

Evaluación de la eficacia protectora de la vacuna antibrucélica experimental *Brucella abortus* Delta-pgm en bovinos

Evaluation of the protective capacity of the novel vaccine strain Delta-pgm in bovines

Diego Comerci, Diego Rey Serantes, Ezequiel Carballo, Eduardo Paramidani, Eduardo Bagnat y Juan Ugalde

Universidad Nacional de San Martín
/ SENASA (Argentina)

Resumen

La brucelosis bovina es una zoonosis ampliamente distribuida en el mundo y que continúa produciendo importantes pérdidas económicas y problemas de salud en humanos. Si bien existen varias vacunas que inducen diversos grados de protección, cada una de ellas posee una o más desventajas, que van desde una baja capacidad para inducir un nivel adecuado de inmunidad hasta interferencias con los métodos de diagnóstico de rutina actualmente utilizados en la lucha contra la enfermedad. Por estos motivos sigue siendo importante el desarrollo de nuevas vacunas que posean ventajas con respecto a las que se encuentran disponibles en el mercado.

En este trabajo se presentan los resultados de una prueba de potencia en bovinos en la que se compara la capacidad protectora de la cepa Delta-pgm con la de la S-19, cepa empleada en la Argentina, en la actualidad. Se analizaron diversos parámetros de protección sobre 32 animales vacunados con las dos cepas sujetas a comparación o no vacunados: serología de los animales durante toda la experiencia, bacteremia por hemocultivo de las madres, tiempo de gestación, estado de los terneros al parto (vivos, muertos, prematuros) y excreción en leche.

Los resultados mostraron que la cepa Delta-pgm aplicada en dos dosis (una antes de los 6 meses de edad y un refuerzo de adultos) no genera interferencia con los actuales métodos diagnósticos de la enfermedad e induce un grado de protección al menos equivalente al generado por la cepa S-19. Nuestros resultados indican que Delta-pgm podría ser una potencial nueva herramienta para la vacunación de animales adultos.

Palabras clave: Brucelosis bovina, vacunas, inmunidad.

Abstract

Bovine brucellosis is still a worldwide spread zoonosis that causes important economic losses and human health problems in many regions. Although there are several vaccine strains, each one of them has one or more disadvantages that can range from a poor protection capacity to interferences in the diagnostic methods that are currently used in routine control of the disease. For all these reasons, there is still a need for the development of novel vaccines with advantages over the currently available ones.

In this paper we present the results of a vaccination-challenge study comparing the potency of the novel strain Delta-pgm with that of S-19, the vaccine that is being used in Argentina. Several parameters were analyzed on 32 animals inoculated with either of the two strains, or not vaccinated at all: serological titers during the complete experiment, bacteremia of the mothers analyzed by blood culture, gestation period, condition of the offspring at delivery (dead, alive, premature) and excretion of bacteria through milk.

Our results indicate that that Delta-pgm administered in a two-dose regime (one before 6 months of age and a second one in adulthood) does not generate any serological interference with the current diagnostic methods and induces a protection that is similar to that induced by the S-19 strain. These results suggest that Delta-pgm could be a potential new tool for adult animals vaccination.

Key words: Bovine brucellosis, vaccines, immunity.

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella* que se transmite por contacto con los animales o por consumo de productos contaminados derivados de animales infectados. Es considerada por la OMS como una de las zoonosis de mayor distribución mundial. El hombre y la mayor parte de los mamíferos domésticos y salvajes son susceptibles a la infección (Corbel, 1997).

Brucella pertenece a la división α -2 de las Proteobacterias, junto con otros géneros que incluyen especies que viven en asociación íntima con células eucariotas, como *Agrobacterium* y *Rickettsia*, y con las rizobacterias, (Moreno *et al.*, 1990). Los miembros del género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos. Actualmente se reconocen diez especies dentro de este género, pero las tres que entrañan más riesgo para los humanos son *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*.

En la actualidad, el mercado de vacunas antibrucélicas está dominado principalmente por la cepa S-19, una vacuna viva atenuada desarrollada hace más de ochenta años de la cual aún se desconoce la naturaleza de su atenuación. La inmunización con *B. abortus* S-19 confiere un alto nivel de protección contra la infección y el aborto producidos por cepas patógenas (Nicoletti, 1990). Debido a estas características, S-19 ha sido el principal pilar de las campañas de control de brucelosis bovina en los países desarrollados durante el siglo xx, lo que ha permitido reducir la prevalencia y la difusión de la enfermedad para poder luego pasar a la etapa de erradicación. En la Argentina, su uso masivo y continuo desde el año 1980 ha permitido lograr el control de la enfermedad y disponer de un rodeo resistente en condiciones de intensificar la erradicación.

Sin embargo, S-19 posee ciertas características que limitan su uso. Debido a la similitud antigénica que guarda con las cepas virulentas de campo, en particular respecto de la estructura del lipopolisacárido liso (S-LPS), la cepa *B. abortus* S-19, cuando se aplica a hembras adultas, genera títulos de anticuerpos anti-LPS persistentes que son indistinguibles de los generados por infecciones naturales provocadas por cepas silvestres, lo que genera interferencias y dificulta la interpretación de los diagnósticos de uso corriente para el saneamiento, la erradicación y la vigilancia epidemiológica (Nicoletti, 1990; Sutherland y Searson, 1990). Por ello su uso se restringió a una única dosis en las terneras, ya que, de esta forma, los títulos de anticuerpos anti-LPS dejan de ser detectables alrededor de los seis a nueve meses post-vacunación. En la Argentina, S-19 se aplica una sola vez en la vida, a las terneras de 3 a 8 meses de edad.

Lograr una buena cobertura vacunal (95-100 %) del rodeo de manera regular es fundamental para el control de la enfermedad y ello exige no solo buenas vacunas y diagnósticos, sino una estructura y organización sanitaria eficaces. Esta es una tarea compleja y de gran envergadura que requiere un cuidado permanente. Debido a estas dificultades muchos países no cuentan hoy con rodeos inmunizados adecuadamente en todas sus categorías etarias y se encuentran

con la necesidad de inmunizarlos evitando interferencias con el diagnóstico para avanzar sobre la erradicación.

Una de las estrategias seguidas para poder eludir las interferencias con el diagnóstico serológico generadas por S-19, se basa en disponer de una cepa de *Brucella* que genere una protección eficaz sin dar lugar a la formación de anticuerpos anti S-LPS. Este camino se ha recorrido con cepas rugosas como *B. abortus* 45/20 y más recientemente con la vacuna *B. abortus* RB51 las que, por distintas razones, no lograron satisfacer la condición de eficacia (Bagnat y Manetti, 2000; Schurig *et al.*, 2002). Estas variantes rugosas se generaron por mutaciones al azar, sin posibilidad de seleccionar y dirigir los cambios genéticos de manera específica con el propósito de anular los componentes estructurales y fisiológicos involucrados en los procesos de virulencia y antigenicidad. La era post genómica, así como las técnicas de ingeniería genética, han permitido avanzar en la generación de nuevas cepas vacunales con características genéticas definidas que le aportan, a su vez, las propiedades antigénicas y patogénicas deseables.

Como parte de un programa de estudio sobre las bases moleculares de la patogenia de *Brucella*, nuestro grupo de trabajo identificó y caracterizó el gen que codifica la enzima fosfoglucomutasa (*pgm*) de *Brucella abortus*. Dicha enzima cataliza la interconversión reversible de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato, metabolito central en la síntesis de varios azúcar-nucleótidos (Ugalde, 1999). Se generó una mutante por delección no marcada (sin portar genes de resistencia a antibióticos) en dicho gen con el objeto de afectar severamente la síntesis de todos los polímeros de azúcares importantes para la virulencia de la bacteria como el S-LPS y el glucano β 1,2 cíclico. La cepa generada, denominada Delta-*pgm*, posee un fenotipo rugoso dado que carece de antígeno O ensamblado al LPS y es incapaz de sintetizar el glucano β 1,2 cíclico, un importante factor de virulencia involucrado en el proceso de evasión de las defensas celulares (Ugalde *et al.*, 2000; Briones *et al.*, 2001; Arellano-Reinoso *et al.*, 2005). En consecuencia, Delta-*pgm* está severamente atenuada en el modelo de infección en ratones, aunque retiene la capacidad de invadir y persistir transitoriamente en fagocitos no profesionales y profesionales (Ugalde, 2000). Estas características alentaron la evaluación de la capacidad vacunal de la cepa. Los ensayos de vacunación / desafío en ratones con Delta-*pgm* demostraron que posee una eficacia protectora similar a la de S-19 con la ventaja de que no genera anticuerpos anti-O detectables bajo ninguna de las técnicas serológicas de uso corriente (Ugalde *et al.*, 2003). Los ensayos de medición de citoquinas y de linfoproliferación demostraron que Delta-*pgm* genera una respuesta inmunológica celular del tipo TH-1, precisamente la que más conviene para el control eficiente de la brucelosis (Ugalde *et al.*, 2003). Con posterioridad se realizaron ensayos de inmunización en terneras sin vacunar y en terneras vacunadas previamente con S-19. En ambos casos, la vacunación con Delta-*pgm* no indujo títulos de anticuerpos anti-O, una característica esencial para evitar los problemas de diagnóstico (Comerci *et al.*, 2005).

En colaboración con el Dr. Phill Elzer, del Centro Agrícola de la Universidad del Estado de Louisiana (Louisiana State University-AgCenter) sito en Baton Rouge, Louisiana, EE. UU., se llevaron a cabo ensayos de colonización y seguridad en terneras y de evaluación del potencial patogénico de Delta-pgm en vaquillonas preñadas. Los resultados demostraron que la inoculación de Delta-pgm no generó patología típica de brucelosis. La cepa generó una colonización transitoria del animal pero fue completamente eliminada dentro de los 42 días de la inoculación; no se indujo respuesta serológica anti-O que interfiriera con los inmunodiagnósticos ordinarios aunque hubo una fuerte respuesta humoral contra antígenos proteicos detectable por Western blot y no se observó inducción de abortos ni colonización de las madres ni de las terneras. En conclusión, Delta-pgm demostró ser una cepa segura en estas condiciones de uso y apropiada para su evaluación como vacuna bovina.

En este trabajo se describen los resultados obtenidos en la primera prueba de evaluación de la eficacia protectora de la vacuna Delta-pgm contra la brucelosis bovina llevada a cabo, en el marco del convenio de colaboración científico tecnológica, entre técnicos de SENASA y el IIB-UNSAM-CONICET.

Materiales, métodos y diseño experimental

Animales

Se reclutaron 65 terneras cruce Aberdeen Angus x Hereford de 3-4 meses de edad provenientes de un campo de la provincia de Buenos Aires (Cuenca del Salado) sin historial de brucelosis y cuyas madres fueron controladas y resultaron negativas en la prueba tamiz para brucelosis BPA. El peso promedio del lote fue de 160 kg y la evaluación clínica indicó que las terneras se encontraban en buen estado sanitario. Los animales fueron confinados en potreros aislados, sin contacto con otros animales, dentro del campo experimental del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús, Universidad Nacional General de San Martín y CONICET (IIB-INTECH) localizado en Chascomús, provincia de Buenos Aires y durante todo el periodo de prueba estuvieron bajo inspección veterinaria periódica. Fueron alimentados a pasturas y suplementados con silaje y rollos según indicación profesional. Se les aplicó un plan sanitario convencional que incluyó vacunaciones para queratoconjuntivitis, complejo viral respiratorio, complejo viral reproductivo y leptospirosis; cobre Glypodin y desparasitación con antiparasitarios inyectables a base de ivermectinas y control periódico de los niveles de parasitosis por análisis coprológico.

El día de su admisión en el campo IIB-INTECH, los animales fueron individualizados mediante la aplicación de caravanas grandes y caravanas botón SENASA y, luego, tatuados en la oreja.

Grupos experimentales

Las 65 terneras fueron divididas al azar en los siguientes 4 grupos experimentales:

Grupo 1 (Testigo): no vacunados (14 animales)

Grupo 2 (S-19): vacunados a los 6 meses de edad con la cepa S-19 (17 animales)

Grupo 3 (Pgm I): vacunados a los 6 meses de edad con cepa vacunal Delta-pgm (17 animales)

Grupo 4 (Pgm II): vacunados a los 6 meses de edad cepa vacunal Delta-pgm y revacunados con dosis refuerzo de la misma cepa 15 días antes del servicio, aproximadamente a los 18 meses de edad (17 animales). El protocolo experimental fue sometido al análisis y aprobado por la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA).

Vacunaciones

A los 6 meses de edad, los animales del Grupo 2 fueron vacunados con la vacuna control S-19 y los animales de los Grupos 3 y 4 con la vacuna experimental Delta-pgm. Este día se consideró el Día 0 de la prueba. Se utilizó vacuna S-19 comercial controlada y conservada por el Senasa. Se aplicaron 2 ml de las vacunas correspondientes a cada grupo por vía subcutánea, utilizando jeringas descartables individuales. Se realizó un control previo y otro postvacunación de la cuenta viable por cultivo en placa de las dos vacunas utilizadas y se pudo confirmar que los animales del grupo 2 recibieron $1,7 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colonias (UFC) subcutánea de S-19 y los del grupo 3 y 4 recibieron $2,8 \times 10^{10}$ UFC de Delta-pgm. Una vez alcanzada la madurez sexual y el peso apropiado para la inseminación, aproximadamente a los 18 meses, los animales del grupo 4 (PGM II) recibieron una dosis refuerzo de la vacuna Delta-pgm. Se aplicaron 2 ml de vacuna por vía subcutánea en jeringas individuales y la cuenta viable post-vacunal arrojó que la dosis recibida fue de 3×10^{10} UFC. Quince días después de la revacunación, los animales fueron sometidos a maniobras de sincronización hormonal para realizar la Inseminación a Tiempo Fijo (IATF).

Controles serológicos

Se tomaron muestras de sangre de todos los animales en forma periódica a lo largo de toda la experiencia mediante punción yugular con tubos Vacutainer de 10 ml (BD). Los tiempos muestrales respecto del día 0 de la prueba fueron los días -75, 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 310, 490, 500, 515, 530, 650 y 790. Todos los sueros fueron analizados por el laboratorio de Brucelosis del DILAB-SENASA y se realizaron las pruebas estándar BPA, SAT, 2-ME, C-ELISA y FPA. Se consideraron positivas aquellas muestras que resultaron reaccionantes a la prueba tamiz (BPA) y al menos en dos de los tests confirmatorios: SAT (≥ 200) ME (>25), C-ELISA (>40) y FPA (>105).

Inseminación a tiempo fijo

Hacia el día 310 del experimento (18 meses de edad promedio), habiendo alcanzado todos los animales el peso adecuado y la madurez sexual, se realizaron maniobras de sincronización hormonal del celo y, posteriormente, inseminación artificial a tiempo fijo seguida del diagnóstico precoz de preñez por ultrasonografía a los 21 días. El procedimiento se llevó a cabo dos veces para maximizar la tasa de preñez con un intervalo no mayor a 30 días entre ellos. Posteriormente, por medio de tacto rectal y ecografía realizados a distintos tiempos post inseminación, se comprobó que a los 6 meses de la inseminación, 51 de los 65 animales estaban preñados, con una diferencia de no más de 30 días de gestación entre ellos.

Desafío con cepa de *Brucella* virulenta

El día 490 del inicio de la prueba (6 meses de preñez promedio), se trasladaron los animales preñados al campo experimental del Senasa ubicado en Azul, provincia de Buenos Aires, donde se realizó la última etapa de la experiencia. Debido a las restricciones de espacio disponible en el galpón de aislamiento, se seleccionaron al azar 31 animales preñados de los 4 lotes experimentales para realizar el desafío con cepa de *Brucella* virulenta según el siguiente esquema:

Grupo 1 Testigo / no vacunados (7)

Grupo 2 S-19 (9)

Grupo 3 Pgm I (7)

Grupo 4 Pgm II (8)

Estos animales fueron confinados individualmente en unidades separadas dentro del galpón de seguridad. El resto de los animales no participó en el ensayo de desafío y fueron confinados en un potrero hasta la finalización de las pariciones. Sobre este subgrupo se evaluó estatus de pariciones, análisis serológico y la bacteriología de la cepa vacunal en leche.

Los cuatro grupos de animales del ensayo, confinados en las unidades de seguridad, fueron desafiados con $1,08 \times 10^7$ UFC de *Brucella abortus* S2308 por vía intramuscular. La dosis del desafío fue confirmada mediante la cuenta viable post desafío realizada sobre el inóculo utilizado.

Pariciones

Luego del desafío con la cepa virulenta, todos los animales permanecieron confinados individualmente en las unidades de aislamiento dentro del galpón de seguridad hasta 8-10 días posteriores a la parición. Los animales fueron alimentados con rollos de avena y estuvieron bajo inspección veterinaria en forma diaria. Se registraron la fecha y la hora de parición (para calcular el tiempo de gestación), el sexo de los neonatos, su estado (mamó, se paró, etc.) y si hubo retención de placenta. Todos los partos ocurridos entre los 266 y los 290 días de gestación que resultaron en terneros viables se consideraron sanos o normales. A los fines del análisis, se agruparon en la categoría "parto anormal" a los ocurridos con anterioridad a los 266 días de gestación que resultaron en mortinatos, muertes perinatales o terneros viables que lograron pararse y mamar.

Estudios bacteriológicos

Todos los ensayos bacteriológicos fueron llevados a cabo en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3) del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde" IIB-UNSAM-CONICET.

Hemocultivos

A los 8, 19 y 34 días post desafío, se tomaron muestras de 15 ml de sangre estéril por punción yugular con tubos Vacutainer con Buffer citrato 0,129M (BD Systems) para realizar hemocultivos y 12 ml de sangre con tubos Vacutainer-Serum (BD Systems) para análisis serológico. Las muestras de sangre fueron inmediatamente enfriadas y transportadas al laboratorio para su análisis bacteriológico. Se sembraron 15 ml de sangre anticoagulada en botellas de cultivo tisular descartables de 75cm³ con medio bifásico selectivo Tryptic Soy Agar (TSA) y Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson) suplementado con ácido nalidixico 5 mg/l, polimixina B 6000U/l, bacitracina 5000U/ml, amphotericina B 1mg/l, vancomicina 20 mg/L y cicloheximida 100 mg/L (Alton, 1967).

Se incubaron las botellas a 37°C por el término de 20 días. Durante ese tiempo se las inspeccionó diariamente y se sembró, de la fase líquida por vuelco sobre la fase sólida, cada 48 horas. Las botellas en las que se observó desarrollo de colonias fueron separadas para posterior confirmación de *Brucella abortus* por bacteriología y PCR. Todas las muestras que no presentaron desarrollo de *Brucella* después de 20 días de incubación fueron registradas como negativas.

Bacteriología de órganos

Para determinar si los abortos y los partos prematuros fueron causados por la infección brucélica, se realizaron las necropsias y se tomaron muestras de tejido pulmonar, de bazo, de hígado y de líquido abomasal, que fueron colocadas en recipientes herméticos estériles e inmediatamente congeladas para su transporte al laboratorio. Se sembraron muestras de 10 g de los tejidos en botellas con el medio bifásico selectivo ya descrito y se procedió de la misma manera que con los hemocultivos.

Al realizarse las necropsias de las madres, se tomaron en forma aséptica ganglios retromamarios, los cuales fueron colocados en recipientes estériles y congelados inmediatamente para su transporte al laboratorio. El análisis bacteriológico se realizó por cultivo en medio bifásico tal como se describió anteriormente.

Bacteriología de leche

Se tomaron muestras de calostro de los cuatro cuartos de cada animal durante la primera semana del aborto / parto, mediante la técnica de extracción estéril con tubos Vacutainer (BD) por punción del pezón (Eduardo Bagnat, Comunicación personal: Técnica de SENASA desarrollada durante Control de Eficacia de la Vacuna RB 51). Sobre los animales que parieron terneros viables se tomaron además muestras de leche de los cuatro cuartos a los 15, 30 y 60 días postparto aproximadamente. Las muestras fueron inmediatamente congeladas y transportadas al laboratorio. Se mezclaron 4ml de cada cuarto de cada animal (16ml finales) y se sembraron botellas con medio bifásico selectivo tal como se describe arriba. Se registró el

desarrollo de colonias de *Brucella* durante 25 días de incubación a 37°C con re-siembra del medio sólido por vuelco cada 48 horas. Todas las muestras que resultaron positivas en el medio bifásico fueron también cultivadas en placas de Petri con medio selectivo Tryptic Soy Agar (TSA), individualmente por cuartos, para determinar la carga de *B. abortus* por ml de leche de cada cuarto.

Resultados

Serología

Todos los animales testigos (no vacunados desde el inicio del reclutamiento de las terneras) resultaron negativos al BPA hasta el momento del desafío con la cepa *B. abortus* S2308, momento a partir del cual se produjo seroconversión. Este resultado indica que los animales no estuvieron expuestos a estímulo antigénico alguno previo al desafío y demuestra que los resultados obtenidos son atribuibles a la inmunidad conferida por la vacunación y que no fueron afectados por posibles interferencias contingentes.

La vacunación de terneras con la cepa vacunal Delta-pgm indujo reacción positiva al BPA en el 17,64 % de los animales a los 30 días post vacunación (30 dpv). A los 60 dpv, estos valores se redujeron a 8,82 % de animales positivos y a cero a los 120 dpv. Respecto a C-ELISA, a los 30 dpv la vacunación con Delta-pgm generó 8,82 % de seroconversión transitoria, a los 60 el porcentaje se redujo a 2,94 % y desapareció a los 120 dpv. En cuanto a la prueba de FPA, solo 1 de las 34 terneras analizadas arrojó un valor de 102 mPU a los 30 dpv y no se observaron reactores a los 60 días.

En la revacunación de adultos con Delta-pgm se indujeron seroconversiones transitorias en un mayor porcentaje comparado con los animales del grupo Pgm I. A diferencia de lo que se observó luego de la primera dosis en terneras, la segunda dosis aplicada sobre adultos generó reacción positiva al BPA en el 94,11 % de los animales. Estos altos valores de seropositividad al BPA no fueron acompañados con seroconversión en igual proporción a los test SAT y 2ME. Solo el 11,77 % de los animales del lote mostró aglutinación en SAT con títulos ≥ 200 (positivo). El 76,47 % de las muestras presentó títulos aglutinantes en SAT $>50 <100$ (sospechosos) y ninguno presentó títulos positivos en 2ME (superiores a 1:25). Estos títulos fueron transitorios y todos los animales se seronegativizaron antes de los 6 meses post revacunación.

Al momento de realizarse el desafío con la cepa virulenta *B. abortus* S2308, todos los animales de los lotes experimentales resultaron negativos en la totalidad de los ensayos realizados. Tres semanas luego del desafío, todos ellos seropositivizaron. Dieron reacción positiva al BPA, títulos $>1:200$ en SAT y $>1:25$ en 2ME, lo cual indica que recibieron el desafío en forma efectiva.

Tres meses después de concluidos los partos / abortos (semana 85) se observó que el 26 % de los animales vacunados con Delta-pgm, tanto con una dosis como con dos, seronegativizaron en las pruebas BPA, SAT y FPA, y esta condición se mantuvo hasta el momento de la faena sanitaria (semana 105).

La figura 1 resume los resultados serológicos globales observados durante el transcurso de la prueba. Para simplificar las observaciones, se consideró positiva a la muestra que produjo aglutinación en la prueba tamiz BPA y que fue confirmada por al menos dos de las siguientes pruebas confirmatorias: SAT, 2ME, CELISA y FPA.

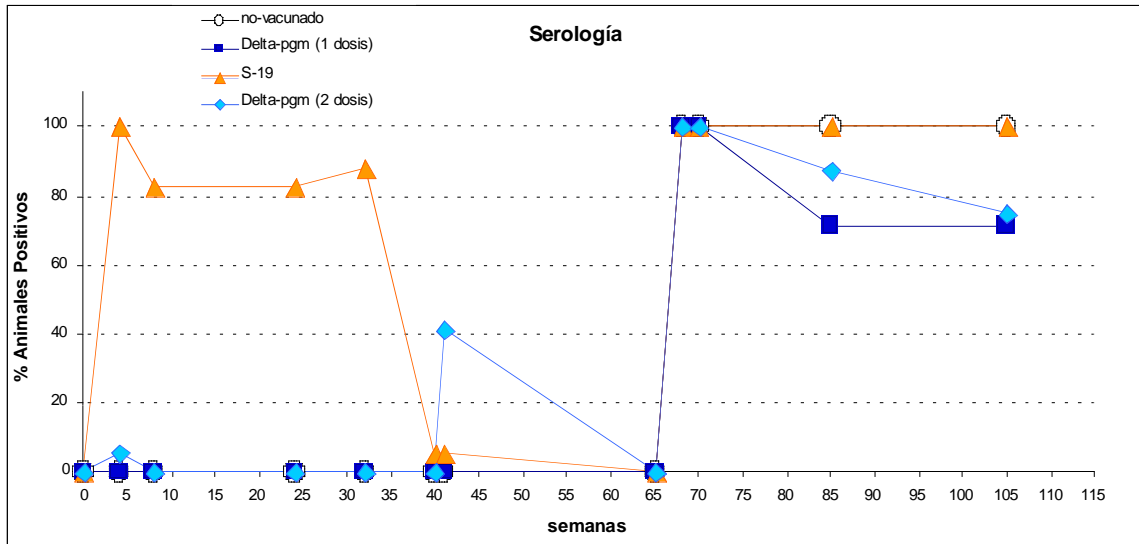


Figura 1. Perfiles Serológicos de los cuatro grupos experimentales.

Hemocultivos

A los 8, 19 y 34 días post desafío, se tomaron muestras de sangre para análisis bacteriológico por enriquecimiento y aislamiento de *Brucella* spp. en medio bifásico selectivo. Se logró aislar *B. abortus* S2308 en 6 de los 7 animales del grupo testigo sin vacunar (85,7 %) en alguno de los tres tiempos muestrales, mientras que, entre los vacunados, se la aisló en 2 de los 7 animales del grupo Pgm I, en 1 de los 9 que recibieron S-19 y en ninguno de los que recibieron la vacuna Delta-pgm en dos dosis. En la tabla 1 se muestran los resultados de este análisis en forma desagregada para cada tiempo muestral. Solo los grupos que recibieron la vacuna S-19 y la vacuna Delta-pgm en dos dosis mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control sin vacunar, pero no presentaron diferencias significativas entre ellos (t-test, 99 % IC).

Tabla 1. Proporción de animales con hemocultivo positivo respecto del total de animales (%) en diferentes momentos posteriores al desafío

Grupo	8 días p.d.	19 días p.d.	34 días p.d.
Testigo	1/7 (14,3 %)	5/7 (71 %)	2/7 (28,6 %)
Pgm I	1/7 (14,3 %)	2/7 (28,6 %)	1/7 (14,3 %)
S-19	0/9 (0 %)*	0/9 (0 %)*	1/9 (11,1 %)*
Pgm II	0/8 (0 %)*	0/8 (0 %)*	0/8 (0 %)*

* $P < 0,01$

Pariciones

El uso de la técnica de inseminación artificial a tiempo fijo permitió sincronizar las gestaciones y determinar en forma precisa los tiempos de gestación, de forma tal que sea una variable cuantificable del ensayo. En consecuencia, se registraron las fechas y tiempos de gestación y de parición para todos los animales luego del desafío. El análisis global de frecuencias de parición, independientemente del grupo experimental, indicó que el 54,84 % de los partos ocurrió en el lapso de 265-289 días de gestación y en todos los casos se obtuvieron terneros sanos y viables. El 45,16 % de las restantes pariciones ocurrieron entre el lapso 215-254 días de gestación y en este grupo se observaron todos los abortos y las muertes perinatales, así como los cuatro partos prematuros de terneros viables. Este dato es un buen indicador de que la sincronización de las gestaciones permite utilizar el tiempo de gestación como una variable cuantificable del ensayo.

Los tres grupos que recibieron las distintas vacunas fueron los que mostraron las medianas de los días de gestación dentro del rango normal (entre 268 y 288 días en esta experiencia). La mediana de gestación mas alta la presentó el grupo Pgm II, que recibió la vacuna Delta-pgm en dos dosis (275,5±14 días), seguido por el grupo que recibió la vacuna S-19 (269±15 días) y el grupo que recibió la vacuna Delta-pgm en una dosis (268±16 días). El grupo testigo (sin vacunar) presentó una mediana de 239±23 días, lo que resalta claramente el efecto patológico de la infección brucélica sobre el desencadenamiento del parto prematuro (Figura 2).

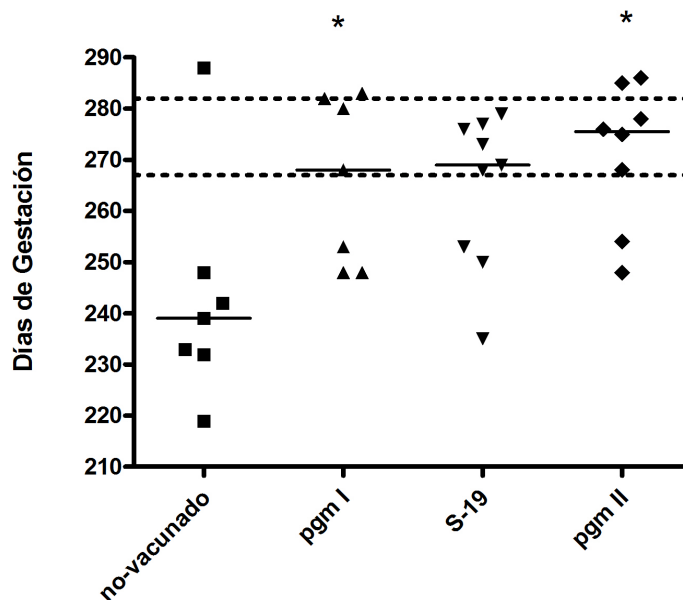


Figura 2. Tiempos de gestación. En el gráfico se representan los tiempos de gestación para cada animal de cada grupo experimental. Las líneas punteadas indican el intervalo de tiempo de parición considerado normal (268-288 días). Solo las medianas de los tiempos de gestación de los tres grupos vacunados se encuentran dentro de este intervalo.

* $p < 0,05$.

La tabla 2 muestra el análisis de los resultados de los nacimientos agrupados en dos categorías: normales, cuando las pariciones ocurrieron después de los 266 días de gestación dando terneros viables que se pararon y mamaron, o Anormales, cuando los partos ocurrieron antes del día 266 de gestación independientemente del estatus del ternero (viable, mortinato o con muerte perinatal). Solo el grupo que recibió dos dosis de Delta-pgm mostró diferencias significativas comparado con el grupo testigo (Test de Fisher, $p < 0,05$). Si bien el grupo S-19 no mostró diferencias significativas con el grupo control, esto se debe muy probablemente al bajo número de individuos por grupo. A pesar de ello se puede observar una clara tendencia hacia los partos normales en los grupos S-19 y Pgm I, lo cual indica que también en ellos hubo un claro efecto protectorio.

Tabla 2. Agrupamiento de los partos según las categorías normales y anormales.

Partos		
	Anormales (%)	Normales (%)
Testigo	6/7 (85,7)	1/7 (14,3)
Pgm I	3/7 (42,9)	4/7 (57,1)
S-19	3/9 (33,4)	6/9 (66,6)
Pgm II	2/8 (25,0)	6/8 (75,0)

Excreción de *B. abortus* en leche y análisis bacteriológico de ganglios retromamarios

Al finalizar las pariciones se tomaron muestras de calostro y de leche para determinar el número de animales excretores y la cantidad bacterias eliminadas.

Como se muestra en la tabla 3, todos los animales del grupo testigo (sin vacunar) eliminaron *B. abortus* en alguno de los momentos en que se tomaron las muestras. Los individuos de los grupos vacunados presentaron, en conjunto, valores menores de excretores, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, a excepción del grupo vacunado con S-19, que sí las presentó respecto del testigo (Test de Fisher). Al analizarse la cantidad de bacterias eliminadas en leche en forma acumulada durante los 7, 15, 20 y 30 días post parto se observó que los grupos Delta-pgm II y S-19 mostraron diferencias significativas respecto a los grupos testigo y Delta-pgm I, con escasos recuentos de células viables de *B. abortus* por mililitro de leche.

Tabla 3. Excreción de *B. abortus* en leche

Grupo	Proporción de animales excretadores respecto del total (%)	UFC acumuladas/ml leche	Cantidad de animales con ganglios positivos (%)
Testigo	7/7 (100,0)	>1000	4 (57,1)
Pgm I	4/7 (57,0)	>1000	5 (71,5)
S-19	4/9 (44,0)*	300*	4 (44,4)
Pgm II	5/8 (62,5)	90*	2 (25,0)

* $P < 0,01$

Durante las necropsias de las vaquillonas se tomaron muestras de ganglios retromamarios que fueron analizadas mediante cultivo en medio de enriquecimiento bifásico selectivo y por cultivo directo en placas de agar selectivo. Todas las muestras de ganglios retromamarios que resultaron positivas correspondieron a animales que presentaron bacteriología positiva de leche o calostro. Sin embargo, 3 animales del grupo testigo y 3 del grupo Pgm II de los que se aisló *B. abortus* de leche resultaron negativos al analizar los ganglios retromamarios en dos oportunidades. Dado que la faena se realizó cinco meses después de la última toma de leche, cabe la posibilidad de que en ese período los animales hayan logrado eliminar la bacteria al menos de esos ganglios, lo que explicaría la falta de correlación entre estas muestras.

Conclusiones y discusión

En este trabajo se informan los resultados de la evaluación de la eficacia protectora en bovinos de la cepa vacunal Delta-pgm bajo un modelo de infección y desarrollo de la enfermedad en condiciones experimentales controladas. La vacuna Delta-pgm fue aplicada en dos modalidades, una dosis en terneras (Pgm I) y dos dosis, la primera en terneras y un refuerzo en adultos pre-servicio (Pgm II), y ambos grupos de animales fueron comparados con otros dos: un testigo sin vacunar y otro vacunado con S-19, que es la vacuna de referencia para la brucelosis bovina.

Con el objeto de minimizar las variables fuera de control que pudieran afectar el desarrollo de la prueba y complicar la interpretación de los resultados, se aseguraron dos condiciones relevantes. Por un lado, se escogió para el desafío con la cepa virulenta *B. abortus* S2308 la vía de inoculación intramuscular. Esta vía asegura que todos los animales reciban la misma dosis infectiva, y permite reducir, así, potenciales heterogeneidades que pueden darse al usar otras vías, como la conjuntival. Por otro lado, el uso de la sincronización hormonal y la inseminación a tiempo fijo con semen de un único toro permitió contar con un lote de animales preñados que, al momento del desafío, tenían el mismo tiempo de gestación y uniformidad genética paterna.

La seroconversión observada a los 21 dpd en la totalidad de los animales de la prueba, el aislamiento de *B. abortus* en los hemocultivos de 6 de los 7 animales del grupo testigo sin vacunar y la correlación entre el tiempo de gestación y el estatus de la parición son claros indicadores de la importancia de escoger un diseño metodológico apropiado que permita reducir variables fuera de control en este tipo de experiencias.

La observación del desarrollo de la infección y de la enfermedad se llevó a cabo mediante diversos indicadores.

Serología: Los datos de serología mostraron que la vacunación de terneras a los 6 meses de edad con vacuna Delta-pgm no generó títulos de anticuerpos anti-LPS persistentes. La revacunación de adultos pre-servicio con cepa Delta-pgm generó títulos anti-LPS transitorios que desaparecieron dentro de los 4-6 meses posteriores a la revacunación. Debido a que la cepa vacunal Delta-pgm es capaz de sintetizar el antígeno O pero no puede ensamblarlo al lípido A y, por lo tanto, carece de LPS en fase lisa, este resultado es esperable (Ugalde *et al.*; 2000).

Bacteriemia: Este parámetro representa la primera etapa de la enfermedad y su generalización. Se ha registrado que su presencia y su magnitud están relacionadas con la ocurrencia del aborto o del parto prematuro. Los datos de los hemocultivos indican que los grupos S-19 y Pgm II presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del testigo sin vacunar. Lo opuesto sucedió con el Pgm I: a pesar de que solo 2 animales de 7 resultaron positivos (contra 6 de 7 en el testigo), estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas, posiblemente debido al bajo número muestral.

Tiempo de gestación y pariciones: Estos parámetros ponen de manifiesto una de las consecuencias más características de la brucelosis, debido a que la bacteria coloniza los tejidos placentarios y fetales y desencadena partos prematuros y en muchos casos la expulsión del feto muerto (aborto). Los tres grupos vacunados mostraron los mayores tiempos de gestación respecto del grupo testigo sin vacunar, lo que refleja el efecto protector de las vacunas ensayadas. El grupo S-19, al igual que el grupo Pgm I, si bien presentan una clara tendencia en el parámetro de partos normales / partos anormales, no alcanzaron a mostrar que estas diferencias sean estadísticamente significativas, posiblemente por el bajo número muestral y las condiciones de alta infectividad del ensayo. Solo el grupo Pgm II presentó diferencias significativas respecto al testigo.

La distribución de los tiempos de gestación (Figura 2) demuestra claramente que todas las medianas de los grupos vacunados se ubican dentro de los períodos de tiempo de los partos normales, mientras que en el testigo solo uno de los animales ubicados en el estrato superior de su mediana se encuentra como parto normal.

Por otro lado, al analizar el estatus de las pariciones se observa nuevamente que los tres grupos que recibieron las vacunas presentaron la menor proporción de mortinatos y partos

prematuros de terneros viables respecto al control, en el cual solo 1 de 7 animales presentó un tiempo de gestación normal de 288 días dando un ternero sano. Sin embargo, posiblemente debido al bajo número muestral, solo el grupo Pgm II mostró diferencias estadísticamente significativas respecto del testigo.

Eliminación de *Brucella* en leche y colonización de ganglios mamarios: Este parámetro refleja el estado de infección y suele presentar una serie de variaciones que es necesario atender, ya que la eliminación de *Brucella* en leche puede ser intermitente, localizarse en uno o todos los cuartos, variar en las cantidades eliminadas y modificar estas situaciones de manera dinámica conforme a la evolución de la enfermedad, al individuo y a su inmunidad. Para reducir esta variabilidad, este diseño experimental involucró la toma de muestras asépticas de los cuatro cuartos de cada animal durante la primera semana luego de la parición y a los 15, 30 y 60 días de esta. Los grupos vacunados tuvieron porcentajes de animales excretores sensiblemente menores respecto del testigo, en el que la totalidad de los animales excretaron la bacteria en alguno de los tiempos muestrales, lo que marca el efecto protector de las vacunas. Entre los grupos vacunados, el que recibió S-19 presentó el menor porcentaje de excretores y fue el único que tuvo diferencias significativas con el testigo. Sin embargo, tanto el grupo vacunado con S-19 como el vacunado con Delta-pgm en dos dosis presentaron diferencias significativas en el recuento acumulado de colonias en todos los tiempos muestreados, lo que indica la eficacia de estas vacunas para reducir la liberación del patógeno en leche.

Los resultados de los distintos parámetros analizados aisladamente arrojaron valores a favor de los tres grupos vacunados que, en algunos casos, mostraron diferencia estadísticamente significativa respecto del testigo, al pesar de la limitación numérica de la prueba. El hecho de que todas esas diferencias se hayan presentado sistemáticamente a favor de los grupos vacunados muestra una coherencia interna compatible con la protección inducida por las vacunas ensayadas.

En términos de eficacia protectora, el tratamiento con dos dosis de la vacuna Delta-pgm, resultó al menos igual al de la vacuna S-19. La vacunación con una o dos dosis de Delta-pgm no generó abortos, partos prematuros ni otro signo compatible con los síntomas característicos de la brucelosis, lo que indica que la cepa es atenuada y segura para el uso tanto en terneras como en bovinos adultos no gestantes. Si bien los datos obtenidos hasta el momento indican que la vacuna Delta-pgm inoculada sobre hembras en el sexto mes de preñez no induce abortos, es necesario ampliar estos estudios con un mayor número de animales a fin de establecer las posibles restricciones de uso.

Los datos experimentales existentes permiten afirmar que la vacuna Delta-pgm es estable e incapaz de revertir a la forma lisa virulenta. Esto se basa tanto en la naturaleza de la delección del gen *pgm* generada en esta cepa (delección de más del 60 % de la secuencia codificante sin

introducción de material genético foráneo ni de genes de resistencia a antibióticos), como en la falta de evidencias científicas sobre la capacidad natural de intercambiar y recombinar material genético exógeno entre los miembros del género *Brucella* y a los datos de laboratorio existentes sobre estabilidad de la cepa Delta-pgm después de diez años de repiques y subcultivos reiterados tanto *in vitro* como *in vivo* mediante pasajes por ratones de experimentación.

La vacunación con una o dos dosis de la cepa Delta-pgm no generó la liberación de esta en leche ni una infección persistente. Se produjo un *clearance* propio de las cepas vacunales atenuadas.

En conjunto, estos datos indican que la cepa *B. abortus* Delta-pgm no genera títulos anti-LPS persistentes aun aplicada en más de una dosis en hembras adultas y confiere protección contra la brucelosis bovina.

Bibliografía

- Alton, G. G. y L.M. Jones (1967), *Laboratory techniques in brucellosis*, World Health Organization.
- Arellano-Reynoso, B.; Lapaque, N.; Salcedo, S.; Briones, G.; Ciocchini, A. E.; Ugalde, R.; Moreno, E.; Moriyon, I. y J. P. Gorvel (2005), "Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival", *Nature Immunology*, Vol. 6, pp. 618-625.
- Bagnat, E. y J. C. Manetti (2000), "Proof of efficacy of the RB51 and strain 19 antibrucellosis vaccines in cattle", *Revista de Medicina Veterinaria* (Buenos Aires), Vol. 81, N.º 6, pp. 428-429.
- Briones, G.; Iñón de Iannino, N.; Rosset, M.; Vigliocco, A.; Silva Paulo, P., and R. A. Ugalde (2001), "*Brucella abortus* Cyclic beta-(1-2)-Glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells", *Infect. Immun.*, Vol. 69, pp. 4528-4535.
- Comerci, D. J.; Ugalde, J. E. y R. A. Ugalde (2005), "Development of a new live rough vaccine against bovine brucellosis", en Makkar, H. P. S. y G. J. Viljoen (eds.), *Applications of Gene-Based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries*, Springer.
- Corbel, J. M. (1997), "*Brucellosis*: an overview", *Emerg. Infect. Dis.*, Vol. 2, pp. 213-221.
- Moreno, E.; Stackebrandt, E.; Dorsch, M.; Wolters, J.; Busch, y H. Mayer (1990), "*Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationships with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria", *J. Bacteriol*, Vol. 172, pp. 3569-3576.
- Nicoletti, P. (1990), "Vaccination", en Nielsen, K. and J.R. Duncan (eds.), *Animal brucellosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., pp. 283-299.
- Schurig G. G., Sriranganathan N., Corbel M. J. (2002), "Brucellosis vaccines: past, present and future", *Vet Microbiol* 90 (1-4), pp. 479-96.

- Sutherland, S. S. y J. Searson (1990), "The immune response to *Brucella abortus*: the humoral immune response", en K. Nielsen and J. R. Duncan (eds.), *Animal brucellosis*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, pp. 65-81.
- Ugalde, R. A. (1999), "Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts", *Microbes Infect*, Vol.1, pp. 1211-1219.
- Ugalde, J. E.; Czibener, C.; Feldman, M. F. y R. A. Ugalde (2000). "Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication", *Infect Immun*, 68, pp. 5716-5723.
- Ugalde J. E.; Comerci, D., Leguizamón S., y R. A. Ugalde (2003), "Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live-rough vaccine", *Infect. Immun*, 71, pp. 6264-6269.

Agradecimientos

Agradecemos muy especialmente a los doctores Ana María Nicola, Sebastián Elena y Bernardo Alonso del SENASA por su colaboración en los análisis serológicos y bacteriológicos así como en el manejo de los animales. Agradecemos también la colaboración del Dr. Jorge Esteves Madero de SENASA quien nos asistió con los análisis estadísticos.