

Respuesta serológica a la vacunación contra brucelosis en bovinos provenientes de un rebaño libre vacunados con dos dosis de vacuna Cepa RB-51

Serological response to brucellosis vaccination in bovines from a free herd vaccinated with two doses of RB-51

C Ramírez^a, S Ernst^{b*}, F Elvinger^c

^aOrganización Mundial de Sanidad Animal (OIE), París, Francia.

^bInstituto de Medicina Veterinaria Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

^cDepartment of Large Animal Clinical Sciences, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

SUMMARY

A prospective study was carried out in order to determine the serological response to the official tests used in Chile for the detection of bovine brucellosis which are Rose Bengal (RB), Complement Fixation (CF) and Competing Elisa (C-ELISA), in adult cows vaccinated with two doses of vaccine strain RB-51 from a brucellosis free herd as certified by the Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) of the Ministry of Agriculture of Chile. A total of 100 female bovines older than 18 months were selected in order to be 90% confident that the proportion of positives in cows vaccinated twice would not exceed 2.95% if all collected serum samples remained negative. The animals were vaccinated subcutaneously with 2 cc of vaccine strain RB-51 in doses of $1-3.4 \times 10^{10}$ ufc with an interval of 30 days between the first and the second application; the date of the first vaccination was the day 0 of study. Serum samples were taken the days 0, 30 and 60. Samples were processed in the Laboratory of Reference for Bovine Brucellosis of the SAG, Osorno, X Region, Chile. None of the vaccinated cows showed serological reaction due to administration of two doses of RB-51 vaccine detected by routine tests for bovine brucellosis.

Palabras clave: *Brucella abortus*, bovinos, brucelosis, vacuna RB-51.

Key words: *Brucella abortus*, bovinos, brucellosis, vaccine RB-51.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una enfermedad altamente infecciosa causada por *Brucella abortus*. Se caracteriza por abortos y disminución de la fertilidad principalmente en bovinos, aunque otras especies animales también pueden verse afectadas, lo que ocasiona importantes pérdidas económicas. Se transmite al hombre, constituyendo una zoonosis de distribución mundial (Acha y Zsyfres 2003). Estas características han hecho que las autoridades sanitarias mundiales relacionadas con la salud animal se preocupen y promuevan programas de control y erradicación (Godfroid y col 2003). Algunos países del norte y centro de Europa, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda son considerados libres de la enfermedad por la OIE.¹

En Chile, las acciones organizadas contra la brucelosis bovina abarcan una experiencia de más de 25 años. Después de un extenso período de control basado en la vacunación de terneras con vacuna Cepa 19, se inició durante la primera mitad de los años noventa un cambio estratégico del programa de brucelosis conducente a la

erradicación. Este proceso comenzó en las regiones XI y XII, las cuales tenían condiciones favorables de prevalencia mínima de la enfermedad, baja densidad ganadera y aislamiento geográfico, para posteriormente extenderse a las regiones con mayor masa ganadera del país; es así como la X Región (actualmente regiones XIV y X) se incorporó en el año 1996 (Lopetegui 1995, Rivera y col 2002). Como parte de esta estrategia se incluyó en forma oficial, en 1997, la vacuna Cepa RB-51 en reemplazo de la mencionada vacuna Cepa 19.

Brucella abortus cepa RB-51 es una cepa atenuada, rugosa, mutante y estable derivada de la cepa de *B. abortus* cepa 2308 que no posee la cadena O de lipopolisacáridos en la superficie de la pared celular (Schurig y col 1991). Estudios experimentales han demostrado que protege eficazmente a los bovinos contra la infección por *B. abortus*, en forma muy similar a la vacuna Cepa 19, pero sin el inconveniente de inducir anticuerpos que reaccionan con las pruebas diagnósticas convencionales (Cheville y col 1996, Stevens y col 1994).

Una de las medidas sanitarias recomendadas para el manejo de un rebaño infectado de brucelosis bovina en el programa de erradicación de Chile, es elevar la inmunidad del rebaño (Rivera y col 2001). Esto se realiza actualmente vacunando con vacuna Cepa RB-51 a toda la masa susceptible, según la condición epidemiológica del rebaño

Aceptado: 01.04.2009.

* Casilla 567, Valdivia, Chile; sernst@uach.cl

¹ OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2005. http://www.oie.int/hs2/using_handistatus2. (Consultado el 24 de agosto 2005).

(Lopetegui 1999). La pauta oficial de vacunación se basa en la aplicación de 2 cc de la vacuna vía subcutánea en las terneras desde los cinco meses de edad, las vaquillas pre-encaste desde los 15 meses de edad y las hembras adultas con excepción de las gestantes.

A pesar de que se han realizado numerosos estudios en los cuales se ha confirmado que la vacunación con Cepa RB-51 no induce la producción de anticuerpos detectables por las pruebas diagnósticas de uso rutinario, no hay muchos antecedentes sobre seroconversión posterior a la vacunación con Cepa RB-51 cuando los animales son adultos y cuando se usa más de una dosis de vacuna. Debido a lo expuesto se realizó una encuesta serológica prospectiva con la finalidad de verificar que la vacuna RB-51 aplicada en dos dosis a hembras bovinas adultas provenientes de un rebaño libre a la enfermedad no provoca anticuerpos posvacunación que sean detectables por las pruebas diagnósticas de Rosa de Bengala (RB), Fijación de Complemento (FC) y Elisa de competencia (C-Elisa), pruebas oficiales aplicadas en Chile para la detección de brucelosis bovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

REBAÑO LIBRE

Se eligió un rebaño libre de brucelosis bovina con certificación vigente otorgada por el Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura de Chile. Se definió como tal aquel rebaño sin aislamiento bacteriológico del agente y con serología negativa a las pruebas oficiales por lo menos durante tres muestreos sanguíneos consecutivos de toda la población bovina mayor de 18 meses. Este rebaño usado en el estudio se ubicó en la comuna de Los Lagos, Provincia de Valdivia, Chile, y correspondió a un rebaño lechero de aproximadamente 500 hembras de raza Frisón Negro.

SELECCIÓN DE LOS ANIMALES Y VACUNACIÓN

Del rebaño libre se seleccionaron en forma aleatoria 100 hembras bovinas mayores de 18 meses (n), con la finalidad de tener una confianza de un 90% de que la proporción de animales positivos no será mayor a 2,95%, valor máximo del intervalo de confianza exacto, si todos los animales muestreados resultan negativos (Fleiss y col 2003). Estos animales fueron vacunados vía subcutánea, en el área pre-escapular, con vacuna cepa RB-51 (Laboratorio Colorado Ferum, Denver, Colorado, USA) en dosis de $1-3,4 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colonias (UFC), con una diferencia de 30 días entre la primera y segunda vacunación. Esta última constituyó el día 0 del estudio.

TOMA DE MUESTRAS Y PRUEBAS DE LABORATORIO

Los días 0, 30 y 60 del estudio se tomaron muestras de 10 ml de sangre por venopunción coccígea de cada

animal seleccionado. Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente para favorecer la formación del coágulo y luego se llevaron al laboratorio del Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile para la liberación del suero y almacenamiento de éste a -23° C. Posteriormente fueron enviadas al Laboratorio de Referencia para Brucelosis Bovina del Servicio Agrícola y Ganadero en Osorno para su análisis mediante las pruebas serológicas de RB, FC y C-ELISA según los protocolos establecidos por la OIE (2004).

Se consideraron bovinos con serología positiva a brucelosis aquellos que presentaron cualquier reacción leve de aglutinación para RB, una reacción de titulación igual o superior a 1:10 para FC y porcentajes de inhibición igual o superiores a 40% para C-Elisa, según lo establecido en el proceso de validación de esta última prueba en Chile (Rivera y col 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio se realizó con el objetivo de verificar que la vacuna cepa RB-51 aplicada en dosis altas es un inmunógeno seguro y estable que no provoca anticuerpos posvacinales que sean detectables en las pruebas oficiales utilizadas en Chile para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina.

Al analizar los sueros de las 100 hembras vacunadas con dos dosis de vacuna RB 51 con diferencia de 30 días entre cada aplicación y muestreadas los días 0, 30 y 60 del estudio, se apreció que ningún animal presentó reacción serológica a las pruebas atribuible a la vacunación con cepa RB-51.

Lo expuesto coincide con lo descrito en los experimentos iniciales tanto de laboratorio como de campo, realizados en Estados Unidos en los años noventa con la finalidad de establecer la bioseguridad y eficacia de la vacuna cepa RB-51 (Cheville y col 1992, 1993 y 1996, Stevens y col 1994 y 1995, Palmer y col 1997, Olsen y col 1999, Cheville 2000) y con los resultados encontrados por el laboratorio del Servicio de Inspección y Sanidad Agropecuaria. Éste analizó siete pruebas serológicas aprobadas por el Departamento de Agricultura, las que indicaron que la vacuna cepa RB-51 no interfirió con ninguna de las pruebas serológicas para brucelosis basadas en la cadena O de lipopolisacáridos. Esto permitió concluir que dicha vacuna es más apropiada que la vacuna Cepa 19 para ser usada en los programas de control y erradicación de la brucelosis bovina en Estados Unidos, situación también comprobada en otras especies como visón y alce (Cheville 2000).

Los resultados encontrados en Estados Unidos concuerdan también con los reportados por Fosgate y col (2003) en 32 búfalos de agua de 5 a 20 meses de edad de un rebaño libre vacunados con cepa RB-51 y sometidos posteriormente a condiciones naturales de exposición en Trinidad, ninguno de los cuales resultó positivo a las pruebas de aglutinación tradicionales, y con lo informado por Diptee

y col (2006), los cuales también en Trinidad administraron hasta 4 dosis en concentración de $2,02 \times 10^{10}$ CFU de RB-51 a 30 búfalos de agua de 6 a 10 meses de edad de un rebaño libre, sin que posteriormente éstos presentaran anticuerpos que reaccionaran a las pruebas buferada de aglutinación en placa y Elisa de competencia (C-ELISA), indicando que el uso de este inmunógeno no afecta la vigilancia de brucelosis en esta especie animal.

Lo anteriormente expuesto está de acuerdo también con lo informado por Lord y col (1998) quienes vacunaron 330 animales de 3 a 8 meses de edad y 120 de 10 a 12 meses de edad en la Región de los Llanos en Venezuela en condiciones de campo de alta (39%) y baja (2%) prevalencia, los cuales presentaron resultados negativos a las pruebas serológicas convencionales; con los resultados obtenidos por Samartino y col (2000) al vacunar 57 hembras preñadas en Argentina ninguna de las cuales seroconvirtió; y con lo señalado por Uzal y col (2000) quienes indican que en una investigación también realizada en Argentina la inmunización con una, dos o tres dosis de vacuna Cepa RB-51 de animales adultos (novillos y hembras gestantes) no interfiere con las técnicas de diagnóstico serológicas de la brucelosis bovina.

La serología negativa encontrada en los reportes antes señalados contrasta con los resultados obtenidos por Leal-Hernández y col (2005), quienes informan que la revacunación con una dosis reducida de RB-51 de 35 hembras gestantes que previamente habían sido vacunadas con dosis de ternera de RB-51, indujo una reacción serológica atípica transitoria durante varios meses en 5 (17%) de ellas a las pruebas convencionales de Rivanol y Prueba de la Tarjeta; sin embargo, los mismos autores atribuyen este resultado a una respuesta secundaria por exposición a cepas de campo de *Brucella*, lo cual fue comprobado por aislamiento, con lo cual la ocurrencia de anticuerpos muestra que los animales estuvieron en contacto con el agente, pero el sistema inmune fue capaz de controlar la infección.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que en animales inmunizados con dos dosis de cepa RB-51 no se detectan anticuerpos postvaccinales atribuibles a la vacuna que puedan interferir con las pruebas diagnósticas actualmente utilizadas para la detección de brucelosis bovina en Chile.

RESUMEN

Se realizó una encuesta prospectiva con la finalidad de determinar la respuesta serológica a las pruebas oficiales aplicadas en Chile para la detección de brucelosis bovina que son Rosa de Bengala (RB), Fijación de Complemento (FC) y Elisa de Competencia (C-Elisa), en hembras adultas vacunadas con dos dosis de vacuna Cepa RB-51 provenientes de un rebaño libre de la enfermedad con certificación vigente otorgada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura de Chile. Se seleccionaron 100 hembras bovinas mayores de 18 meses con la finalidad de tener una confianza de un 90% de que la proporción de positivos no será mayor a un 2,95% si todos los animales muestreados resultan negativos. Los bovinos fueron vacunados vía subcutáneos con

vacuna Cepa RB-51 en dosis de $1-3.4 \times 10^{10}$ UFC con una diferencia de 30 días entre la primera y segunda aplicación; la fecha de la primera vacunación correspondió al día cero del estudio. Los días 0, 30 y 60 se tomaron muestras de 10 ml de sangre por venopunción coccígea de cada animal seleccionado. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Referencia de Brucelosis Bovina del SAG, Osorno, X Región, Chile. Ningún animal presentó reacción serológica atribuible a la vacunación con RB-51 que puedan interferir con las pruebas diagnósticas actualmente utilizadas para la detección de la brucelosis bovina.

REFERENCIAS

- Acha PN, B Zsyfres. 2003. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales*. Publicación Científica No. 503 OPS/OMS 14-35.
- Chevillat N, AE Jensen, SM Halling, FM Tatum, DC Morfitt, SG Hennager, WM Frerichs, G Schurig. 1992. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 53, 1881-1888.
- Chevillat N, MG Stevens, AE Jensen, FM Tatum, SM Halling. 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.
- Chevillat N, S Olsen, M Stevens, M Palmer, A Florence. 1996. Effect of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB-51 to protect cattle against brucellosis. *J Wildl Diseases* 57, 1153-1156.
- Chevillat N. 2000. Development, testing and commercialization of a new brucellosis vaccine for cattle. *Ann NY Acad Sci* 916, 147-153.
- Diptee MD, AA Adesiyun, Z Asgarali, M Campbell, R Adone. 2006. Serologic response, biosafety and clearance of four dosages of *Brucella abortus* strain RB-51 in 6-10 months old water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Immunopathol* 109, 43-55.
- Fleiss JL, B Levin, CP Myunghee. 2003. *Statistical methods for rates and proportions*. 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Fosgate GT, AA Adesiyun, DW Hird, WO Johnson, SK Hietala, GG Schurig, J Ryan, MD Diptee. 2003. Evaluation of brucellosis RB-51 vaccine for domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. *Prev Vet Med* 58, 211-225.
- Godfroid J, P Bosman, S Herr, G Bishop. 2003. Bovine brucellosis. In: Coetzer JA and Tustin RC (eds). *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford University Press. Cape Town, South Africa, Pp 1510-1527.
- Leal-Hernández M, E Díaz-Aparicio, R Pérez, L Hernández, B Arellano-Reynoso, E Alfonso, F Suárez-Güemes. 2005. Protection of *Brucella abortus* RB-51 revaccinated cows, introduced in a herd with active brucellosis with presence of atypical humoral response. *Com Immun Microbiol Infect Dis* 28, 63-70.
- Lopetegui P. 1995. *Estrategia técnica para la erradicación de la brucelosis bovina*. Departamento de Protección Pecuaria, Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile.
- Lopetegui P. 1999. *Políticas sobre aplicación de vacunas para el control/erradicación de la brucelosis en los animales*. Reunión Consulta de Expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación en los programas de control/erradicación de la brucelosis. OPS 105-107. Santiago, Chile.
- Lord V, G Schurig, J Cherwonogrodzky, M Marcano, G Melendez. 1998. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB-51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am J Vet Res* 59, 1016-1020.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2004. *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas)* 5^a ed. París, Francia.
- Olsen SC, B Bricker, MV Palmer, AE Jensen. 1999. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res Vet Sci* 66, 101-105.

- Palmer MV, SC Olsen, NF Cheville. 1997. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res* 58, 472-477.
- Rivera A, MC Ramírez, B Pérez. 2001. Informe anual. *Proyecto de Erradicación Brucelosis Bovina en la Xª Región*. Servicio Agrícola y Ganadero 1-41, Santiago, Chile.
- Rivera A, MC Ramírez, P Lopetegui. 2002. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de los Lagos, Chile. *Vet Microbiol* 90, 45-53.
- Samartino LE, M Fort, R Gregoret, G Schurig. 2000. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calthood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev Vet Med* 45, 193-199.
- Schurig G, RM Roop, T Bagchi, S Boyle, D Buhman, N Sriranganathan. 1991. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28, 171-188.
- Stevens MG, S Hennager, S Olsen, NF Cheville. 1994. Serologic response and diagnostic test for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB-51. *J Clin Microbiol* 32, 1065-1066.
- Stevens MG, SC Olsen, NC Cheville. 1995. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunop* 44, 223-235.
- Uzal FA, L Samartino, G Schurig, A Carrasco, K Nielsen, RF Cabrera, HR Taddeo. 2000. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB-51 on heifers and pregnant cattle. *Vet Res Commun* 24, 143-151.