

RESPUESTA INMUNE DE TOROS VACUNADOS CON CEPA RB51 DE *Brucella abortus*

Immune Response in Bulls Vaccinated with *Brucella abortus* Strain RB51

Sergio Rivera², Francisco Vargas¹, Gerardo D'Pool², Oswaldo Vale Echeto², Milagros Montiel³ y Gerhardt Schuring⁴

¹Dpto. de Medicina y Cirugía, Decanato de Cs. Veterinarias, Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela.

²Dpto. de Enfermedades Infecciosas, Dpto. Médico Quirúrgico, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia.

³Cátedra de Prácticas de Inmunología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

⁴College of Veterinary. Virginia Tech Polythecnic. USA.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de la vacunación de toros adultos con la cepa RB51 de *Brucella abortus* sobre la respuesta inmune humoral y celular. Para el estudio fueron seleccionados 20 toros mestizos de razas cebuinas, con una edad promedio de 3 años, de la zona sur del lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Los animales fueron divididos en dos grupos: Un grupo (n= 10) recibió una dosis simple de 10 mil millones de UFC de cepa RB51 de *Brucella abortus* en 2 mL por vía subcutánea y otro grupo (n= 10) no recibió vacunación. Los toros fueron muestreados cada 15 días para diagnóstico serológico con pruebas tradicionales de brucelosis (Rosa de Bengala, Aglutinación en placa y en tubo, 2-Mercaptoetanol y ELISA competitivo). A los 70 días post vacunación los animales fueron muestreados para medir la respuesta celular con la prueba de transformación linfoblástica frente a diferentes antígenos de la cepa RB51. No se observó respuesta de anticuerpos en ninguna de las pruebas de diagnóstico serológico tradicionales y los animales vacunados mostraron niveles significativamente mayores de respuesta inmune celular (P<0,05) que los animales no vacunados, especialmente para el antígeno 18 KDa de RB51. Por lo tanto, se puede concluir que el uso de la cepa RB51 de *Brucella abortus* en toros a una dosis simple de 10 mil millones UFC/mL, no induce la formación de anticuerpos que interfieran con las pruebas de diagnóstico serológico para la infección por brucelosis y produce una buena respuesta celular protectora.

Palabras clave: Toros, RB51, *Brucella abortus*, respuesta humoral y celular.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the effect of vaccinating adult bulls with *Brucella abortus* strain RB51 on body fluid and cellular response. Twenty mixed blooded Zebu bulls with an average age of 3 years were selected in the South Maracaibo Lake region, Zulia state, Venezuela. The animals were divided into two groups. Group 1 (n=10) received a simple dose of 10,000,000,000 UFC of RB51 in a 2mL subcutaneous injection and the other group (n=10) was not vaccinated. The bulls were sampled every 15 days in a serological diagnosis with traditional brucellosis tests (Rosa de Bengala. Agglutination on slides and in test tubes, 2-Mercaptoethanol and competitive Elisa). After 70 days of vaccination the animals were sampled to measure the cellular response with the lymphoblastic transformation test with different antigens of the RB51 strain. No antibody response was observed in any of the traditional serological diagnostic tests and the vaccinated animals showed significantly higher levels of cellular immune response (P<0.05) than the non-vaccinated animals, especially in relation to the 18Kda antigen of RB51. For this reason it can be concluded that the use of *Brucella Abortus* strain RB51 at a dose level of 10 billion UFC/mL, does not induce the formation of antibodies that interfere with the serological diagnostic tests for brucellosis infection and does produce a good cell protection response.

Key words: Bulls, RB51, *Brucella abortus*, body fluid and cell response.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta al hombre y a las diferentes especies animales, especialmente al bovino, constituyendo una zoonosis de importancia económica y para la salud

pública mundial [1]. La especie *Brucella abortus*, causante de la enfermedad en bovinos, es la que mayores pérdidas económicas ha producido a la ganadería a nivel mundial y se caracteriza por producir en esta especie, abortos en el último tercio de la gestación, cifras elevadas de infertilidad, nacimiento de crías débiles y orquitis en machos con eliminación de la bacteria a través del semen [9].

La transmisión a los humanos, ocurre especialmente por el contacto directo con fetos abortados, placentas y secreciones provenientes de animales infectados. La ruta de infección puede ser por lesiones en la piel, a través de la conjuntiva u otras membranas mucosas, el consumo de productos lácteos no pasteurizados y la inhalación de aerosoles conteniendo el microorganismo [26].

La eliminación de animales reactivos positivos, basada en las pruebas de diagnóstico serológico, es sin duda la medida más efectiva para el control y erradicación de la enfermedad en el rebaño [6]. Sin embargo, se presenta el inconveniente de la interferencia de anticuerpos vacunales con las pruebas de diagnóstico convencionales, ya que la vacunación con cepa 19 induce la formación de anticuerpos contra el antígeno "O" del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de la bacteria y las pruebas tradicionales de diagnóstico utilizan como antígeno este mismo LPS, por lo que no es posible diferenciar animales vacunados de infectados [23, 28].

Diferentes estudios han tratado de resolver el inconveniente de interferencia con las pruebas serológicas, por lo que se han desarrollado cepas mutantes rugosas, las cuales son deficientes en el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de la bacteria, que es el antígeno inmunodominante hacia el cual va dirigido principalmente la respuesta humoral medida en estas pruebas. Entre estas cepas se encuentra la RB51, la cual ha sido probada con efectividad en hembras bovinas, con excelentes resultados en cuanto a la protección contra la enfermedad sin interferencia con las pruebas de diagnóstico convencionales [19].

En estudios experimentales, la RB51 ha demostrado ofrecer una adecuada protección contra *B. abortus* en modelos experimentales en ratones [39] y en cabras [24]. Además es capaz de proveer protección contra infección y aborto en vacas [5]. Los resultados a nivel de campo demuestran también que la vacuna confiere una adecuada protección en bovinos en fincas con alta y baja prevalencia de la enfermedad [15]. Su uso en vacas preñadas, ha demostrado que la vacuna no induce aborto aun cuando sea utilizada por vía intravenosa en forma experimental [21]. Por lo tanto, su empleo en vacas adultas preñadas es bastante seguro cuando se aplica por vía subcutánea y a 1/10 de la dosis recomendada para becerras [22].

En Venezuela, ya ha sido aprobada la importación de la vacuna RB51, por lo que se hace necesario realizar diferentes estudios a fin de determinar la efectividad de la misma en nuestras condiciones y determinar los usos que se le puedan dar a la misma dentro del programa de control y erradicación

de la enfermedad en nuestro país [41]. Hasta ahora, sólo ha sido realizado en nuestro país un trabajo de investigación con el uso de esta cepa en la vacunación de bovinos en fincas de alta y baja prevalencia de la enfermedad [15] obteniéndose resultados positivos en la prevención de la enfermedad.

Con relación al uso de la vacuna en toros, existe hasta el presente sólo un trabajo de investigación publicado donde se midió el grado de colonización de la cepa en órganos reproductivos y la excreción, a través del semen, por un periodo de 5 semanas postvacunación, en 6 toros [10].

El objetivo de este estudio fue medir la respuesta inmune en toros adultos vacunados con cepa RB51 de *B. abortus*. Se propuso determinar si la vacuna genera anticuerpos que interfieran con las pruebas de serología tradicional y ELISA competitivo y medir la respuesta celular frente a diferentes antígenos aislados de la cepa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los animales

De la población en estudio, se tomó una muestra aleatoria de 20 bovinos machos raza mestizo cebú, con una edad promedio de 30 meses (entre 24 y 36 meses de edad), con un peso promedio de 470 kg, libres de brucelosis y otras enfermedades infectocontagiosas, pertenecientes a un rebaño comercial, en una finca con alta prevalencia de brucelosis ubicada en Santa Bárbara del Zulia, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela.

Asignación por grupos y vacunación

- Grupo vacunado (n= 10): Recibió una vacunación simple con cepa rugosa RB51 de *B. abortus* a una dosis de 10 a 14 mil millones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en 2 mL por vía subcutánea.
- Grupo control (n= 10): No recibieron ninguna vacunación.

Histopatología de los órganos genitales

Al final del experimento (90 días postvacunación), los animales fueron sacrificados y se le extrajeron testículos, epidídimos y linfonódulos ilíacos e inguinales. Se realizó el estudio macroscópico de estos órganos y se obtuvieron muestras para exámenes histopatológicos, realizándose cortes por separado de los testículos derecho e izquierdo; epidídimo derecho e izquierdo y linfonódulos ilíacos e inguinales derecho e izquierdo. Luego de separar los epidídimos se realizó un corte medio sagital de cada testículo iniciándose en el polo superior, observándose la consistencia al corte, para realizar luego cortes transversales de 1 cm de grosor incluyendo la extremidad dorsal, media y ventral de cada testículo. Los cortes fueron procesados usando las técnicas estándares de preparación de tejidos para microscopía óptica. Secciones de 3 a 5 mm fueron

cortadas de cada bloque de parafina y teñidas con coloración de Hematoxilina-Eosina (HE) [13, 40]. Algunas muestras para histopatología fueron procesadas para tinciones especiales como Von Kossa, para determinar mineralización o calcificación de tejidos, Zhiel Neelsen para descarte de bacilos ácido alcohol resistentes (*Mycobacterium* spp) y Grocott para observación de hifas de hongos [14].

Evaluación de la respuesta inmune celular

La respuesta inmunológica celular es medida "in vitro" a nivel de laboratorio a través de técnicas de cultivo celular de linfocitos, en los cuales se mide la capacidad de respuesta de los mismos a diferentes mitógenos y antígenos [2].

Test de transformación linfoblástica

Se realizó primero una estimulación inespecífica de linfocitos T y B de sangre periférica con fitohemaglutinina (PHA) para evaluar el grado de respuesta celular de los linfocitos ya activados por la vacuna [20, 22, 32, 33].

Para realizar la prueba, se siguió el procedimiento señalado por Oppenheim y Schecter [20]. Se separaron mediante gradiente de flotación en Ficoll-Hypaque, las células mononucleares que incluyen linfocitos B y T y algunos monocitos, los cuales se expusieron, en cultivo celular con los requerimientos nutricionales necesarios (medio de cultivo RPMI-1640), al estimulante antes mencionado, dando como resultado un aumento en la síntesis de ADN. Este ADN fue marcado con isótopos radiactivos como la Timidina tritiada, el cual tiene una alta afinidad de unión al mismo. Luego se separó el ADN del resto de los elementos formes celulares usando un aparato "cosechador de células" pudiéndose medir la cantidad de ADN formado a través de un contador de rayos Beta.

Cada prueba se montó por triplicado de la manera siguiente: A 10 μ L de PHA de cada concentración se le agregaron 100ul de una suspensión de linfocitos (1×10^6 /mL) en medio RPMI 1640 adicionado de 5% de Suero de Ternera Fetal y 0,1% antibióticos (Penicilina-Estreptomicina), en placas a fondo redondo y colocadas a 37°C en estufa al 5% de CO₂ controlado por 48 horas, momento en el cual se le agregaron 10 μ L de ³H Timidina a razón de 2 μ Ci/pozo durante 24 horas para posterior extracción de ADN y conteo en un Contador marca Betman. Los resultados, obtenidos en Cuentas por minuto (CPM) fueron expresados como Índice de estimulación (IE), los cuales son una medida indirecta de proliferación celular.

$$IE = \frac{\text{CPM experimento (con mitógeno)}}{\text{CPM espontáneo (sin mitógeno)}}$$

La estimulación específica se realizó utilizando antígenos completos (no fraccionados) de la cepa RB51 obtenidos por inactivación con calor (45°C por 30 minutos) de una suspensión de bacterias vivas de la cepa vacunal según el procedimiento señalado por Edmons y col. [10].

Así mismo, se realizó la estimulación con tres diferentes antígenos proteicos fraccionados obtenidos de la pared celular de la cepa RB51 como son: una proteína de 18 KDa, una Superóxido Dismutasa (SOD) y una denominada YajC, las cuales fueron suministradas en forma de liofilizado por el Dr Gerhardt Schurig (Virginia Polytechnic and State University) para ser probados como antígenos estimulantes de respuesta celular.

A estos antígenos se les practicó una curva dosis respuesta utilizando diluciones de 1; 2,5; 5 y 10 μ g/mL, seleccionándose la dilución con mayor respuesta para cada uno de los antígenos. Cada antígeno se montó por triplicado de la manera siguiente: A 10 μ L de antígeno de cada concentración se le agregaron 100 μ L de una suspensión de linfocitos (1×10^6 /mL) en medio RPMI 1640 adicionado de 5% de Suero de Ternera Fetal y 0,1% antibióticos (Penicilina- Estreptomicina), en placas a fondo redondo y colocadas a 37°C en estufa al 5% de CO₂ controlado por 7 días, momento en el cual se le agregaron 10 μ L de ³H Timidina a razón de 2 μ Ci/pozo durante 24 horas para posterior extracción de ADN y conteo en un Contador B marca Betman. Los resultados, obtenidos en Cuentas por minuto (CPM) fueron expresados como Índice de estimulación (IE).

Evaluación de la respuesta humoral

A fin de determinar si la vacunación con cepa RB51 de *B. abortus* induce la formación de anticuerpos que interfieren con las pruebas de diagnóstico tradicionales para brucelosis y para determinar la ocurrencia de infecciones por *Brucella* de campo, se evaluó la respuesta humoral en el transcurso del experimento frente a diferentes pruebas que miden anticuerpos contra el antígeno O del lipopolisacárido de la pared celular de la bacteria (S-LPS) como fueron: La prueba rápida en placa, lenta en tubo, Rosa de Bengala (Card test) y 2-mercaptoetanol y ELISA competitivo.

La prueba rápida en placa, fue utilizada por ser la prueba oficial para el diagnóstico de brucelosis en nuestro país. El procedimiento de la prueba se llevó a cabo según lo señalado en el boletín técnico de la FAO/WHO, 1972 [11]. Se consideraron como reacciones sospechosas las aglutinaciones incompletas a partir de la dilución 1/50 y como positivas las aglutinaciones completas a partir de una dilución 1/100 [11].

Las pruebas de Rosa de Bengala (Card test) y 2-Mercaptoetanol son pruebas sencillas usadas en nuestro país como pruebas complementarias para el diagnóstico de Brucelosis. Ambas pruebas fueron realizadas siguiendo el procedimiento señalado en el boletín de la FAO/WHO [11]. Se consideraron como muestras positivas en Rosa de Bengala aquellas que presentaron cualquier aglutinación observable en la prueba y para 2-Mercaptoetanol aquellas aglutinaciones completas a partir de una dilución 1/100 [11].

La prueba de aglutinación en plasma seminal se llevó a cabo según el procedimiento señalado por Manthei y col. [16]. Para esto, se centrifuga el semen de modo que el esperma y

otras partículas sedimenten y el material sobrenadante (plasma) se utiliza para realizar las pruebas estándar en placa o tubos.

La prueba de ELISA, por otra parte, mide anticuerpos clase IgG₁, aunque éstos se encuentren en muy bajos niveles en el suero y no sean perceptibles por otras pruebas [42]. De las pruebas de ELISA disponibles para diagnóstico de brucelosis, existe un ELISA indirecto que tiene una alta sensibilidad pero baja especificidad [3, 8, 17] y un ELISA competitivo de alta sensibilidad y especificidad [18, 37, 30]. En el presente trabajo se utilizó un ELISA competitivo por su capacidad para detectar mejor los animales negativos con bajo porcentaje de falsos positivos, los cuales se pueden presentar por vacunación antibrucélica o por infecciones con otros gérmenes Gram negativos.

El inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA-C) para detección de anticuerpos en suero contra brucelosis se realizó siguiendo el procedimiento del fabricante Svanova Biotech [36].

El procedimiento de la prueba de ELISA competitivo está basado en un inmunoensayo en fase sólida, en el cual las muestras de suero son expuestas a un antígeno lipopolisacárido de *B. abortus* lisa (S-LPS) unido al fondo de los pozos de una microplaca de poliestireno, conjuntamente con la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para un epítipo sobre una porción del polisacárido O del antígeno S-LPS. Después de la incubación, la microplaca es lavada y se agrega un conjugado formado por un anticuerpo contra IgG de ratón obtenido en cabras ligado a una enzima peroxidasa, el cual se une a cualquier anticuerpo monoclonal que se haya fijado al S-LPS de la placa. El material no unido a la placa es removido por lavado, seguido por la adición de una solución de sustrato (peróxido de hidrógeno). El desarrollo de color es debido a la conversión del sustrato por el conjugado. La densidad óptica de esta reacción es medida en un fotómetro de microplacas a 450 nm. En ausencia de anticuerpos contra *Brucella* en el suero problema o en el control negativo, los anticuerpos monoclonales se unen al epítipo en el polisacárido O del antígeno S-LPS con la consecuente formación de color por la reacción del conjugado y sustrato. Si el suero problema o control positivo contiene anticuerpos específicos contra *Brucella*, estos compiten con el anticuerpo monoclonal por los epítopes del S-LPS, inhibiendo su unión al epítipo del polisacárido O en el antígeno S-LPS y la formación de color por la reacción del conjugado y sustrato.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se basó en la comparación de los grupos vacunados y control para determinar si existen diferencias significativas entre ellos debidas a la vacuna. Los resultados de los hallazgos clínicos e histopatológicos, fueron analizados mediante tablas de 2 x 2 para determinar asociación estadística entre los grupos vacunado y control por prueba de Ji cuadrado y cálculo del riesgo relativo (RR) [7].

RESULTADOS

A 90 días post-vacunación no se encontraron aislamientos positivos a *Brucella*.

El estudio anatomopatológico de testículos, epidídimos y linfonódulos ilíacos e inguinales reveló lesiones macroscópicas (orquitis y epididimitis), tanto en animales vacunados como en el grupo control, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos. Estos hallazgos se corresponden con los señalados en el examen clínico.

Los resultados del estudio histopatológico de linfonódulos ilíacos e inguinales mostró que 40% de los animales pertenecientes al grupo vacunado y el 15% del grupo control presentaron hiperplasia reticular, caracterizada por un incremento moderado de células linfoblásticas y mononucleares con un aumento significativo del tamaño de los centros germinativos de Fleming y, en algunos casos ligeros signos de inflamación con presencia de catarro sinusal subcapsular (FIGS. 1 y 2). Se observó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre el grupo vacunado y el grupo control con un riesgo relativo de ocho ($RR=8$) indicativo de la fuerza de la asociación estadística entre la reacción ganglionar y la vacunación, TABLA I.

En la evaluación de la respuesta inmune humoral, ninguno de los animales del grupo vacunado tuvo reacciones positivas en ninguna de las pruebas serológicas utilizadas en el transcurso del experimento para medir anticuerpos contra S-LPS de *B. abortus* (aglutinación rápida en placa, lenta en tubo, 2-mercaptoetanol y ELISA competitivo).

En cuanto a la respuesta celular inespecífica frente a fitohemaglutinina (PHA) se pudo observar que el promedio de cuentas por minuto (cpm) en animales vacunados fue mayor que los no vacunados siendo esta diferencia estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Esta respuesta celular fue de mayor proporción a una concentración de 10 µg/mL de PHA, TABLA II, FIG. 3.

En la evaluación de la respuesta inmune celular frente a diferentes antígenos de la cepa RB51, se pudo comprobar que los animales vacunados mostraron mayores niveles de índice de estimulación linfocitaria (IE) que el grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para los antígenos 18 KDa y YajC, pero no para SOD y para los antígenos completos de la cepa no fraccionados. El antígeno que ofreció mejor respuesta celular en animales vacunados fue 18 KDa (IE= 3,58), seguido por YajC (IE = 2,94), SOD (IE = 2,46) y antígenos completos no fraccionados (IE = 1,55), TABLA III, FIG. 4.

DISCUSIÓN

La vacunación de toros adultos con cepa RB51 de *Brucella abortus* a una dosis única completa (dosis para vacuna-

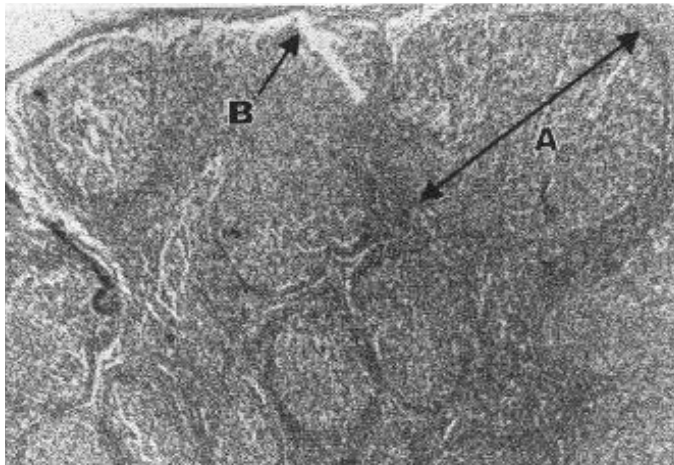


FIGURA 1. MICROFOTOGRAFÍA DE LINFONÓDULO (H&E 40X) A. HIPERPLASIA RETICULAR B. CATARRO SINUSAL.

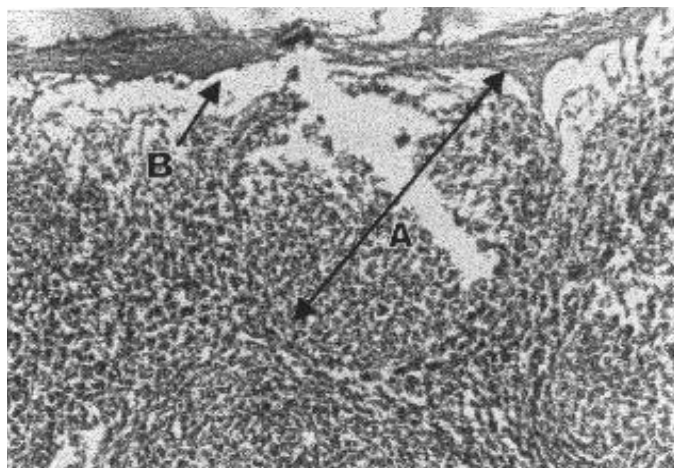


FIGURA 2. MICROFOTOGRAFÍA DE LINFONÓDULO (H&E 160X) A. HIPERPLASIA RETICULAR B. CATARRO SINUSAL.

TABLA I
GANGLIOS LINFÁTICOS. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS EN TOROS VACUNADOS Y NO VACUNADOS CON CEPA RB51 DE *Brucella abortus*

Grupo	Hiperplasia Reticular			
	Sí	%	No	%
Vacunado	8*	40,0	2	10,0
Control	1*	5,0	9	45,0
Total	9	45,0	11	55,0

*Diferencias significativas $p < 0,05$, RR = 8.

TABLA II
RESPUESTA INMUNE CELULAR (CPM) A FITOHEMAGLUTININA (PHA) EN ANIMALES VACUNADOS Y NO VACUNADOS CON CEPA RB51 DE *Brucella abortus*

Grupo	0µg/mL	2,5µg/mL	10µg/mL
Vacunado	2193	12647*	21343*
Control	2564	5897*	11689*

*Diferencias significativas $p < 0,05$.

ción de becerras) de 10 a 34 mil millones de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) por vía subcutánea, indujo una buena respuesta celular protectora y no produjo anticuerpos que fueran detectables en ninguna de las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de brucelosis tampoco hubo aislamiento bacteriano.

El estudio histopatológico de linfonodos ilíacos e inguinales, demostró que un alto porcentaje de animales (45%) mostró hiperplasia reticular. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre animales vacunados y no vacunados indicativo de una asociación con la vacunación y un riesgo relativo alto (RR=8), que demuestra la fuerza

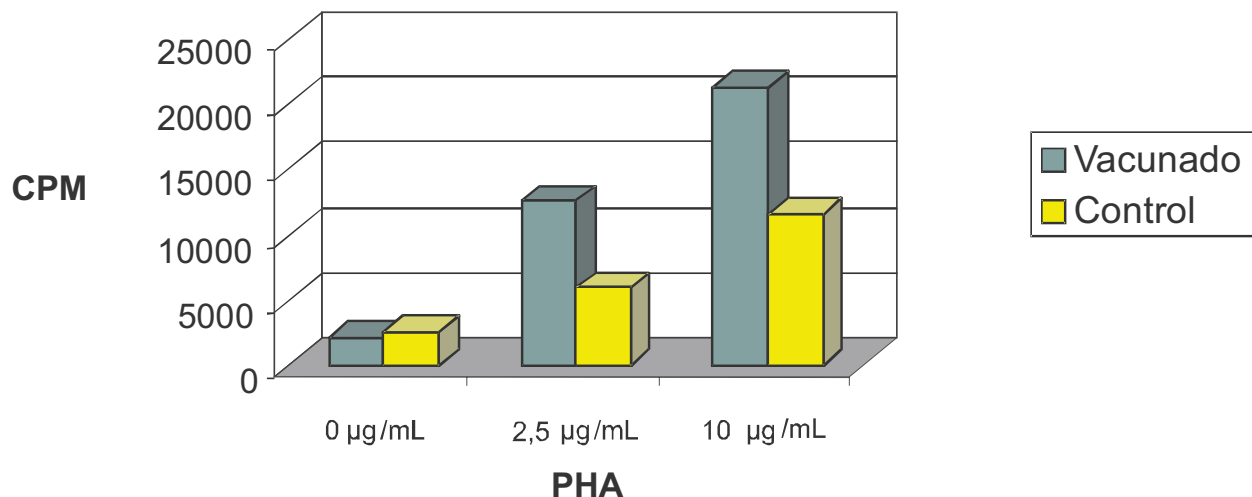


FIGURA 3. RESPUESTA INMUNE CELULAR (CPM) A FITOHEMAGLUTININA (PHA) EN ANIMALES VACUNADOS Y NO VACUNADOS CON CEPA RB51 DE *Brucella abortus*.

TABLA III
RESPUESTA INMUNE CELULAR
ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN LINFOBLÁSTICA (IE)
FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS DE LA CEPA RB51
DE *Brucella abortus*

Grupo	Completo	18KDa	YajC	SOD
Vacunado	1,55	3,58*	2,94*	2,46
Control	0,49	1,09*	1,25*	1,08

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo vacunado y control.

de esta asociación, ya que indica que los animales vacunados tienen ocho veces más probabilidades de presentar hiperplasia reticular ganglionar que el grupo control.

La hiperplasia reticular observada en linfonódulos se caracterizó por un incremento de células linfoblásticas y macrófagos a nivel de los centros germinativos de Fleming, con signos de ligera inflamación subcapsular pero sin la presencia de infiltrados de células Polimorfonucleares neutrófilos (PMN), lo cual demuestra que los cambios observados obedecen más a una respuesta inmune de reactividad que a un proceso inflamatorio. Estas características histopatológicas son compatibles con aquellas observadas por una constante estimulación de las células linfoblásticas al nivel de ganglios nódulos linfáticos por antígenos vacunales presentados por macrófagos y células dendríticas, en especial cuando estos antígenos proceden de una cepa viva como la cepa RB51, la cual puede mantener una antigenemia constante en el organismo hasta su completa eliminación por activación de la respuesta celular [14].

En la evaluación de la respuesta inmune celular, se comprobó que la respuesta proliferativa de linfocitos frente a fitohemaglutinina (PHA) y frente a diferentes antígenos de la cepa RB51 fue superior en animales vacunados que en el grupo control a los 70 días post-vacunación, lo cual era el resultado esperado, según lo señalado por otros autores [22, 32], quie-

nes demostraron que luego de la inoculación de la cepa RB51 en vacas, se produce un primer pico de respuesta inmune celular en la prueba de transformación linfoblástica con células mononucleares de sangre periférica a los 28 días post-vacunación, el cual va aumentando progresivamente hasta alcanzar el máximo a los 70 días post-vacunación (10 semanas) para luego disminuir drásticamente hacia los 85 días post-vacunación.

En cuanto a la respuesta de linfocitos a PHA, se observó una mayor proliferación medida en cuentas por minutos (cpm) a una concentración de 10µg/mL siendo esta respuesta de mayor magnitud en animales vacunados que en el grupo control. Estos resultados indican que la vacuna fue capaz en general, de incrementar la respuesta inmune celular [20].

De los antígenos usados en la prueba de transformación linfoblástica, se probó la cepa completa no fraccionada, inactivada por calor, la cual ha sido empleada por otros autores para la estimulación de linfocitos T [22]. Los otros antígenos probados fueron purificados proteicos de la pared celular de la cepa RB51, entre los cuales se encuentran: una fracción proteica de 18 KDa que ha sido señalada por otros autores como buena estimuladora de respuesta celular [32], la Superóxido Dismutasa (SOD), una enzima transportadora de electrones que juega un rol importante en la patogenicidad de las diferentes cepas de *Brucella*, pero que hasta el presente no se ha comprobado su poder para estimular una buena respuesta inmune celular [5, 31, 38] y YajC, una nueva proteína aislada de la pared celular que se encuentra aun en experimentación y que fue suministrada por el Dr. Gerhardt Schurig (Virginia Tech University).

Los antígenos completos no fraccionados y SOD demostraron tener un bajo nivel de estimulación y, aunque la estimulación fue mayor en animales vacunados, la diferencia con el grupo no vacunado no fue significativa. Las fracciones 18 KDa y YajC mostraron un mayor índice de estimulación linfocitaria con diferencias significativas entre animales vacunados y no vacunados, de los cuales la proteína 18 KDa demostró te-

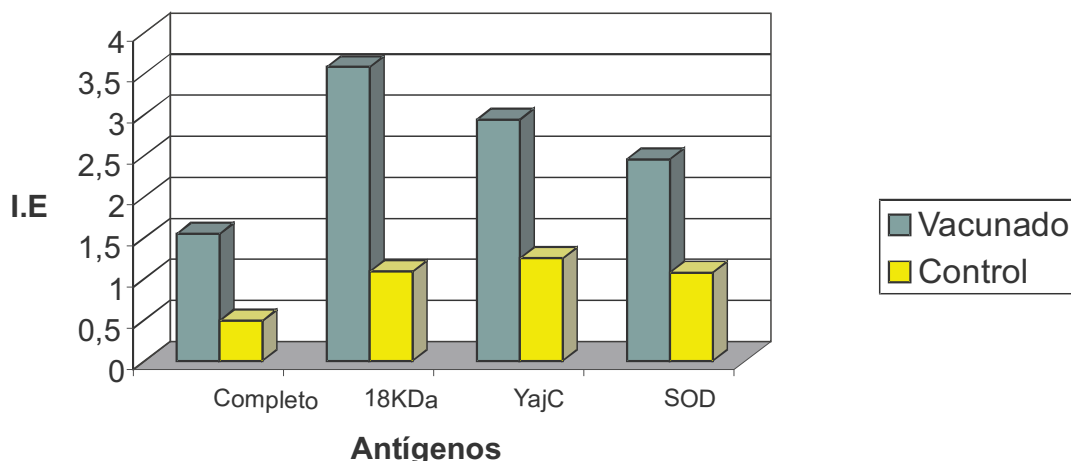


FIGURA 4. RESPUESTA INMUNE CELULAR INDICE DE ESTIMULACIÓN LINFOBLÁSTICA (I.E) FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS DE LA CEPA RB51 DE *Brucella abortus*.

ner el mayor poder de estimulación. Al igual que lo observado por otros autores quienes reportan que la respuesta celular fue de magnitud variable para las diferentes fracciones antigénicas aisladas de la pared celular de la cepa RB51 [32], separaron diferentes antígenos de la pared celular de la cepa RB51 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio-dodecil-sulfato, y obtuvieron una serie de proteínas con un peso molecular comprendido entre 18 y 106 KDa.

Estos antígenos fueron probados frente a linfocitos de ganglio linfático de bovinos a las 12 semanas posterior a la vacunación con cepa RB51 o inoculación experimental con cepa patógena 2308. Como resultado se observó un alto índice de estimulación frente a antígenos con un peso molecular de 32, 27, 18 y <18 KDa, lo cual demuestra que éstos parecen ser los antígenos inmunodominantes presentes en la cepa RB51, cuya respuesta sería suficiente para enfrentar la cepa de campo.

Folch y col. [12], observaron que diferentes antígenos de bajo peso molecular aislados de la cepa RB51 de *B. abortus* demostraron tener una buena respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro*; pero sólo dos proteínas menores, una de 18 KDa y otra de 22,9 KDa, indujeron una efectiva protección cuando se inocularon ratones Balb/c que luego fueron desafiados con la cepa patógena 2308. Estos resultados refuerzan los obtenidos en el presente trabajo con relación a que la fracción proteica de 18 KDa es una buena estimuladora de respuesta celular protectora, por lo que debe considerarse para futuros estudios en la obtención de vacunas más efectivas.

La Superóxido Dismutasa Cu-Zn (SOD), presente tanto en cepas patógenas (2308) como en cepas vacunales (cepa 19 y RB51) [29] es una enzima que forma parte del sistema antioxidante que defiende a la bacteria del efecto tóxico bactericida de los radicales superóxido producidos por las células fagocíticas (macrófagos y PMN), catalizando la reacción que transforma estos radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Tatum y col. [38] obtuvieron mutantes deficientes de SOD provenientes de cepa 19 (vacunal) y cepa 2308 (patógena) de *B. abortus*, y observaron que estas mutantes tenían una menor supervivencia en células fagocíticas, que aquellos de sus homólogas que poseían la enzima SOD, con lo que demostraron que la SOD juega un papel importante en la patogenicidad de la infección por *Brucella*.

Con relación a la enzima SOD, se demostró que la inoculación de toros adultos con cepa RB51 indujo una ligera respuesta celular contra SOD, pero la misma no presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. Aun no se conoce con exactitud la importancia de esta proteína, pero se cree que la misma no induce una buena respuesta celular protectora en bovinos vacunados con cepa RB51, a pesar de que juega un rol importante en la patogenicidad.

Stevens y col. [32] midieron la producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células de linfocitos de nódulos linfáticos en bovinos vacunados con cepa 19 y cepa RB51

y observaron que ni la cepa 19 ni la cepa RB51 inducen anticuerpos detectables contra SOD, y que la cepa 19 pero no la RB51 es capaz de inducir inmunidad celular contra SOD. Por otra parte, estudios recientes en ratones, parecen mostrar que la SOD aislada, es capaz de inducir una buena respuesta celular con la producción de altos niveles de INF- γ , siendo capaz de proteger contra la exposición con una cepa patógena de *Brucella abortus* [4]. Queda todavía la duda de cual sea el verdadero papel que cumple esta proteína en la estimulación de la respuesta celular protectora contra brucelosis en bovinos.

La fracción proteica denominada YajC, se encuentra aún en fase experimental y no existe hasta el presente ninguna publicación relacionada con su uso como posible estimuladora de respuesta celular. En este trabajo se demostró que los toros vacunados con cepa RB51 ofrecieron una buena respuesta celular contra esta proteína encontrándose diferencias significativas entre el grupo vacunado y el grupo control, aunque la misma fue menor que la observada para la fracción proteica de 18 KDa.

Uno de los aspectos más importantes en el uso de la cepa RB51 y que justifican su utilización como vacuna contra la brucelosis en bovinos, es el hecho de que la cepa no posee la cadena O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular y por tal motivo, no induce en el animal la producción de anticuerpos contra el LPS que puedan ser detectados con alguna de las pruebas de diagnóstico tradicionales, debido a que todas ellas emplean un antígeno S-LPS (LPS de la forma lisa de *Brucella*) para determinación de anticuerpos [27].

Hasta el presente, se ha demostrado que la vacunación de becerras con una dosis completa de la cepa RB51, no induce la producción de anticuerpos que interfieran con ninguna de las pruebas serológicas de diagnóstico (Aglutinación rápida en placa, aglutinación lenta en tubo, 2-mercaptoetanol, rivanol, card test, fijación de complemento e inmunodifusión en agar gel) y ofrece una efectiva protección contra aborto e infección. Contrario a esto, las becerras vacunadas con cepa 19, desarrollan títulos de anticuerpos detectables en todas las pruebas de diagnóstico serológico a partir de los 15 días postvacunación e incluso hasta los 240 días [15, 33].

En novillas vacunadas a los 6 meses de preñez con dosis reducida de cepa 19 y RB51, se observaron resultados semejantes, encontrándose que los animales vacunados con cepa 19 mostraron un pico de títulos de anticuerpos en prueba estándar de aglutinación a los 14 días postvacunación, mientras que en los vacunados con cepa RB51 no se observaron títulos de anticuerpos en esta prueba. Una prueba de Dot-Blot ELISA utilizando antígenos completos de la cepa RB51 γ -irradiadas (No ELISA convencional) mostraron que tanto los animales vacunados con cepa 19 como los vacunados con RB51 mostraron títulos de anticuerpos luego de los 15 días postvacunación, siendo esta respuesta mayor en los vacunados con cepa RB51 [22]. Esta prueba es un ensayo multiespecies elaborado para la detección de anticuerpos tanto en especies do-

místicas como salvajes. Este ensayo es capaz de distinguir entre animales infectados por *Brucella* de los vacunados con cepa 19 y de los infectados por otras especies de bacterias Gram negativas que producen reacciones cruzadas en pruebas de diagnóstico serológico, en forma comparable a la prueba de fijación de complemento.

El presente trabajo demostró que en el caso de los bovinos machos (toros) adultos, la vacunación con cepa RB51 no indujo la producción de anticuerpos detectables por las pruebas serológicas tradicionales (Aglutinación en placa y Rosa de Bengala) o en ELISA competitivo con antígenos S-LPS, ya que todos los animales vacunados permanecieron serológicamente negativos en el transcurso del experimento. Las pruebas de aglutinación al igual que la prueba lenta en tubo, miden principalmente anticuerpos clase IgM contra el antígeno O del LPS de la bacteria. Las pruebas de Rosa de Bengala (Card test) y 2-Mercaptoetanol son pruebas sencillas usadas en nuestro país como pruebas complementarias para el diagnóstico de brucelosis que permiten medir principalmente anticuerpos clase IgG, los cuales se producen luego de 1 a 3 semanas de la infección y persisten hasta después de los 10 meses, siendo los anticuerpos principalmente encontrados en animales infectados [11].

El conocimiento del comportamiento de los diferentes antígenos de la pared celular en cuanto a su estimulación de la respuesta inmune, es importante porque permite esclarecer cuales antígenos estimulan la respuesta inmune celular protectora y cual estimulan respuesta de tipo humoral, de manera de poder elaborar en el futuro, mediante ingeniería genética, vacunas que sean más efectivas en la protección contra la enfermedad, las cuales pueden ser hechas en base a péptidos recombinantes específicos, en base al ADN que codifica estos péptidos, o bien, mediante la mejora de las cepas ya existentes como la RB51, aumentando en ellas su capacidad para producir y manifestar estos péptidos en su superficie [28]. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en el presente trabajo y en concordancia con lo observado por otros autores, estos antígenos proteicos, y en especial el antígeno 18 KDa, podría ser usados con este fin.

CONCLUSIONES

La vacunación de toros adultos a una dosis única de 10 mil millones UFC/mL de la cepa RB51 de *Brucella abortus* produce una buena respuesta inmune celular protectora contra diferentes antígenos de la cepa, siendo esta estimulación de mayor magnitud contra una proteína de 18 KDa aislada de la pared celular y no induce la producción de anticuerpos que puedan interferir con las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de la enfermedad por lo que estas pruebas permiten discriminar animales vacunados de los infectados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITIS, O.M. Brucelosis. **Medicina Veterinaria**. Séptima edición. Editorial Interamericana. Mexico, 729-735 p. 1992
- [2] CAMPBELL, G.A.; ADAMS, L.G. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. **Vet. Imm. and Immunopath.** 34: 29 1-305. 1992.
- [3] CARGIL, C.; LL, K.; CLARKE, I. Use of Enzyme-linked Immunosorbent Assay in a bovine eradication program. **Aust. Vet. J.** 34:291-305. 1992.
- [4] CESPEDES, S.; ANDREWS, E.; FOLCH, H.; OÑATE, A. Identification and partial characterization of a new protective antigen of *Brucella abortus*. **J. Med. Microbiol.** 49:165-170. 2000.
- [5] CHEVILLE, N.; STEVENS, M.G.; JENSEN, A.E.; TATUM, F.M.; HALLING, S.M. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. **Am. J. Vet. Res.** 54 (10):1591-1597. 1993.
- [6] CONTRERAS, J.A. **Brucelosis. Enfermedades de los Bovinos: Diagnóstico, Tratamiento y Control**. Editado por Contreras J. Segunda edición. Barquisimeto. Venezuela. 475-489 p. 2000
- [7] DANIEL, W. W. **Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud**. Editorial Lirnusa. México. 280-286, 345-372, 639-693 p. 1997.
- [8] DOHOO, I.R.; WRIGTH, P.F.; RUCKERBAUER, G.M.; SAMAGH, B.S.; ROBERTSON, F.J.; FORBES, L.B. A comparison of five serological test for bovine brucellosis. **Can. J. Vet. Res.** 50:485-493. 1986.
- [9] EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus*, and *trichomonas foetus*. **Vet. Bull.** 62 (8): 743-775. 1992
- [10] EDMOND, M.D.; SCHURIG, G.G.; SAMARTINO, L.E.; HPHYT, P.G.; WALKER, J.V.; HAGIUS, S.D.; ELZER, P.H. Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and pregnant heifers. **Am. J. Vet. Res.** 60 (6): 722-725. 1999.
- [11] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Comité mixto de expertos en Brucelosis. Organización Mundial de la Salud, Serie de Informes técnicos. **Boletín** Nº 464. Ginebra. Suiza.1972.
- [12] FOLCH, H.; ANDREWS, E.; OÑATE, A.; ELLER, G. Identificación de dos proteínas de *Brucella abortus* capa-

- ces de conferir protección frente a un desafío con cepa patogénica. **Memorias del Simposio Internacional de Brucelosis**. Maracay, Venezuela, 26 al 27 de mayo. 50-51 p. 1999.
- [13] HILL, B.D. The cultural and pathological examination of bulls serologically positive for brucellosis. **Aust. Vet. J.** 60:7-9. 1983.
- [14] JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER. Brucellosis in cattle caused by *Brucella abortus*. **Pathology of Domestic Animals**. Third Edition. Vol. III. Academic Press, inc. 346-347, 432-434 p. 1985.
- [15] LORD, V.; SCHURIG, G.; CHERWONOGRODZKY, J.; MARCANO, M.; MELENDEZ, G. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. **Am. J. Vet. Res.** 59(8): 1016-1020. 1998.
- [16] MANTHEI, C.A.; DETRAY, D.E.; GOODE, E.R.; JR. Brucella infection in Bulls and The Spread of Brucellosis in Cattle by Artificial Insemination. **Am. Vet. Med. Assoc. Proceed.** 87th Meeting. 177-184 p. 1950.
- [17] NICOLETTI, P.; TANYA, V. Comparison of Enzyme-labeled Immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standard serological methods and bacteriological culture for detection of *Brucella* spp. in infected cows in herds with brucellosis. **Javma.** 22 (12):1975-1977. 1993.
- [18] NIELSEN, K.H.; HECK, F.C.; STILLER, J. M.; ROSENBAUM, B. Interaction of specifically purified isotypes of bovine antibody to *Brucella abortus* in the haemolysis in gel test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Res. Vet. Sci.** 35:14-18. 1983.
- [19] OLSEN, S. Available vaccines for the control of brucellosis in animals. Reunión de consulta de expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación en los programas de control/erradicación de la brucellosis. Santiago de Chile 16 al 18 de Noviembre. 30-33 p. 1999.
- [20] OPPENHEIM, J.; SCHECTER, B. Lymphocyte transformation in **Manual of Clinical Immunology**. Edited by Rose, N. And Friedman, H. American Society of Microbiologv. Washington D C USA. 81-94 p.1976.
- [21] PALMER, M.; CHEVILLE, N.; JENSEN, A. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidato *Brucella abortus* strain RB5 1: Patologic, bacteriologic and serologic findings. **Vet. Pathol.** 33: 682-691.1996.
- [22] PALMER, M. V.; STEVEN C. O.; CHEVILLE, N. F. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. **Am. J. Vet. Res.** 58 (5): 472-477. 1997.
- [23] RIVERA, S.; CURIEL, J. Epidemiología serológica de la brucelosis bovina en el municipio Villa del Rosario. Perijá, Estado Zulia. **Revista Científica FCV-LUZ.** 2(2): 117-124. 1993.
- [24] ROOP, R.M.; JEFFERS, G.; BAGCHI, T.; WALKER, J.; ENRIGHT, F.M. Experimental infection of goats fetuses in utero with a stable, rough mutant of *Brucella abortus*. **Res. Vet. Sci.** 51:123-127. 1991.
- [26] RUSSELL, W. Brucellosis. **JAVMA.**195 (5): 595-597. 1989
- [27] SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, O.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Vet. Microb.** 28: 171-188. 1991.
- [28] SCHURIG, G. Erradicación de la brucelosis y características principales de la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51. **Memorias del Simposio Internacional de Brucelosis**. Maracay, Venezuela, 1999; 26 al 27 de Mayo. p 27-42. 1998.
- [29] SRIRANGANATHAN, N. DOYLE, S.M.; SCHURIG, G.G.; MISRA, H. Superoxido dismutases of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*. **Vet. Microb.** 26: 359-366. 1991.
- [30] STACK, J.A.; PERRETT, L.L.; BREW, D.; MACMILLAN, A. P. Competitivo ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples. **Vet. Record.** 18 (25): 735-736. 1999.
- [31] STEVENS, M.G.; TATABAY, L.B.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N. F. Immune response to superoxide dismutase and synthetic peptides of superoxide dismutase in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or RB51. **Vet. Microb.** 41: 383-389.1994.
- [32] STEVENS, M.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N. Lymphocyte proliferation in response to immunodominant antigens of *Brucella abortus* 2308 and RB51 strain 2308-infected cattle. **Infect. and Imm.** 62 (10): 4646-4649. 1994.
- [33] STEVENS, M.G.; HENNAGEW S.G.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Serologic responses in diagnostic test for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 o RB51. **J. Clin. Microb.** 32 (4): 1065-1066. 1994
- [34] STEVENS, M.; OLSEN, C.; CHEVILLE, N. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. **Vet. Imm. and Immunopath.** 44:223-235. 1995.
- [35] STEVENS, M.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308 proteins in RB51 vaccinated or 2308 infected cattle. **Infect. and Imm.** 64 (3): 1007-1010.1996.

- [36] SVANOVA BIOTECH. Svanovir. **Brucella abortus C-ELISA catalogue**. Test Kit for the detection of antibodies in serum. Edited by Svanova Biotech, Uppsala. Suecia. pp 1-4. 2000.
- [37] TABATAY, L. B.; DEYOE, B.L. Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. **J. Clin. Microb.** 20(2):209-213. 1984.
- [38] TATUM, F. M.; DETILLEUX, P. G.; SACKS, J. M.; HALLING, M. Construction of Cu-Zn Superoxido Dismutasa deletion mutants of *Brucella abortus*: Analysis of survival *in vitro* in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. **Infect. and Imm.** 60 (7): 2863-2869. 1992.
- [39] TOBIAS, L.; SCHURIG, G. G.; CORDES, O. O. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strain 19 and RB51 in pregnant mouse. **Res. Vet. Sci.** 53: 179-183.1992.
- [40] URDANETA, A.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ, J. R.; ARANGUREN, A.; GONZALEZ-STAGNARO, C., CASTEJON, O. Histopatología y morfometría de testículos en toros mestizos 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo a los 24 meses de edad. **Rev. Científica FCV-LUZ.** 8 (2):163-176. 1998.
- [41] VARGAS, F. Inmunología de la brucelosis y uso de la vacuna RB51 en el programa de control y erradicación de la enfermedad. En: **Enfermedades de los Bovinos: Diagnóstico. Tratamiento y Control**, editado por Contreras, J., Segunda Edición. Barquisimeto, Venezuela, 490-515 p. 2000.
- [42] YARAZABAL, L.; PETRALANDA, I.; ARANGO, M. La técnica de ELISA y sus aplicaciones en Inmunología Clínica. Manual de Métodos en Inmunodiagnóstico. Editado por Contreras, E., Figarlla, E., Ramírez, R. y Blanca, I. Fondo editorial. **Acta Científica Venezolana**. Caracas. Venezuela. 1985.