuales se ha concluido que al revacunar a bovinos adultos con una dosis reducida de la vacuna, se logra reducir también la persistencia de anticuerpos, protegiendo a los animales exitosamente (Pinochet *et al.*, 1991).

4.7.2 Cepa RB51

Schurig *et al.* (1991), seleccionaron y clonaron una variante natural, rugosa, atenuada y estable de la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308, la cual fue denominada RB51. Esta cepa carece de la estructura antigénica del s-LPS denominada cadena O, por lo cual no induce anticuerpos contra ésta evitando así la interferencia diagnóstica en pruebas convencionales o en ELISA independiente de la edad, dosis o frecuencia de inyección (Schurig, 1997). Frente a numerosos pasajes *in vivo* e *in vitro* a través de varias especies animales no revierte a morfología lisa (Schurig *et al.*, 1991; Colby, 1997).

En condiciones de campo frente a altas y bajas prevalencias induce inmunidad al menos hasta un año después de la vacunación y usada en dosis única, su efecto protector es similar al inducido por C19 (Cheville *et al.*, 1993).

La inoculación intravenosa de ganado preñado con 1×10^{10} UFC de CRB51, lleva a infección placentar y fetal, pero sin aborto lo cual muestra que esta cepa cuando es administrada intravenosamente, es menos virulenta que otras cepas vacunales de *Brucella*, incluyendo C19 (Palmer *et al.*, 1996). El ganado preñado puede ser vacunado subcutáneamente con 1×10^9 UFC, sin la inducción de abortos ni placentitis (Palmer *et al.*, 1997).

4.8 Diagnóstico

El cultivo bacteriológico es el método definitivo para el diagnóstico de brucelosis y este debe realizarse en una atmósfera enriquecida con 5% a 10% de CO₂ en medios de cultivo selectivos con antibióticos (para muestras muy contaminadas) o enriquecidos (con suero sanguíneo), a un pH 6,6 a 7,4 y a 37°C. El problema de este método es que el

desarrollo de las colonias es lento por lo cual los cultivos deben mantenerse incubando hasta por seis semanas lo que se torna una desventaja (Alton *et al.*, 1988).

Para hacer más eficiente el diagnóstico de brucelosis se han desarrollado pruebas orientadas a la detección de la respuesta inmune frente a la infección. En este sentido, la mayoría de las pruebas buscan detectar la respuesta inmune humoral que se genera frente a antígenos de *Brucella* detectando la presencia de anticuerpos liberados contra la cadena O del s-LPS (Sutherland y Searson, 1990)

Entre estas pruebas diagnósticas clásicas tenemos la prueba del Rosa de Bengala que consiste en una prueba de seroaglutinación que utiliza como antígeno la bacteria entera muerta y teñida con un colorante, este antígeno se pone en contacto con el suero problema el cual, si contiene anticuerpos anti cadena O del s-LPS, generará una reacción de seroaglutinación mostrando una apariencia granular (Alton *et al.*, 1988). Las ventajas de esta prueba es su rapidez y facilidad para aplicarla a un gran grupo de animales por esto generalmente es usada como *screening* para disminuir el número de animales a muestrear en un predio, pero sus desventajas son su baja especificidad, ya que es posible que se produzcan reacciones cruzadas con otras bacterias que posean en su envoltura, el LPS con una cadena O similar. Además su sensibilidad puede también ser afectada por la temperatura a la cual se realiza la prueba siendo así, que temperaturas por debajo de la temperatura ambiente pueden disminuir su sensibilidad (Alton *et al.* 1988; MacMillan, 1990)

Otra prueba es la Fijación del Complemento la cual también detecta la presencia de anticuerpos anti cadena O del s-LPS, pero ésta, es una prueba más elaborada ya que requiere de cinco componentes, cuatro de los cuales deben estar en perfecto equilibrio para medir el quinto que es el suero problema. Esta prueba, usa como antígeno una suspensión

de bacterias muertas y éste al unirse a un suero positivo, forma un complejo antígeno-anticuerpo al cual se une el complemento. Como indicador de esta reacción se usan eritrocitos de oveja sensibilizados con hemolisina los cuales, si el suero problema no contiene anticuerpos, el complemento quedará libre uniéndose a eritrocitos sensibilizados con hemolisina, los cuáles serán indicadores de la presencia o no presencia de anticuerpos (Alton *et al.*, 1988). En rumiantes, esta prueba tiene la ventaja de llegar a ser relativamente insensible a la presencia de anticuerpos generados en respuesta a la vacunación con C19 pero altamente sensitiva y específica en animales naturalmente infectados con brucelosis. Su desventaja es que su preparación y realización es compleja de realizar y por tanto poco práctica (Alton *et al.*, 1988).

Las pruebas de ELISA que utilizan como antígeno la molécula de s- LPS han sido otro de los métodos desarrollados para medir la respuesta inmune humoral frente a brucelosis. Una de ellas es la prueba de ELISA indirecto, que consiste en una interacción entre el antígeno s-LPS generalmente inmovilizado en una fase sólida y los anticuerpos que se encuentran presentes en el material problema que generalmente es el suero del animal sospechoso. Este complejo es detectado por un reactivo que generalmente es una antiglobulina y este reactivo es conjugado con una enzima, de este modo, si el material es positivo, el reactivo se unirá al complejo antígeno-anticuerpo y se agregará a la reacción un sustrato para la enzima conjugada de modo que a mayor presencia de anticuerpos, mayor coloración se observará en la reacción (Nielsen *et al.*, 1996)

Existen otro tipo de pruebas diagnósticas las cuales están destinadas a detectar la respuesta inmune celular frente a la infección por brucelosis. Entre estas podemos encontrar pruebas de hipersensibilidad retardada que utilizan complejos proteicos de *Brucella* que se

inoculan intradérmicamente, pero tienen la desventaja de ser engorrosas, lentas y en definitiva, poco prácticas para su uso rutinario (Wood *et al.*, 1990b; Cheville *et al.*, 1993).

Existe una técnica relativamente nueva que se ha implementado inicialmente para el diagnóstico de tuberculosis bovina y consiste en la detección de IFN γ en el plasma bovino (Wood *et al.*, 1990b). El IFN γ es una citoquina especie específica, liberada por los linfocitos T frente a la presencia de un antígeno específico y su función es la de activar receptores específicos en células vecinas (macrófagos) (Golding *et al.*, 2001).

El hecho de que IFN γ sea parte de la respuesta inmune inespecífica, ha inducido a utilizar otros antígenos, especialmente proteínas citosólicas de *Brucella*, para la estimulación *in vitro* de linfocitos y de esta forma detectar la citoquina en el plasma, en caso de que éstas células estuviesen sensibilizadas como resultado de una infección (Weynants *et al.*, 1995). Para detectar el IFN γ producido, se ha desarrollado una prueba de ELISA, que utiliza un anticuerpo monoclonal contra IFN γ el cual captura la citoquina desde el plasma (si ésta estuviese presente) luego del cultivo de la sangre entera con el antígeno de *Brucella* (Wood *et al.*, 1990a; Weynants *et al.*, 1995).

En el presente estudio, se busca caracterizar la respuesta inmune, tanto humoral como celular que se genera en bovinos frente a la vacunación con *B. abortus* CRB51, ya que por las características de esta vacuna se hace interesante conocer como reaccionan los animales, en nuestras condiciones epidemiológicas.

V HIPOTESIS DE TRABAJO

La vacunación con CRB51 no genera una respuesta humoral contra el s-LPS, pero sí genera una respuesta humoral y celular frente a proteínas citosólicas de CRB51.

VI OBJETIVO GENERAL

- Contribuir al conocimiento de la respuesta inmune de bovinos inducida por la vacunación con *Brucella abortus* CRB51, en condiciones de campo en Chile.

VII OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la respuesta humoral de bovinos vacunados con *Brucella abortus* CRB51 mediante pruebas tradicionales y de ELISA, utilizando diferentes antígenos.
- Evaluar un antígeno proteico de CRB51 en la estimulación de linfocitos de bovinos vacunados con CRB51.
- Caracterizar la respuesta inmune celular de bovinos vacunados con *Brucella abortus* CRB51, mediante la detección de IFN γ .

VIII MATERIAL Y METODOS

8.1. Animales.

Este trabajo se realizó en un plantel lechero que contaba con una masa bovina promedio, de 205 vacas adultas en ordeña y 125 hembras de entre 1 día de edad, hasta vaquillas preñadas. Desde 1997 se estableció un programa de saneamiento de brucelosis con una prevalencia inicial de 9,9%. La prevalencia de brucelosis al mes de Diciembre de 1999 fue de 6.8%.

Se contó con un grupo de 25 terneras las cuales fueron vacunadas con $1-3 \times 10^{10}$ UFC de *B. abortus* RB51, entre la edad de 4 y 8 meses. Estas fueron mantenidas y manejadas en su predio durante el período de estudio.

El tamaño de muestra utilizado fue calculado de tal manera que se pudiese detectar una diferencia de 30% en la positividad a las pruebas usadas, con una confianza de 95% y una potencia de 80%.

8.2. Muestreo.

Los animales fueron muestreados cuatro veces a lo largo del estudio, realizando el primero en el día 0 (día de la vacunación) y luego a los 30, 180 y 360 días posvacunación. Fueron extraídas dos muestras de sangre por cada ternera en cada uno de los muestreos. Una se recolectó en un tubo para obtener el suero (tubo sin anticoagulante) y la otra con anticoagulante (heparina de sodio) la cual fue despachada dentro de 8 hrs. posrecolección al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile para ser procesada en la detección de IFN γ .

8.3. Detección de respuesta inmune humoral.

a. Pruebas tradicionales

Todos los sueros fueron sometidos a las pruebas RB para definir un estado de respuesta serológica inicial frente al antígeno s-LPS según Alton *et al* (1988).

b. Pruebas no tradicionales

Todos los sueros fueron sometidos a pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos contra el s-LPS y proteínas de *Brucella*.

- **ELISA-indirecto**: para esta prueba trabajamos con un “kit” (FAO/IAEA, 1993) que consiste en un antígeno s-LPS (extraído de *Brucella abortus* B99) el cual está pasivamente adsorbido a una microplaca de poliestireno. Para detectar la presencia de anticuerpos en el suero estudiado, éste último se debe adicionar a la placa y, si existen anticuerpos anti s-LPS, éstos reaccionarán con el antígeno inmovilizado. Luego se adiciona un conjugado anti-especie que corresponde a un anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG1 bovina conjugado a peroxidasa de rábano. Finalmente se adiciona un sustrato cromógeno que colorea la reacción. El resultado de esta prueba se mide basándose en la densidad óptica de la reacción la cual será proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero problema (FAO/IAEA, 1993). Los sueros controles son proporcionados por el “kit” y corresponden a:

Control positivo fuerte (C++) : Suero con anticuerpos fuerte

Control positivo débil (C+) : Suero con anticuerpos moderados

Control negativo (C-) : Suero sin anticuerpos.

Se considerará un “cut-off” de 35% según antecedentes obtenidos por Abalos *et al.* (1996).

- **ELISA-competencia:** realizado según recomendaciones de Nielsen *et al.* (1996). Esta prueba utiliza como antígeno el s-LPS extraído de *Brucella abortus* S1119.3 el cual se adsorbe pasivamente a la placa de poliestireno. El suero en estudio se adiciona a la placa y luego se adiciona un anticuerpo monoclonal de ratón anti *Brucella* (M84) dirigido contra la cadena O del s-LPS. Los anticuerpos específicos que pudiesen estar presentes en el suero de prueba competirán con el anticuerpo monoclonal M84 y esta competencia será detectada al agregar un conjugado de caprino anti IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano para luego utilizar un sustrato que produce un cambio de color de la reacción. En el caso de esta prueba, la reacción de mayor color está dada por la unión completa del monoclonal M84 con el antígeno y cuando existen anticuerpos compitiendo por los sitios antigénicos, se produce una inhibición del desarrollo del color, que se considera como positivo de acuerdo al porcentaje de inhibición (%I). El “cut off” que se consideró fue de 30%I.

Los sueros controles son proporcionados por el “kit” y corresponden a:

Control positivo fuerte (C++) : Suero con anticuerpos fuerte

Control positivo débil (C+) : Suero con anticuerpos moderados

Control vacunado (Cv) : Suero de un animal vacunado con C19

(negativo en cELISA)

Control negativo (C-) : Suero sin anticuerpos.

- **ELISA citosol de RB51:** este corresponde a un nuevo ELISA indirecto desarrollado en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas (Fac. Cs. Vet. y Pec., U. de Chile) (Retamal, 1998). Utiliza como antígeno una fracción citosólica de CRB51 la cual ha sido preparada utilizando el método de Aragón *et al.* (1996), con algunas modificaciones, ya que Aragón utilizó *Brucella abortus* 2308 y *Brucella melitensis* las que fueron cultivadas por 36 hrs. a 36°C y 35% de oxígeno y el homogeneizado obtenido fue digerido con nucleasas por 18 hrs a 37°C. A diferencia de esto, nuestro citosol fue obtenido de cepa RB51, la cual fue cultivada en caldo Trypticasa Soya en agitación constante por 48 hrs. y el homogeneizado obtenido fue digerido con nucleasas por 48 hrs. a 4°C. La fracción antigénica con la cual nosotros trabajamos está constituida principalmente por las proteínas Cu-Zn SOD del periplasma y Yajc, GroEL y GroES del citoplasma celular¹. Se utilizó un conjugado de peroxidasa anti IgG bovina y el resto de la metodología es similar a la utilizada en otros ELISA indirectos.

8.4. Detección de la respuesta inmune celular

Esta se realizó mediante un “kit” para detectar IFN γ (BOVIGAM™), que se utiliza para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Básicamente este método consiste en la obtención de sangre entera la que es cultivada en presencia de un antígeno y los linfocitos presentes en el medio producirán IFN γ al estar sensibilizados frente al antígeno específico. En este caso se utilizó la prueba realizada para detección de respuesta inmune celular frente a brucelosis bovina descrita por Weynants *et al.* (1995) con algunas modificaciones ya que la sangre entera obtenida de los animales fue cultivada a 37°C, con 5% de CO₂, pero el

¹ Comunicación personal Dr. Gerhardt Schurig. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine,

antígeno utilizado para la estimulación de linfocitos en nuestro estudio fue el mismo citosol de RB51 descrito anteriormente para la prueba de ELISA citosol en tanto que Weynants utilizó una mezcla de proteína citoplasmática de *Brucella mellitensis* B 115.

La posterior detección de IFN γ se hace mediante un “kit” (CSL Veterinary) que consiste en un ELISA de captura el cual utiliza como fase sólida placas sensibilizadas con un anticuerpo anti IFN γ , el plasma obtenido de la sangre entera cultivada es adicionado a la placa y el IFN γ que pudiese estar presente reaccionará con el anticuerpo fijado. Finalmente se agrega un conjugado anti IFN γ bovino marcado con peroxidasa de rábano picante. La interpretación se realizó según Weynants *et al.* (1995) y consistió en calcular el Índice de Estimulación a la liberación de IFN γ dividiendo la media de la densidad óptica obtenida del plasma del cultivo con antígeno, por la media de la densidad óptica obtenida del plasma del cultivo sin antígeno.

Todas las pruebas realizadas en este estudio, finalmente entregan resultados positivos o negativos.

8.5. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos en las pruebas de RB, ELISA indirecto y ELISA competencia fueron comparados entre sí, en cada uno de los muestreos, mediante la prueba Q de Cochran que corresponde a una prueba de comparaciones múltiples para muestras asociadas con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas al aplicar cualquiera de estas pruebas diagnósticas para detectar anticuerpos contra s-LPS de

Brucella. Además se describió la evolución de la frecuencia de animales negativos a estas pruebas para cada muestreo.

La respuesta de anticuerpos al ELISA-citosol se describió como la evolución de porcentajes de positividad para cada muestreo.

La respuesta a la prueba BOVIGAM™, se describió como la evolución de la frecuencia de Índices de Estimulación (IE) definidos por Weynants *et al.* (1995).

Los resultados de estas dos pruebas también fueron comparados entre sí por la prueba estadística Q de Cochran con el fin de analizar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el número de animales positivos detectados por ambas pruebas (Siegel, 1956).

La fórmula de la prueba estadística Q de Cochran, que permite la comparación múltiple entre más de dos variables es la siguiente:

$$Q = \frac{(k-1) * ((k * \Sigma G^2) - (\Sigma G)^2)}{(k * \Sigma L) - \Sigma L^2}$$

donde k = número de condiciones (según si estoy comparando 2 o 3 pruebas entre si)

ΣG = sumatoria de los eventos a considerar por prueba

ΣL = sumatoria de los eventos a considerar por individuo

para un p = 0.05

IX RESULTADOS

En el siguiente cuadro (Cuadro N°1) se presentan los resultados a las distintas pruebas diagnósticas, a las cuales fueron sometidas las muestras obtenidas en los muestreos 1, 2, 3 y 4. Los resultados positivos y negativos fueron transformados en valores (0 = negativo; 1 = positivo; ND = no determinado).

Cuadro N°1

**Resultados obtenidos en las distintas pruebas diagnósticas
en los cuatro muestreos realizados.**

Muestra	Rosa de Bengala				ELISA Indirecto				ELISA Competencia				ELISA RB51				ELISA INF				
	Mu. 1	Mu. 2	Mu. 3	Mu. 4	Mu. 1	Mu. 2	Mu. 3	Mu. 4	Mu. 1	Mu. 2	Mu. 3	Mu. 4	Mu. 1	Mu. 2	Mu.3	Mu. 4	Mu. 1	Mu. 2	Mu. 3	Mu. 4	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
3	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	1	1	ND	0	1	0	ND	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	
6	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	1	1	1	ND	0	1	0	ND	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
11	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	1	1	ND	0	0	0	ND	
12	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	1	1	1	0	ND	1	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
17	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	1	1	ND	0	0	0	1	ND
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
23	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	1	1	ND	0	0	0	0	ND
24	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	1	1	1	ND	1	0	0	ND	0
25	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
26	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	1	1	ND	1	1	0	ND	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0

9.1 Respuesta humoral al s-LPS.

En el Cuadro N°2 se resumen la cantidad y el porcentaje de animales negativos en los distintos muestreos realizados en el ensayo.

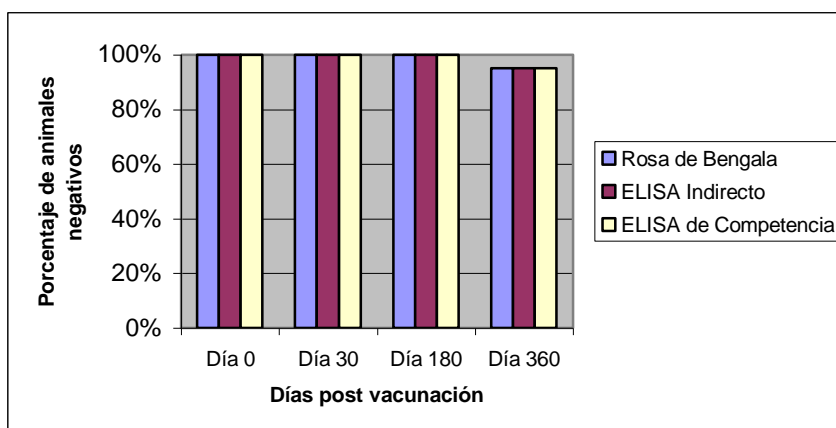
Cuadro N°2

Frecuencia de animales negativos frente a las pruebas que detectan anticuerpos contra el s-LPS de *Brucella*, en los cuatro muestreos realizados.

Muestreos	N° Animales muestreados	Positivos a Rosa de Bengala	Positivos ELISA Indirecto	Positivos ELISA Competencia	Porcentaje de animales negativos al s-LPS.
Día 0	28	28	28	28	100%
Día 30	27	27	27	27	100%
Día 180	28	28	28	28	100%
Día 360	21	20	20	20	95,2%

Gráfico 1

Evolución del porcentaje de animales negativos frente a las pruebas que miden anticuerpos contra el s-LPS de *Brucella*, en los cuatro muestreos realizados.



En este gráfico se observa que en los primeros tres muestreos el total de individuos chequeados es 100% negativo a las tres pruebas diagnósticas, sin embargo en el cuarto muestreo no se llega al 100% de negatividad. Esto se debe a que una de las hembras chequeadas en este muestreo resultó positiva a los tres tipos de pruebas diagnósticas realizadas. No hubo diferencias entre el muestreo del día 360 con los anteriores. $p > 0.05$.

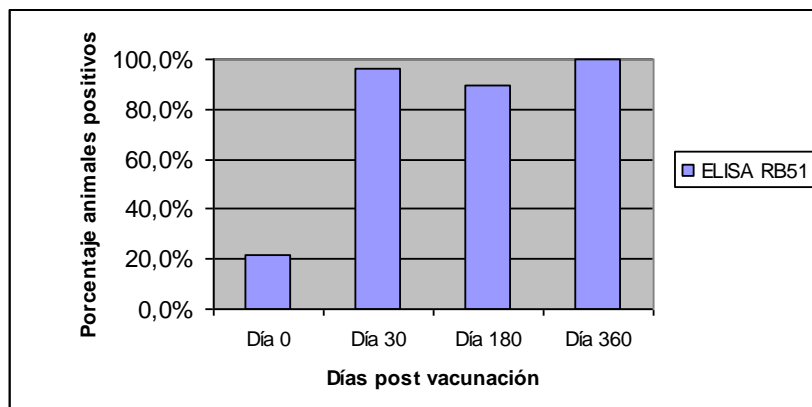
9.2 Respuesta humoral a proteínas citosólicas de *Brucella*.

En el Cuadro N°3 podemos observar la frecuencia de animales positivos en los distintos muestreos frente a la prueba ELISA citosol de RB51, que detecta la respuesta inmune humoral frente a proteínas citosólicas de RB51.

Cuadro N°3
Frecuencia de animales positivos a la prueba ELISA citosol de RB51, en los cuatro muestreos realizados.

Muestreos	Animales Muestreados	Animales positivos a ELISA RB51	Porcentaje de animales positivos a ELISA RB51.
Día 0	28	6	21,4%
Día 30	27	26	96,3%
Día 180	28	25	89,3%
Día 360	21	21	100%

Gráfico 2.
Evolución del porcentaje de animales positivos frente a la prueba ELISA citosol de RB51, en los cuatro muestreos realizados.



En esta figura se observó que al primer muestreo se obtuvo un bajo porcentaje de individuos positivos a la prueba. En el segundo muestreo el porcentaje de animales positivos es mayor respecto del tercer muestreo, pero en el cuarto muestreo se obtuvo un porcentaje de individuos positivos aún mayor que todos los anteriores siendo que lo esperable era obtener en este muestreo un porcentaje igual o menor al tercer muestreo. Se obtuvieron diferencias significativas entre el primer muestreo y los siguientes ($p \leq 0.05$), pero no así entre los últimos tres ($p > 0.05$).

9.3 Respuesta celular a proteínas citosólicas de *Brucella*.

En el Cuadro N°4 podemos observar la frecuencia de animales positivos en los distintos muestreos frente a la prueba de ELISA IFN γ , que detecta la respuesta inmune celular frente a proteínas citosólicas de RB51.

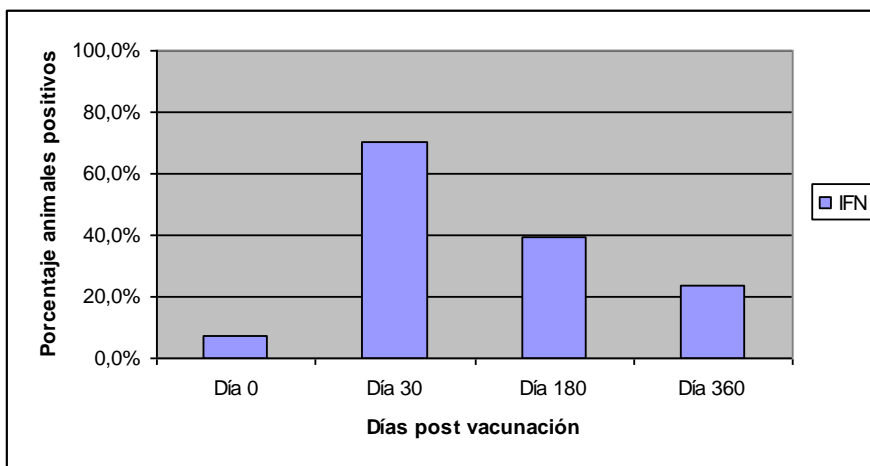
Cuadro N°4

Frecuencia de animales positivos frente a la prueba diagnóstica de ELISA IFN γ bovino, en los cuatro muestreos realizados.

Muestreos	Animales muestreados	Animales Positivos a ELISA IFN γ	Porcentaje de animales positivos.
Día 0	28	2	7,1%
Día 30	27	19	70,4%
Día 180	28	11	39,3%
Día 360	21	5	23,8%

Gráfico 3.

Evolución del porcentaje de animales positivos frente a la prueba de ELISA IFN γ bovino, en los cuatro muestreos realizados.



Vemos que el primer muestreo presenta el menor porcentaje de individuos positivos. Así mismo, se observa en el segundo muestreo un notorio aumento de animales positivos y en la medida que el número de muestreos avanzó en el tiempo, el porcentaje de individuos positivos a esta prueba fue disminuyendo. Las diferencias entre los cuatro muestreos son estadísticamente significativas, $p \leq 0.05$.

X DISCUSIÓN

Al analizar los resultados obtenidos al aplicar las tres pruebas que detectan anticuerpos contra el s-LPS, esto es, Rosa de Bengala (RB), ELISA indirecto (EI) con anticuerpos contra el s-LPS y ELISA competencia (EC) con anticuerpo monoclonal contra el s-LPS, se puede observar que, a excepción de una hembra (que se hizo positiva al final del ensayo), el resto de los animales muestreados resultó negativo tanto antes de ser vacunado con CRB51 (Día 0) como a los 30, 180 y 360 días post vacunación (Gráfico 1) y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre estas pruebas lo que demuestra que se podría usar indistintamente una u otra prueba en el diagnóstico de brucelosis. Estos resultados indican además que el ganado vacunado con CRB51 no produce anticuerpos que puedan ser detectados por las pruebas convencionales que se usan para el diagnóstico de brucelosis en animales lo cual confirma resultados obtenidos en estudios anteriores, que muestran que CRB51 no produce anticuerpos aglutinantes que sean detectados por la prueba de RB (Stevens *et al*, 1994). Esta característica de CRB51 es importante ya que esta prueba es usada como “screening”, y por tanto evita la eliminación de animales falsos positivos.

La incapacidad de CRB51 para inducir anticuerpos detectados normalmente por el RB y los ELISA que se han realizado en este estudio se deben probablemente a que esta cepa contiene muy pequeñas cantidades de antígenos del s-LPS lo que es respaldado por un estudio previo que mostró que el LPS de CRB51 reacciona pobremente con un anticuerpo monoclonal para el antígeno LPS de C2308 (Schurig *et al*, 1991).

La presencia de una hembra positiva a las tres pruebas en el último muestreo, podría indicar la presencia de infección natural lo cual es muy posible debido a que el rebaño en el cual se realizó este estudio tenía una prevalencia de 6,8% al término del estudio. Si consideramos que para esa fecha los animales ya estaban entrando en la etapa productiva es esperable que incluso más de una hembra se infectara al estar en contacto con hembras más adultas que habían estado sometidas a la vacunación con C19 y por antecedentes que se conocen esta hembra fue eliminada del predio al poco tiempo de conocida su condición . Esta situación nos indicaría que no todos los animales vacunados con RB51 fueron protegidos.

Al observar los resultados obtenidos frente a la prueba de ELISA citosol de RB51, la cual detecta anticuerpos contra una fracción proteica del citosol de CRB51, podemos notar que aparece un pequeño porcentaje de animales positivos en el primer muestreo (Gráfico 2) donde los animales aun no han tenido contacto con la vacuna. Este valor se debe a hembras que aparecen positivas al primer muestreo (Cuadro 1) lo cual podría significar una respuesta inespecífica frente a la prueba y por tanto serían animales falsos positivos. Es posible que la prueba haya detectado anticuerpos calostrales maternos circulantes, en crías de hembras infectadas. La posibilidad de que estos animales estén infectados se descarta porque aparecen negativos frente a las pruebas que miden anticuerpos contra el s-LPS.

En los muestreos siguientes se puede observar una clara alza de la cantidad de animales positivos a la prueba lo que muestra la presencia de anticuerpos contra proteínas del citosol de CRB51 utilizadas en la prueba. Las diferencias establecidas entre los cuatro

muestreos son estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) lo cual confirma una respuesta inmune humoral frente a la vacunación con esta cepa.

Llama la atención al observar los resultados obtenidos con esta prueba encontrar un 100% de animales positivos a la prueba a los 360 días post vacunación, ya que lo esperable es que la respuesta inmune vaya declinando al pasar del tiempo. Sin embargo, las diferencias entre este muestreo y los dos anteriores no son estadísticamente significativas.

La respuesta a la prueba de IFN γ (que detecta liberación de IFN γ por parte de linfocitos sensibilizados frente a una fracción proteica de citosol de RB51), muestra también una variación entre los cuatro muestreos realizados (Gráfico 3), siendo de un 7,1% en el día 0, correspondiente a dos animales que resultaron positivos a la prueba para luego alcanzar el máximo de animales positivos en el día 30 post vacunación y declinar gradualmente entre los días 180 y 360 post vacunación. Los análisis estadísticos arrojaron diferencias significativas entre estos muestreos lo que indica que sí se estimula una respuesta inmune celular frente a la vacunación con CRB51.

Al comparar los resultados entre ambas pruebas ELISA RB51 y la prueba de IFN γ bovino podemos observar que la cantidad de animales positivos a la prueba ELISA RB51 resultó ser mayor que la de animales positivos al IFN γ en los cuatro muestreos. Esto podría explicarse porque la respuesta frente a *Brucella abortus* es tanto celular como humoral y el predominio de una respuesta por sobre la otra dependerá de las características del antígeno y su capacidad para estimular una respuesta en mayor proporción que la otra. En este caso el antígeno utilizado estimuló mayormente la respuesta humoral por sobre la celular.

XI CONCLUSIONES

- La vacuna *Brucella abortus* CRB51 no estimula la producción de anticuerpos aglutinantes detectables por las pruebas comúnmente utilizadas para el diagnóstico de brucelosis.
- La vacuna *Brucella abortus* CRB51 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral detectable, al utilizar como antígeno proteínas citosólicas de su estructura.
- La vacuna *Brucella abortus* CRB51 es capaz de inducir una respuesta inmune celular detectable por la prueba de IFN γ bovino.

XII BIBLIOGRAFÍA

ABALOS P., IBARRA L., PINOCHET L., NAVIA F., BOISIER X. 1996. Residual anti-*Brucella abortus* strain 19 antibodies detected in adult cattle by two indirect ELISA tests. *Vet. Rec.* **138**: 140.

ALTON G. G., JONES L. M., ANGUS R. D., VERGER J. M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. PARIS. 190 p.

ARAGON V., DIAZ R., MORENO E., MORIYON I. 1996. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **178**: 1070-1079.

BLASCO J. M^a., GAMAZO C. 1994. Brucelosis animal. *Investigación y Ciencia.* N° 218.

CAROFF M., BUNDLE D. R. B., PERRY M. B. 1984. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur. J. Biochem.* **139**: 195-200.

CHERWONOGRODZKY J. W., DUBRAY G., MORENO E., MAYER H. 1990. Antigenes of *Brucella*. *In: Animal Brucellosis.* Nielsen K., and Duncan J.R. (Eds.) C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp 19-55.

CHEVILLE N.F., STEVENS M. G., JENSEN A. E., 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.

CLOECKAERT A. 1997. Antigenes of *Brucella*. *In: 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference.* November 8-9. 1997. Chicago, III. USA. pp 35-36

CLOECKAERT A., VIZCAINO N., PAQUET J. Y., BOWDEN R. A., ELZER P. H. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.* **90**: 229-247.

COLBY L. A. 1997. The humoral response of Elk (*Cervus elaphus nelsoni*) and mice to vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. M. Sc. Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA. 152 p.

CORNER L. A., ALTON G. G. 1981. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res. Vet. Sci.* **31**: 342-344.

CRAWFORD R. P., HUBER J. D., ADAMS B. S. 1990. Epidemiology and surveillance. *In: Animal Brucellosis.* Nielsen K., and Duncan J.R. (Eds.) C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp 131-151.

ENRIGHT F. M. 1990. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. *In: Animal Brucellosis.* Nielsen K., and Duncan J.R. (Eds.) C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp 301- 320.

FAO / IAEA. 1993. Brucellosis ELISA kit manual. Joint FAO/IAEA Division. Agriculture Laboratory. Animal Production and Health Unit. Seibersdorf, Austria. 22p.

GOLDING B., SCOTT D. E., SCHARF O., HUANG L. Y., ZAITSEVA M., LAPHAM C., ELLER N., GOLDING H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection.* **3**: 43- 48.

MACMILLAN A. 1990. Conventional serological tests. *In: Animal Brucellosis.* Nielsen K., and Duncan J.R. (Eds.) C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp. 153-198.

MATYAS Z., FUJIKURA T. 1983. Brucellosis as a world problem. *In: Developments in biological standarization. IIIrd international symposium on brucellosis.* Karger S. **56**: 3-20.

MEYER M. E. 1990. Current concepts in the taxonomy of the Genus *Brucella*. *In: Animal Brucellosis*. Nielsen K., and Duncan J.R. (Eds.) C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp 1-17.

MORIYON I. 1990. Structure of the cell envelope. *In: Proceedings 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference*. November 8-9, 1997. Chicago, III. USA. pp 3-18.

NICOLETTI P. 1990. Vaccination. *In: Animal Brucellosis*. Nielsen K. and Duncan J.R. (Eds.). C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp 283-300.

NIELSEN K., GALL D., KELLY W., VIGLIOCCO A., HENNING D., GARCIA M. 1996. Immunoassay Development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis. Agriculture and Agri-Food Canadá. ISBN 0-662-24163-0.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE) s. f. Mundo / Brucelosis bovina. Situación zoonosanitaria plurianual (frecuencias). [en línea]. < http://www.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?c_cont=6&c_mald=33 > [consulta 22 / 06 / 2004]

OLIVEIRA S. C., SOEURT N., SPLITTER G. 2002. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.* **90**: 417- 424

PALMER M., CHEVILLE N., JENSEN A. 1996. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* Strain RB51. Pathologic, bacteriologic and serologic findings. *Vet. Pathol.* **33**: 682-691.

PALMER M., OLSEN S., CHEVILLE N. 1997. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 472-477.

PINOCHET L., GARCIA J., DENTONE M. L.. 1985. Respuesta inmunológica de terneras vacunadas con *Brucella abortus* Cepa 19 a los 60 días de edad. *Agrociencia*. **1**: 65-68.

PINOCHET L., ABALOS P., BEST A., LOPEZ J., VERGARA C., PALAVICINO I. 1991. Protección contra brucelosis bovina en hembras adultas mediante la revacunación con dosis reducida de Cepa 19. *Av. Cs. Vet.* **6**: 152-157. N°2 .

RETAMAL P. I. 1998. Detección de anticuerpos mediante ELISA indirecto con antígeno citosólico de *Brucella abortus* RB51 en bovinos adultos vacunados con cepa RB51 y cepa 19. Memoria Título Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 59 p.

SCHURIG G. G. 1994. Important immunological considerations for the development of an effective vaccine using *Brucella abortus* strain RB51 as a model. Simposio Internacional de Actualización en Brucelosis, México D. F..

SCHURIG G., MARTIN ROOP II R., 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.

SCHURIG G. G. 1997. Brucellosis vaccines: past, present and future. In: Proceedings 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9, 1997. Chicago, III. USA. pp. 26-34.

SCHURIG G. G., SRIRANGANATHAN N., CORBEL M. J. 2002. Brucellosis Vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* **90**: 479-496.

SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). 1979. Boletín de información científica y técnica. División de protección pecuaria. Ministerio de Agricultura. Chile. Volumen extraordinario N°31. 45p.

SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG).1995. Saneamiento de rebaños infectados con brucelosis bovina utilizando vacunación de hembras adultas con Cepa 19 en dosis diluida. Manual de Procedimientos. Ministerio de Agricultura. Chile. 54 p.

SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). 2000. Erradicación de Brucelosis Bovina X^a Región. Informe 1999, Dirección Regional X^a Región. Ministerio de Agricultura. Chile. 33 p.

SIEGEL S. 1956. Nonparametric statistics. M^cGraw Hill Book Company, INC. New York, USA. 312p.

SOHN A. H., PROBERT W. S., GLASER C. A., GUPTA N., BOLLEN A. W., WONG J. D., GRACE E. M., M^cDONALD W. C. 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* **9** (4): 485-488.

STEVENS M. G., HENNAGER S. G., OLSEN S. C., CHEVILLE N. F. 1994. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1065-1066. N^o4.

SUTHERLAND S. S., SEARSON J. 1990. The immune response to *Brucella abortus*-The humoral response. *In: Animal Brucellosis.* Nielsen K., and Duncan J.R. (Eds.) C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp 65-81.

WEYNANTS V., GODFROID J., LIMBOURG B., SAEGERMAN G., LETESSON J. 1995. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 706-712.

WOOD P. R., ROTHEL J. S., M^cWATERS P. G. D., JONES S. L. 1990a. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-Interferon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **25**: 37-46.

WOOD P., CORNER L., PLACKETT P. 1990b. Development of a simple rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ interferon. Res. Vet. Sci. **49:** 46-49.