

La protección contra el aborto por la primo-vacunación antibrucélica caprina, ante el desafío de la revacunación

The protection against goat abortion by the anti-brucella primary vaccination, the challenge of revaccination

MEGLIA, GE¹; CASTILLO, M¹; GÓMEZ, MB¹; TORTONE, C¹; CERUTTI, DA¹; GASTALDO, MF¹; ARDOINO, S¹; PALERMO, P¹; BELAUSTEGUI, F¹; ELENA, S²; BONASTRE, P²; FABEIRO, M²; FRANCO, C²; BAGNAT, E²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam). ²Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA).

RESUMEN

La brucelosis caprina, por *Brucella melitensis*, es una enfermedad zoonótica-endémica en ocho provincias argentinas. El SENASA instó a sus gobiernos a establecer un programa de control con la vacuna Rev-1 conjuntival, para todos los caprinos independientemente de edad y sexo, cada dos años. La vacuna posee la restricción de no aplicarse en hembras gestantes porque ocasionalmente induce abortos. En prácticas de vacunación masiva, no corroboradas mediante experimentos controlados, se evidenció que, con la revacunación las hembras gestantes no abortaban, deduciendo por ello que la primera vacunación las protegería del aborto ante los desafíos vacunales siguientes. Consecuentemente, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la vacunación conjuntival con Rev-1 en cabras pre-inmunizadas al revacunarlas durante el periodo de máxima susceptibilidad al aborto. Veintidós cabrillonas Bóer, libres de brucelosis, fueron aleatoriamente asignadas a uno de los dos grupos: Amarillo o Rojo, de acuerdo con el color de las caravanas gA n=11 y gR n=11, cuyo servicio natural duró 48 y 49 días, con porcentajes de preñez del 82 % y 91 %, respectivamente. El gA recibió dos dosis de vacuna, pre-servicio y a los 95 días de iniciado el mismo; mientras que el gR recibió una dosis a los 98 días de iniciado el servicio. Se tomaron muestras sanguíneas en seis momentos diferentes para evaluar la respuesta inmunitaria, y muestras microbiológicas al parto/aborto y cinco días posteriores de los mismos, que se cultivaron en medios de Farrell y CITA; toda colonia morfológicamente compatible con *Brucella* fue confirmada por PCR (Multiplex PCR, Bruce-ladder). A los 14 días post-vacunación todos los animales fueron serológicamente positivos, pero el gR mantuvo significativamente ($p<0,05$) un mayor número de animales positivos a los 100 días del último parto/aborto. Todas las cabras del gA parieron a término y resultaron negativas al hisopado vaginal; mientras que el 80 % de las cabras del gR abortaron y solo 2 parieron cabritos viables, observándose diferencias significativas ($p<0,0001$). Aunque los hisopados vaginales fueron positivos al aborto/parto y a los 5 días posteriores. En conclusión, la inoculación pre-servicio contra la brucelosis previno la manifestación del aborto y la infección cuando las cabras fueron desafiadas con la cepa vacunal durante la gestación.

Palabras clave: (brucelosis caprina), (cepa Rev-1), (vía conjuntival), (anamnesis), (desafío)

ABSTRACT

Goat brucellosis, by *Brucella melitensis*, is a zoonotic-endemic disease in eight provinces of Argentina. The National Animal Health Service (SENASA) urged the local governments to set up a control program that involves a conjunctival Rev-1 vaccination, every two years, of all goat populations independent of the age and sex of the animals. The vaccine posse the restriction not to be applied in pregnant goats because occasionally induce abortion. Practical evidence of herds vaccination, not validated by controlled experiences, showed that with revaccination pregnant goats did not abort, but were protected against it and even with further vaccinations. Therefore, the objective of the trial was to assess the effect of conjunctival Rev-1 vaccination of pre-immunized goats when were revaccinated during the higher susceptibility period to the abortion. Twenty-two, brucellosis-free Boer goats were randomly assigned to either yellow or red groups, according to the colour of the ear tag (gA n=11; gR n= 11). The natural mating lasted 60 days and the pregnancy percentage was 82 (gA) and 91 % (gR), respectively. The gA received two vaccine doses, at 20 days pre-mating and at 95 days from the beginning of mating, whereas gR received just one dose at 98 days of the beginning of mating. Blood samples were taken at six-time points to assess the immune response and microbiology samples were also taken at birth/abortus and five days thereafter. The microbiology samples were cultured at both Farrell and CITA medium, and every colony morphologically compatible with *Brucella* was validated by PCR (Multiplex PCR, Bruce-ladder). All the goats were serologically positive at 14 days post-inoculation, but the gR maintained a significant ($p<0,05$) number of goats positive at 100 days post-birth/abortus. The gA goats gave birth on time and the vaginal swabs were bacteriology negative at both parturition and five days thereafter, whereas the vaginal swabs of the gR were positive at both times. In conclusion, the pre-mating vaccination against brucellosis prevented significantly ($p<0,0001$) both the abortion and the infections of the goats when they were revaccinated with the vaccine strain during the gestation.

Keywords: (goat brucellosis), (Rev-1 strain), (conjunctival vaccination), (anamnesis), (challenge)

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es considerada una de las zoonosis más importantes del mundo y es la *Brucella melitensis* la especie más patógena del género *Brucella* para el ser humano. Es la especie que más recidivas produce, con padecimientos dolorosos y prolongados, afectando notablemente la calidad de vida de las personas, especialmente la familia cabritera. Por ello, en nuestro país, la fuente de infección principal es directa debido a los caprinos en los corrales. También se transmite a través del consumo de productos y subproductos lácteos contaminados. Ocho son las provincias endémicas, que deben aplicar planes de vacunación masiva y sistemática con la vacuna a Cepa Rev-1 (*Brucella melitensis* atenuada). Este planteo ha demostrado ser eficaz en reducir significativamente la prevalencia en aquellas áreas con más de un 15-20 % de rebaños infectados⁴. La Rev-1 es la vacuna antibrucélica más potente y utilizada en el mundo para controlar la enfermedad e interrumpir la transmisión al

ser humano. En Argentina, por primera vez, con la vacunación, se ha logrado producir un quiebre en el curso histórico de la enfermedad en las provincias de Mendoza y San Juan^{6, 13}, con una eficaz reducción en los casos en seres humanos, tal como ocurrió en aquellos países que aplicaron estos planes.

La Cepa Rev-1 es atenuada y estable, aunque mantiene un grado de virulencia necesario para estimular y generar una sólida resistencia ante la infección brucélica³. Pero, este grado de virulencia residual, cuando la vacuna es aplicada a hembras gestantes especialmente entre los 60-90 días de gestación, produce abortos⁹. Este riesgo de abortar es insignificante vacunando antes de los 30 días o después de los 120 días de gestación y nulo, vacunando animales no gestantes⁴. Ello permite disponer de una “ventana de oportunidad” para vacunar a los animales durante la época de parición, lactación y servicio, evitando así el aborto vacunal. No obstante, en términos

operativos, representa una limitación importante de tiempo para la ejecución de las campañas de vacunación, lo cual exige una estructura de aplicación intensiva para su cumplimiento.

Si los abortos generados por la Cepa Rev-1 no ocurriesen o fuesen muy reducidos, permitiría ampliar el período de vacunación con lo cual se facilitaría el logro de la cobertura vacunal requerida. Esto es posible que ocurra en los Planes de vacunación ya iniciados, donde se cumplió la etapa de primo-vacunación de las majadas, y es esto precisamente lo que contribuyó a la hipótesis de que la primo-vacunación con la Cepa Rev-1 en las cabras, induce una inmunidad antibrucélica sólida y ante desafíos con la cepa homóloga en las revacunaciones, no induce aborto vacunal.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la vacunación conjuntival con Rev-1 en cabras pre-inmunizadas al revacunarlas durante el periodo de máxima susceptibilidad al aborto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veintidós cabrillonas cruza Bóer, fenotípicamente homogéneas provenientes de un establecimiento y zona libre de brucelosis caprina (provincia de La Pampa), fueron adquiridas en diciembre de 2019. Dichos animales fueron trasladados en febrero de 2020 a la Unidad Didáctica Experimental y Productiva (UDEP), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), en General Pico, provincia de La Pampa, donde fueron dispuestos para el desarrollo del proyecto: alimentación, desparasitación, nuevas condiciones de manejo, constitución de grupos y vacunación.

Los animales fueron distribuidos uniformemente y luego aleatoriamente en dos grupos de 11 cabrillonas cada uno, identificados por color de caravana, amarillo o rojo y número de la misma. El grupo amarillo (gA) recibió dos dosis de vacuna Rev-1 conjuntival, 15 días antes del inicio del servicio (dosis pre-servicio) y su segunda dosis (dosis de gestación) a los 84 ± 13 días, de preñez, mientras que el gR, solo recibió una dosis (dosis de gestación) a los 89 ± 6 días de preñez.

Manejo y servicio

Después de la dosis pre-servicio del gA, los grupos se mantuvieron separados por 15

días, con el objeto de descolonizar las conjuntivas de la dosis vacunal y que no infectaran a los animales del gR (control de no interferencia de inmunidad). Cumplido el plazo, los animales se manejaron juntos (ambos grupos), dando inicio al servicio que duró 48 (gA) y 49 (gR) días. Diariamente pastoreaban en un lote de 5 hectáreas de pasto natural y a la tarde-noche se las encerraba y se les proveía entre 80-100 gr de grano de maíz por animal/día.

Determinación de preñez

La preñez fue determinada tres veces, desde los días 50 a 90 días de iniciado el servicio, por ultrasonografía transabdominal, con un equipo Sonoscape Ultrason, transductor convexo de 5 MHz. El estadio de la preñez fue identificado por la existencia de los siguientes parámetros: presencia de vesícula amniótica o embriones (25 a 30 días de gestación) y/o presencia de cotiledones (más de 40 días de gestación)¹.

Vacunación

La cepa vacunal Rev-1, formulada para su aplicación por vía conjuntival fue utilizada en los dos ojos de cada cabrillona a una concentración de 1×10^9 UFC, en un volumen aproximado de 35 μ L en cada uno.

Serología

Se tomaron cinco muestras séricas, a intervalos variables de tiempo, para el diagnóstico serológico de brucelosis. Una muestra extra se tomó a los 100 días en promedio del aborto o parto de los animales. El suero se obtuvo por centrifugación de las muestras sanguíneas a 1800 rpm durante 15 minutos. Una vez extraído el suero, las muestras previa identificación fueron almacenadas en tubos tipo Eppendorf a -18 °C para su posterior procesamiento en conjunto.

- Los sueros fueron analizados para determinar inmunoglobulinas contra *Brucella* a través de la Prueba tamiz antígeno bufferado en placa (BPA) y la Prueba de polarización fluorescente (FPA).
- Para BPA, 80 μ L de suero fueron mezclados con 30 μ L de antígeno (BPA, Biotandil Diagnósticos) e incubado en una cámara durante 4 minutos

a temperatura ambiente, luego se mezcló nuevamente e incubó por 4 min más hasta su lectura según se describe¹².

- Para FPA, por cada uno de los sueros a procesar se colocaron 960 µL de buffer en tubos de vidrio de 10 x 75 mm, y se le añadieron 40 µL de suero, se agitó en vortex por 5 segundos, se dejó reposar 4 minutos y se realizó la primera lectura en polarímetro para obtener el valor blanco. A continuación, se adicionaron 10 µL de antígeno marcado con fluoresceína, y luego de repetir los pasos de agitación y reposo se reintrodujeron en el polarímetro para la lectura final, expresada en unidades de milipolarización (mP)¹¹.

Bacteriología

- Cabrillonas: dentro de las 12 horas de paridas o abortadas, fueron muestreadas mediante hisopados vaginales, mantenidos y refrigerados en medios de transporte de Cary Blair hasta su siembra, en medios específicos.
- Abortos: a cada feto se le realizó necropsia y se le tomaron muestras asépticas, de hígado, bazo y líquido abomasal, que fueron remitidas en bolsas plásticas estériles. Todas las muestras fueron rotuladas y llevadas a refrigerador (4-8 °C) para su posterior siembra.

Las muestras de tejidos fueron homogeneizadas individualmente en 3 mL de una solución salina estéril de buffer fosfato (PBS). Una alícuota de 0,5 mL, del homogeneizado, fue sembrada en los medios Farrell y CITA, mientras que los hisopos vaginales y el líquido abomasal fueron sembrado directamente en el medio sólido. Las placas fueron incubadas a 37±1 °C sin CO₂ por siete días. Las presuntas colonias positivas fueron identificadas a través de la coloración de GRAM, oxidasa y ureasa. La confirmación de las colonias se realizó a través de la técnica de PCR, en el Departamento de Biología Molecular del Laboratorio Animal del SENASA, Martínez, Argentina.

Descripción de los medios utilizados para bacteriología

- Medio de Farrell: al medio base de *Brucella* (Oxoid) se le adicionó 5 % de suero bovino estéril (Gibco) y se lo suplemento, por litro de medio, con 5 mg de ácido nalidíxico, 25,000 UI de bacitracina, 100 mg de cicloheximida, 5,000

UI de polimixina B, 20 mg de vancomicina y 100,000 UI de nistatina⁸.

- Medio de CITA: al agar sangre base N° 2 (Oxoid) se le adicionó 5 % de suero bovino estéril (Gibco), y se suplementó, por litro de medio, con 20 mg de vancomicina (Sigma N° V-2002), 7,5 mg de colistina, 100,000 UI de nistatina, 10 mg de nitrofurantoina (Sigma) y 8,4 mg de anfotericina B (Sigma), como es descripto por de Miguel *et al*⁵.

Biología molecular

Para el desarrollo de este trabajo se enviaron cinco (5) cepas del género *Brucella spp.* al Departamento de Biología Molecular del Laboratorio Animal de SENASA, para ser tipificadas mediante técnicas moleculares. Las mismas fueron identificadas previamente mediante pruebas bioquímicas por el Departamento de Brucelosis.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de los cultivos

Para la obtención del genoma bacteriano se procedió a la resuspensión de colonias aisladas (a partir de cultivo puro en medio sólido) en 500 µL de agua grado biología molecular. Este procedimiento se llevó a cabo en el Departamento de Brucelosis.

Una vez ingresadas al Departamento de Biología Molecular la extracción del material genómico bacteriano se realizó mediante shock térmico. Para ello se utilizó un termobloque (Thermocell Cooling & Heating - HB 202. BIOER. China), donde se produjo la lisis celular bacteriana y posterior liberación de su ADN mediante calentamiento a 95 °C, durante 10 min con posterior enfriamiento a 4 °C. A continuación, se realizó una centrifugación de 10 min a 8000 rpm para producir el precipitado de los restos celulares y la obtención del sobrenadante como templado (ADN) para la realización de la técnica PCR Multiplex (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Este procedimiento también se realizó para las cepas control y cepas de trabajo. El ADN extraído se conservó a -20 °C.

Amplificación de ácidos nucleicos

Se realizó el procedimiento descripto por López-Goñi *et al.*¹⁰ con modificaciones. La técnica mencionada se conoce como PCR Multiplex o

Bruce-ladder, para la identificación rápida y en un solo paso de la mayoría de las especies del género *Brucella*, así como de las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev-1. Mediante la utilización de ocho (8) pares de cebadores o primers, evaluados en dos (2) con cuatro (4) pares de primers en cada una, y en base a diferencias génicas observadas en análisis comparativos de genoma completo de los tres genomas de *Brucella* secuenciados (*B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*) se logró la identificación molecular de todas las especies conocidas del género.

Para llevar a cabo las diferentes reacciones de amplificación se utilizó un termociclador (Thermal Cycler 2720 – Applied Biosystems. Singapore).

Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis

Una vez realizadas las diferentes reacciones, los productos o amplicones de las mismas fueron sembrados en geles de agarosa al 2 %, teñidos con Bromuro de Etidio (BioBasic

INC., solución 10 mg/ml) y sometidos a corridas electroforéticas durante 30 min a 80 V. Para ello se utilizaron cubas electroforéticas (Wide Mini-Sub Cell GT – BIORAD. Argentina).

Una vez finalizadas las electroforesis, los geles fueron revelados/visualizados utilizando un transiluminador de luz UV (Macro Vue UV-20 – Hoefer Pharmacia Biotech. San Francisco CA, USA) y fotografiados mediante cámara (Easy Share Z7590-Kodak. China) (Figura1).

RESULTADOS

El servicio natural tuvo una duración de 49 días, entre fines del otoño y principios del invierno. La diferencia en el servicio radica en que el gA, al recibir su dosis pre-servicio se mantuvo aislado por 15 días, para evitar la transmisión, mientras que en el gR ya se había incorporado el castrón (Tabla 1). El porcentaje de preñez fue de 82 % para el gA y de 91 % para el gR, no hallándose diferencias significativas entre los grupos ($p \leq 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los grupos

	<i>gR</i>	<i>gA</i>
	Fecha de vacunación	
Dosis pre-servicio	No se aplica	08 junio de 2020
Dosis gestación	11 septiembre de 2020	28 septiembre de 2020
	Fecha de servicio	
Fecha de inicio	08 junio de 2020	22 junio de 2020
Fecha de finalización	27 de julio de 2020	9 agosto de 2020

Independientemente del grupo, todos los animales fueron negativos por serología al inicio del trabajo. La primera muestra serológica del gA, se tomó 15 días después de aplicada la dosis pre-servicio, resultando todos los animales positivos a BPA y FPA. Los animales de este grupo se fueron negativizando a lo

largo del período gestacional y se mantuvieron positivos mayormente durante el tiempo que involucró tres muestras sanguíneas hasta la aplicación de la dosis de gestación (Tabla 2). La última muestra sanguínea fue al momento del parto u aborto, resultando nuevamente todos los animales positivos. Por el contrario, el gR se

mantuvo negativo durante el período gestacional, hasta que recibió la dosis de gestación, en adelante, los animales mostraron serología positiva al momento del aborto/parto (Tabla 3).

Tabla 2. Diagnóstico serológico gA

Número de orden	Grupo Amarillo	Número de Muestras										
		1 ^{er}		2 ^{do}		3 ^{er}		4 ^{to}		5 ^{to}		6 ^{to} *
		24/04/20	22/06/20	06/07/20	11/09/20	Parto	a 100 días					
	Cabras	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA
1	1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
2	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	3	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
4	4	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
5	5	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
6	6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	7	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
8	8	-	-	+	+	+	+	+	-	Vacía		-
9	9	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
10	10	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
11	11	-	-	+	+	+	+	-	-	Vacía		-

*a 100 días del último parto.

Tabla 3. Diagnóstico serológico gR.

Número de orden	Grupo Rojo	Número de Muestras										
		1 ^{er}		2 ^{do}		3 ^{er}		4 ^{to}		5 ^{to}		6 ^{to} *
		24/04/20	22/06/20	06/07/20	11/09/20	Parto/Aborto	a 100 días					
	Cabras	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA	FPA	BPA
1	51	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2	52	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3	53	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4	54	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
5	55	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6	56	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	57	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8	58	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	61	Sin datos		-	-	-	-	-	-	+	+	+
11	62	-	-	-	-	-	-	-	-	Vacía		-

*a 100 días del último parto/aborto.

Las nueve hembras preñadas del gA parieron a término, cabritos viables y al hisopado vaginal al parto y a los 5 días posteriores del mismo, resultaron negativas por bacteriología (Tabla 4). Por el contrario, el 80 % de las cabras del gR abortó, solo 2 % (2 cabras) parieron a término cabritos viables, pero clínicamente débiles (Tabla 5), observándose a la comparación de medias entre los dos grupos diferencias significativas ($p \leq 0,0001$). El hisopado vaginal

de la totalidad de las hembras de este grupo resultó positivo por bacteriología al momento del aborto/parto y a los 5 días posteriores del mismo. Dichos abortos ocurrieron a los $45,9 \pm 12,3$ días del desafío vacunal.

La primera cabrillona vacunada con la cepa Rev-1, a mitad de gestación, abortó por causas del desafío vacunal a los 31 días post-inoculación (DPI) y que el promedio del resto de las cabrillonas hasta el aborto fue de 40 DPI.

Tabla 4. Bacteriología gA

N° de orden	gA - Bacteriología			Madre
	Cabras	Fecha	Hisopo	Placenta
1	01	1-dic	-	no hallada
2	02	19-nov	-	-
3	03	3-nov	-	no hallada
4	04	14-dic	-	no hallada
5	05	15-dic	-	no hallada
6	06	26-nov	-	-
7	07	12-dic	-	no hallada
8	08		Vacía	
9	09	24-nov	-	no hallada
10	10	23-nov	-	no hallada
11	11		Vacía	

Tabla 5. Bacteriología gR

N° de orden	gR - Bacteriología				Madre	Cría		
	Cabras	Fecha	1° hisopo	2° hisopo		Liq. Abom.	Hígado	Bazo
1	51	11-nov	+	+		Perdimos feto		
2	52	21-oct	+	+		+	+	+
3	53	16-nov	+	+		+	+	+
4	54	26-oct	+	+		+	+	+
5	55	31-oct	+	+		+	+	+
6	56	1-nov	+	+		Parto normal		
7	57	18-oct	+	+		+	+	+
8	58	3-nov	+	+		Parto normal		
9	60	12-oct	+	+		+	+	+
10	61	18-oct	+	+		+	+	+
11	62				Vacía			

De los nueve fetos abortados del gR, uno no se pudo hallar, y a los restantes se le realizó necropsia dentro de las primeras 12 horas de ocurrido el evento. Todas las muestras fueron sembradas por duplicado en medios de Farrell y CITA, observándose desarrollo de colonias típicas, compatibles con *Brucella*, entre los 5-7 días de iniciada la incubación. Las cepas aisladas, en la

corroboración a través de las pruebas bioquímicas de la catalasa y oxidasa, resultaron negativas a ambas, con lo cual se infiere la presencia de la cepa de *Brucella melitensis*. En la identificación molecular, de todas las muestras (Figura 1.) se observa el perfil completo de amplificación correspondiente a *Brucella melitensis* cepa vacuna Rev-1.

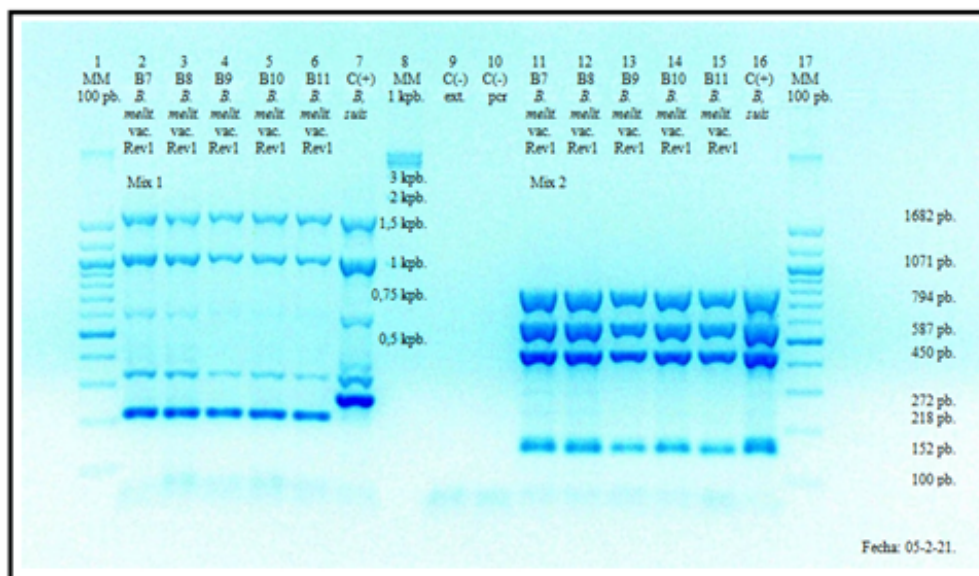


Figura 1. Tipificación Bruce-ladder: Análisis de diferentes cepas de *Brucella spp.*, con amplificación en el control positivo C (+) utilizado de *B. suis*.

La técnica conocida como PCR Multiplex o Bruce-ladder, permite la tipificación en un solo paso para todas las especies del género como así también de las diferentes cepas vacunales. Esto se logra mediante la utilización de ocho (8) pares de primers que permiten establecer un perfil de bandas característico para cada una de ellas. En el caso particular de los cultivos analizados, lo que diferencia a las cepas vacunales de *B. melitensis* Rev-1 respecto de *B. melitensis* salvaje, es la obtención de amplificadas con bandas visibles en 218 pb., como se observa en la Mix 1 de la Figura 1, no obteniéndose dicho producto de amplificación en especies de *B. melitensis* salvaje. Es decir, comparten todo el perfil de estas bandas (1682 pb., 1071 pb., 794 pb., 587 pb., 450 pb. y 152 pb.) pero sólo las cepas vacunales Rev-1 amplifican el par en 218 pb.

DISCUSIÓN

La brucelosis caprina continúa siendo una enfermedad endémica en ciertas provincias del norte argentino y como consecuencia de ello, un importante número de seres humanos se infectan anualmente. En base a la elevada prevalencia de la enfermedad en caprinos, el Servicio Nacional de Sanidad Animal en conjunto con las provincias instauraron un plan de control de la enfermedad¹³. Entre las medidas adoptadas, se indicó la aplicación masiva de la vacuna Rev-1 a caprinos jóvenes y adultos, con el objeto de controlar la enfermedad. Pero dadas estas condiciones reales de dicha práctica, fue tema de cuestionamientos debido a que se producen abortos, como era de esperar y tal como se demostró en el presente trabajo en las hembras gestantes que son primovacunas.

La persistencia de inmunoglobulinas, específicamente del isotipo G, se asocia a la permanencia de un estímulo antigénico⁷, lo cual es compatible con los resultados hallados en el presente trabajo, ya que todas las cabras (gA y gR) se tornaron serológicamente positivas al muestreo subsiguiente a la vacunación conjuntival, reflejando así la estimulación del sistema inmunitario.

La prolongación de un estímulo antigénico, se asocia a intensidad de la infección⁷, y está última a manifestaciones clínicas como el aborto, en coincidencia con la persistencia de los títulos séricos de inmunoglobulinas observados en este trabajo, que fueron diferentes entre los grupos, manteniéndose a los cien (100) días posteriores del último aborto/parto significativamente positivos un mayor número de animales del grupo sin primovacuna gestante (gR), que fue el que presentó abortos. Priorizando la etapa de máxima susceptibilidad a la infección durante la gestación, la dosis desafío, se aplicó, en base a lo observado por Blasco² en ovinos, entre los 60-90 días de gestación. Por lo acaecido en el presente trabajo, la patogenia en ambas especies comparte similitudes, ya que al igual que en los ovinos, la mayoría de las cabras del gR abortaron, en promedio a los 45,9 días (sd=12,3 días), dato que concuerda con otros autores^{2,9}. El desafío vacunal entre los 60-90 días de gestación arrojó un 80 % de abortos, mientras que otros vacunando a los 120 días, observaron que los abortos se redujeron significativamente⁹.

En concordancia con los datos informados por otros grupos de investigadores^{9,14}, el aislamiento de la cepa Rev-1 en el hígado, bazo y líquido abomasal de todos los fetos abortados, como de los hisopos vaginales de las madres, hasta las 12 horas de ocurrido el aborto y a los cinco días posteriores, reflejan la virulencia residual de la cepa vacunal.

En respuesta al objetivo planteado, la información inédita y relevante que se observó, fue el comportamiento de las cabras ante el protocolo de la vacunación ejecutado en el que recibieron dos dosis de vacuna Rev-1 conjuntival (dosis pre-servicio y dosis de gestación) (gA). La aplicación de la dosis vacunal pre-servicio generó una respuesta inmunitaria que se manifestó en una sólida protección contra el aborto y la infección ante el desafío utilizado. Tal fue el caso, que la totalidad de las cabras de dicho grupo parieron a

término, cabritos viables y los hisopados vaginales de sus madres fueron negativos al parto y a los 5 días posteriores del mismo; mientras que difiere del comportamiento registrado con el protocolo del testigo.

Es destacable el hecho de que estos resultados se hayan obtenido con un reducido número de animales, dado que, son comparables con las observaciones hechas en campañas de vacunación caprina y ovina sobre millones de animales en España y países de la Unión Europea^{3,4}. Otros hallazgos relevantes fueron que la primera cabrilla vacunada con la cepa Rev-1, a mitad de gestación, abortó por causas del desafío vacunal a los 31 días post-inoculación (DPI) y que el promedio del resto de las cabrillonas hasta el aborto fue de 40 DPI.

El nivel de representatividad de los resultados, comparables con aquellos observados en cientos de majadas, con las inevitables diversidad de entornos y de animales, fue posible debido a requisitos indispensables como: la uniformidad, condición sanitaria y desempeño productivo de los animales y del establecimiento de origen; y haber realizado el desafío a mitad de gestación, con la vacuna Rev-1, de aquellas aplicadas en las campañas de vacunación caprina en Argentina, vigente mediante todos los controles de SENASA. Además, el desafío se ejecutó mediante la descarga de la máxima dosis establecida con lo cual se logra el efecto máximo sobre el grupo.

Este atributo en la representatividad señalada, sobre lo que antes se conocía desde la praxis de las campañas de vacunación, y ahora desde este ensayo controlado, se puede devolver como conocimiento de nueva información generada y corroborada, al ámbito de su aplicación en las campañas de vacunación para sus beneficios y consecuencias. En este trabajo también se demuestra que lo esperable en una primovacuna gestacional, es que solo las cabras que están entre 60 – 90 días de gestación en promedio aborten a los 40 DPI y que finalmente a los 60 DPI ya aparecen los partos viables. Con ello se desacreditan todos los reclamos generados por cualquier pretexto, habitualmente para demandar resarcimientos indebidos.

A partir de este estudio se consolida y fortalece las argumentaciones de manera pública, con el aval interinstitucional SENASA – FCV, UNLPam., respecto al salto de calidad que significa incorporar a la propia especie caprina para el

control de la virulencia de las vacunas, y por ende asegurar sus propiedades inmunogénicas para la propia especie. SENASA ya había observado y estudiado a una majada con tormentas de abortos por la vacunación mal aplicada, a mitad de gestación, verificando la relación causal de la virulencia de la cepa Rev-1 con los abortos, habiendo descartado antes, a otros agentes abortigénicos intervinientes (Bagnat-Azin, Castellino, comunicación personal).

Por consiguiente, y como futuras líneas de investigación interinstitucional se destaca el estudio de correspondencia de la virulencia establecida para los abortos, con otras dimensiones patogénicas de la virulencia, para así, establecer las condiciones que determinan su equivalencia. Las mismas podrían ser: 1- septicemia; 2- colonización; 3- invasividad en el caprino.

CONCLUSIÓN

La primo-vacunación conjuntival con la cepa Rev-1 en cabras no gestantes, induce un estado de resistencia inmunitaria que previene el aborto y la diseminación vaginal de la infección, ante un subsiguiente desafío por la misma cepa vacunal (Rev-1) durante el máximo período de susceptibilidad de la gestación al aborto.

Los presentes resultados aportan información que respaldan los programas de control mediante la vacunación instaurados conforme a la Resolución Senasa 372-E/2017.

AGRADECIMIENTOS

Todo ello ha sido posible por la voluntad de dos instituciones (FCV-UNLPam., – SENASA) que se complementaron y articularon responsablemente conforme a sus respectivas competencias en un proyecto interinstitucional común. Se destaca además que la tarea interinstitucional, nos muestra como esta relación tiene propiedades emergentes, que nos revelan nuevos caminos a seguir.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bidinost, F.; Gibbons, A.; Cueto, M. 1999. Ecografía para el diagnóstico de preñez en ovinos y caprinos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. N° 68. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/68-ovinos.pdf
2. Blasco, J.M. Control y Profilaxis. Brucelosis ovina. Monografía. *Ovis*. 1990; 8:65 – 69.
3. Blasco, J.M. A review on the use of *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med*. 1997; 31(3-4): 275-283.
4. Blasco, J.M. Estrategias de control. Vacunas actuales y de nueva generación. *Ovis*. 2002; 82: 87-101.
5. de Miguel, M.J.; Marín, C.M.; Muñoz, P.M.; Dieste, L.; Grilló, M.J.; Blasco, J.M. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(4): 1458-1463.
6. Departamento de Epidemiología, Informe Especial, Provincia de Mendoza. Brucelosis (Fiebre de Malta). Año 2017.
7. Ducrottoy, M.J.; Conde-Álvarez, R.; Blasco, J.M.; Moriyón, I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016; 171: 81-102.
8. Farrel, I.D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci*. 1974; 16(3): 280-286.
9. Jiménez de Bagués, M.P.; Marín, C.M.; Barberán, M.; Blasco, J.M. Responses of ewes to *B. melitensis* Rev 1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann Vet Res*. 1989; 20: 205-213.
10. López-Goñi, I.; García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; de Miguel, M.J.; Muñoz, P.M.; Blasco, J.M.; Jacques, I.; Grayon, M.; Cloeckert, A.; Ferreira, A.C.; Cardoso, R.; Correa de Sá, M.I.; Walravens, K.; Albert, D.; Garin-Bastuji, B. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(10): 3484-3487.
11. Nicola, A.M.; Elena, S.; Alonso, B.; Esteves Madero, J. Evaluation of the Fluorescence Polarization Assay (FPA) for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats in Argentina. *Prilozi*. 2010; 31(1): 133-143.
12. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2018. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para Animales Terrestres. <http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>.

13. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Resolución E372/2017. Plan Nacional de Control de Brucelosis Caprina.
14. Zundel, E.; Verger, J.M.; Grayon, M.; Michel, M. Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine: safety and serological responses. *Ann Vet Res.* 1992; 23: 177-188.