

Trabajo de investigación

Respuesta inmune en caprinos criollos vacunados con la vacuna *Brucella melitensis* REV 1 aplicada por vía conjuntival

*Immune response in creole goats vaccinated with the *Brucella melitensis* REV 1 vaccine applied by the conjunctival route*

Carlos Alejandro Robles*; María Marta Chodilef; Francisco Raúl Cabrera

Grupo de Salud Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA - CC: 277 (8400) Bariloche, Argentina.

e-mail: robles.carlos@inta.gob.ar / roblesbari@gmail.com

(Recibido 18 de julio 2019; aceptado 9 de marzo 2020)

RESUMEN

Se evaluó la respuesta inmune humoral producida por la vacuna *Brucella melitensis* REV 1 conjuntival en caprinos criollos. Se utilizaron 11 caprinos adultos divididos en 3 grupos: G1 (5 hembras) y G2 (3 machos) que fueron vacunados con una dosis vía conjuntival de 1×10^9 de *B. melitensis* REV1; y G3 (3 cabras) sin vacunación. Los 3 grupos fueron sangrados en 21 oportunidades durante los 360 días que duró el estudio. Las muestras de suero fueron procesadas mediante las pruebas de aglutinación en placa con antígeno buferado (BPA), fluorescencia polarizada (FPA) y ELISA indirecto (I-ELISA). La vacuna produjo a partir del día 21 una fuerte respuesta inmune. Mientras que las 5 cabras (G1), se negativizaron a los 180 días post vacunación con las técnicas de FPA y el I-ELISA, los 3 machos (G2) permanecieron positivos a las tres pruebas hasta el final del estudio. Estos resultados son los primeros reportados en Argentina, confirmando la buena respuesta inmune que genera la vacuna REV1 conjuntival en caprinos criollos adultos y la habilidad de los test de FPA e I-ELISA, para negativizarse de manera temprana a los anticuerpos post vacunales en hembras vacunadas conjuntivamente.

Palabras clave: brucelosis, REV1, conjuntival, serología, caprinos

INTRODUCCIÓN

La brucelosis caprina es una enfermedad infecto-contagiosa crónica producida por una bacteria denominada *Brucella melitensis*^{1,2}. Afecta principalmente a caprinos sexualmente maduros. En hembras produce aborto en el último tercio de la gestación, seguido de retención de placenta y eventualmente metritis supurativa. También puede causar mastitis con la consiguiente merma en la producción de leche. En machos la enfermedad cursa con orquitis, acompañada de semen de mala calidad e infertilidad, por lo que se afectan de manera negativa las tasas reproductivas de los hatos y la rentabilidad de los establecimientos³⁻⁵. También afecta al ser humano, causando la Fiebre de Malta o Fiebre ondulante^{6,7}. Esta enfermedad es considerada por la OMS como una de las zoonosis más importantes a nivel mundial y por la OIE como una enfermedad de denuncia obligatoria, según el

ABSTRACT

The humoral immune response conferred by the conjunctival *Brucella melitensis* REV 1 vaccine was evaluated in creole goats. Eleven adult goats were assigned to 3 groups: G1 (5 females) and G2 (3 males) were vaccinated with a conjunctival dose of 1×10^9 of *B. melitensis* REV 1, G3 (3 females) were unvaccinated. The three groups were bled 21 times during the 360 days of the study. Serum samples were analyzed through the Buffered Plate Agglutination Test (BPA), Fluorescence Polarization Assay (FPA) and indirect ELISA test (I-ELISA). From day 21, a strong immune response was produced by the vaccine. While the five vaccinated females (G1) became negative 180 days post vaccination to FPA and I-ELISA tests, the 3 vaccinated males (G2) remained positive to all three tests until the end of the study. These results are the first reported in Argentina confirming the good immune response produced by the conjunctival delivery of REV1 vaccine in adult creole goats, and also the ability of FPA and I-ELISA tests for an early negativization to vaccinal antibodies in conjunctivally vaccinated females.

Keywords: brucellosis, REV 1, conjunctival, serology, goats

código de enfermedades de animales terrestres⁸.

La enfermedad tiene una amplia distribución mundial y es endémica en todos los países europeos del Mediterráneo, países del Medio Oriente, Latinoamérica, centro y oeste de Asia y esporádicamente en países de África y en la India^{9,10}. Por estas razones es que se realizan grandes esfuerzos a nivel mundial para lograr su control y prevención.

En Argentina, de acuerdo a una revisión bibliográfica realizada en 2014 que analizó la información disponible sobre brucelosis caprina en toda la Argentina¹¹, se pudo determinar que la enfermedad tiene una distribución irregular en el territorio. Existen áreas endémicas con prevalencias consideradas altas en las provincias de Mendoza, sur de San Juan, este de Salta, oeste de Formosa y algunos departamentos de las provincias de La Rioja y Catamarca; prevalencias bajas en algunos departamentos de las provincias de Córdoba, San Luis, Tucumán, Santiago del Estero y oeste de Chaco; áreas donde no hay indicios

de que la enfermedad esté presente como la quebrada de Humahuaca, valles áridos de Salta y algunos departamentos de Catamarca y Tucumán y provincias de Buenos Aires, La Pampa, Corrientes, Misiones, Entre Ríos y Santa Fe. En las provincias de Río Negro, Neuquén, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego nunca se detectó la enfermedad, por lo que en 2017 fueron declaradas libres de *Brucella melitensis* mediante la resolución 857-E/17 del SENASA. Más recientemente, Russo y col.¹², ampliaron la información de la provincia de Formosa, con un nuevo estudio sobre 25401 animales, hallando prevalencias del 3,6%, el 12% y el 36 % para las regiones este, centro y oeste de dicha provincia. Trezeguet y col.¹³ aportaron información sobre un muestreo realizado en Santiago del Estero, donde sobre 4920 muestras obtenidas de 164 hatos caprinos, todos los sueros resultaron negativos a la serología.

Para el control de la enfermedad se dispone básicamente de 2 herramientas que son (a) el diagnóstico con el descarte de los animales positivos y (b) la vacunación.

En el caso del diagnóstico, se cuenta tradicionalmente con el cultivo y aislamiento de la bacteria¹⁴, a lo cual hoy se suma la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la identificación del ADN de la bacteria aislada en un término de 24-48 horas, en comparación con las técnicas microbiológicas tradicionales que demandan entre 7 y 10 días¹⁵. Por otro lado se cuenta con técnicas serológicas como la aglutinación en placa con antígeno Rosa de Bengala (RB) y antígeno buferado (BPA), aglutinación lenta en tubo (SAT) y con 2-mercaptoetanol (2-ME), fijación del complemento (FC), enzimo-inmunoensayos (ELISA) y fluorescencia polarizada (FPA), que permiten detectar anticuerpos contra el agente causal en suero sanguíneo^{8,14,16}.

En el caso de la vacunación se utiliza la vacuna *Brucella melitensis* REV 1, que es hasta el presente la única vacuna con aceptación y uso universal y aconsejada por la OIE⁹. Esta vacuna puede aplicarse de manera subcutánea o conjuntival, pero en la actualidad la recomendación es utilizar la vía conjuntival por ser más segura tanto para el operador como para el animal, ya que se ha demostrado que disminuye tanto su excreción en leche como la tasa de aborto en caso de ser aplicada por error en una hembra preñada¹⁷⁻¹⁹. Si bien esta vacuna genera una sólida respuesta inmune, es también sabido que interfiere con el diagnóstico serológico, aunque no es claro durante cuánto tiempo y con qué intensidad ocurre esa interferencia, según las técnicas diagnósticas que se utilicen y el protocolo aplicado para la realización de las mismas^{17,18,20} y teniendo en cuenta además el sistema de producción caprina extensivo argentino, donde no está asegurada una alimentación adecuada a lo largo del año, que puede interferir con la respuesta inmune a nivel individual o grupal.

Desde el año 2006 en que fuera aprobada por Resolución 216/2006 del SENASA y hasta el presente, se usa la vacuna *Brucella melitensis* REV 1 como método de control de la brucelosis caprina en áreas endémicas de la Argentina. Sin embargo, no se ha determinado la respuesta inmune humoral que genera en nuestro ganado criollo y cómo interfiere con las pruebas serológicas oficiales que se utilizan en el país, como son RB, BPA, FC, SAT, 2-ME, I-ELISA y FPA, información que es de vital importancia para el monitoreo de los planes de vacunación.

La importancia de esta enfermedad en el país radica en el efecto negativo que genera en la producción caprina y la repercusión que tiene en la salud pública, sobre todo en el sector de pequeños productores con necesidades básicas insatisfechas. Se realizó un ensayo controlado en instalaciones del Campo Experimental del INTA Bariloche, con la finalidad de contar con datos objetivos sobre la respuesta inmune humoral que genera la vacuna *Brucella*

melitensis REV1 aplicada de manera conjuntival en caprinos criollos adultos y evaluar las pruebas serológicas de BPA, FPA y ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y lugar de trabajo

El trabajo se realizó en el Campo Experimental Pilcaniyeu (CAP) del INTA Bariloche donde se trabaja bajo normas de buenas prácticas y bienestar animal. Se utilizó un potrero cuarentenario de 8.3 ha de superficie, con doble alambrado perimetral, para evitar el contacto con otros animales, con pastura natural y agua *ad libitum*, ofrecida en bebederos automáticos.

La cantidad de animales a utilizar en el ensayo se ajustó a la disponibilidad del CAP. Se utilizaron 11 caprinos de raza criolla, de 4 años de edad, libres de brucelosis y que nunca fueron vacunados con *Brucella melitensis* REV 1. A fin de lograr un grupo homogéneo de animales, los mismos se seleccionaron de la majada del CAP teniendo en cuenta el peso y la condición corporal. El lote de hembras resultó con un peso promedio de 41 Kg y el lote de machos con un peso promedio de 59 Kg. Los animales estuvieron sujetos a controles sanitarios previos y durante el estudio consistentes en serología de *Brucella* antes de iniciar el ensayo, desparasitación contra nematodos gastrointestinales y *Fasciola hepatica*, control de ectoparásitos y dosis anual de una vacuna anticlostridial polivalente. En oportunidad de cada muestreo, se midió la condición corporal de los animales a fin de comprobar que nunca estuvieran por debajo de 2 grados (medido en una escala de 1 a 5), que se considera adecuado para animales a campo sobre pastura natural.

Diseño del ensayo

El ensayo se extendió por el término de 360 días. En el día cero los animales fueron divididos en 3 grupos homogéneos según sexo y peso corporal. Se les extrajo sangre sin anticoagulante de la yugular para la obtención de suero, con los animales en pie, utilizando tubos de 10 ml y agujas Vacutainer® a la totalidad de los animales y luego fueron vacunados de la siguiente manera:

Grupo 1 (G1): 5 hembras con una dosis completa de 1×10^9 de vacuna comercial *B. melitensis* REV 1 aprobada por el SENASA, mediante la deposición de una gota de 30 μ l en el ojo izquierdo.

Grupo 2 (G2): 3 machos vacunados de la misma manera y con la misma vacuna que el G1.

Grupo 3 (G3): 3 hembras que actuaron como controles sin vacuna alguna, a las que se les depositó una gota de 30 μ l de solución fisiológica en el ojo izquierdo.

Tras la vacunación, todos los animales fueron sangrados a los 7, 15, 22, 30, 37, 45, 52, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 días con la misma metodología y materiales que la primera vez. Una vez obtenidos los sueros por separación natural, fueron conservados en tubos Eppendorf por duplicado y congelados en freezer a -20°C hasta su procesamiento.

En cada fecha de sangrado, el equipo de trabajo procedió a realizar una revisión clínica de los animales, consistente en observación de ojos y párpados en busca de irritación o congestión que pudiera estar indicando algún efecto adverso de la vacuna a nivel local. Además se palparon los ganglios linfáticos submaxilares, parotídeos, retro-faríngeos, pre-escapulares y pre-craurales y se midió la temperatura corporal vía rectal. En el caso de los 3 machos, se revisaron además los órganos reproductivos externos (testículos y epidídimos) por palpación.

Pruebas de laboratorio

La totalidad de las muestras de suero de los 3 grupos de animales fueron procesadas mediante las siguientes técnicas diagnósticas:

Agglutinación rápida en placa con antígeno buferado (BPA Biotandil®). Consistió en colocar sobre una placa de vidrio 80 µl de suero y 30 µl de antígeno BPA y se homogeneizó con espátula. Al cabo de 5 minutos se agitó la muestra con suaves rotaciones de la placa de vidrio y a los 8 minutos se leyó la prueba. La presencia de aglutinación en la mezcla, se interpretó como un resultado positivo, según lo estipulado por el Manual Técnico de Brucelosis del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)²¹.

Fluorescencia polarizada (FPA). Se utilizó un kit comercial (Kit Brucelosis FPA, Biotandil). Se colocó 1 ml de solución buffer en un tubo de Khan y a ello se agregaron 40 µl de suero. Se vortearon las muestras, se dejaron descansar por 2 minutos y se leyó la fluorescencia de base en el polarímetro. Seguidamente se agregaron 10 µl de antígeno de *Brucella* conjugado, se vorteo, se dejó reposar por 2 minutos y se hizo la lectura final en un polarímetro Senti 200 (Diachemix). Un valor igual o mayor a 87 unidades de milipolarización (ump) se consideró un resultado positivo, de acuerdo a lo estipulado por el Manual Técnico de Brucelosis del SENASA²¹.

Test de Enzimo-inmunoensayo indirecto (I-ELISA). Se utilizó un test de Elisa indirecto para brucelosis caprina desarrollado en el Laboratorio de Serología del INTA Bariloche en 1999²², modificado a partir del año 2005 según se detalla a continuación. Se utilizaron placas de poliestireno (NUNC 269620). Como antígeno se usó el lipopolisacárido liso de *Brucella abortus* a una concentración de 5 µg/ml en búfer carbonato 0,06 M, pH 9,6, a razón de 100 µl por pocillo. Tras un ciclo de 3 lavados con una solución buferada de fosfatos (PBS) 0,01M, se agregaron a cada placa 100 µl de los sueros controles por duplicado (positivo fuerte y negativo) y 100 µl de los sueros problema, todos diluidos 1:200 en PBS-T y se incubaron a 27°C durante 60 minutos. Terminada la incubación, las placas fueron lavadas tres veces con PBS-T y se les agregó 100 µl por pocillo de una dilución 1:5000 de proteína A/G recombinante conjugada comercial (Thermo) y se incubó a 27°C por 60 minutos. Tras la incubación, las placas fueron lavadas nuevamente tres veces con PBS-T y se les agregó 100 µl por pocillo de una solución de sustrato/cromógeno compuesta por un búfer citrato 0.05M pH 4,5 más 0,5 µl peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 2,5 µl de una solución 0.040M de ABTS. Las placas fueron incubadas por 10 minutos a 27°C bajo agitación y se leyeron en un espectrofotómetro Multiskan (Labsystems) a 414 nm. Los resultados de cada suero control y de los sueros problema analizados fueron expresados como el porcentaje de positividad (PP) de la densidad óptica (DO) producida por cada suero problema respecto a la media de la DO producida por el suero control positivo fuerte. La validez de cada placa se determinó mediante la DO del suero control positivo fuerte, que debe caer dentro de un rango de DO de 0,850 a 1,150 y del suero control negativo, que debe producir una DO igual o menor a 0,200.

El punto de corte que determina la clasificación de un suero como positivo, fue estandarizado en 2005 mediante el uso de una colección de 42 sueros provenientes de animales con aislamiento de *Brucella melitensis* y de 320 sueros negativos provenientes de campos libres de *Brucella melitensis*, fijándose mediante el uso del test de ROC (MedCalc Ver 18.11.3), en un valor de PP igual o mayor a 30.

El software SPEIA utilizado para la lectura y cálculos de los resultados del test de I-ELISA, fue desarrollado por Walter Kelly del Animal Disease Research Institute (ADRI),

Canadian Food Inspection Agency, Canadá.

Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias estadísticas en los valores promedio de los títulos de anticuerpos generados por la vacuna en el G 1 (hembras vacunadas) con respecto al G 3 (hembras controles sin vacunar), se utilizó el test de comparación de medias con un $\alpha = 0.05$, con el programa MedCalc, Ver 18.11.3 (Bélgica, 2019). Las diferencias se calcularon al momento de producirse el pico máximo de anticuerpos y luego, al momento de menor lectura de anticuerpos.

RESULTADOS

En las sucesivas revisiones clínicas que se realizaron en oportunidad de cada sangrado, nunca se detectó congestión o irritación en los ojos, decaimiento, alteraciones palpables en los ganglios linfáticos superficiales, ni lesiones en testículos y epidídimos de los 3 machos. Las temperaturas corporales siempre se mantuvieron dentro de la normalidad y nunca superaron los 39.8°C.

Prueba del BPA

G1: A partir del día 15 el 100% de las hembras arrojaron resultados positivos, y así se mantuvieron hasta el día 105. El día 120 aparece el primer suero negativo, el día 210 dos nuevos sueros negativos y para el día 240 todos los animales resultaron negativos, a excepción de una cabra que continuó dando resultados positivos hasta el día 360, en que finalizó el ensayo.

G2: A partir del día 15 el 100% de los machos resultaron positivos y así se mantuvieron hasta el final del ensayo.

G3: El 100% de los animales permanecieron siempre negativos a lo largo de todo el ensayo.

Prueba de la FPA

Los resultados de la FPA se muestran en la figura 1. En el G1 a partir del día 15 se detectó la presencia de anticuerpos y para el día 22 todas las cabras resultaron positivas con un valor promedio de 159 ump (DE 28,9). Los valores de anticuerpos continuaron elevándose hasta alcanzar su pico máximo a los 37 días post vacunación con 168 ump promedio (DE 49,4), para luego decaer rápidamente hacia el día 90 con 82 ump (DE 23,2) y seguir así en valores por



Figura 1. Niveles de anticuerpos en caprinos vacunados con vacuna REV 1 conjuntival, medidos mediante un test de fluorescencia polarizada a lo largo de los 360 días que duró el estudio y expresados como unidades de milipolarización (ump). G1 (5 hembras vacunadas); G2 (3 machos vacunados); G3 (3 hembras sin vacunar).

debajo de la línea de corte hasta el final del ensayo. A partir del día 180, todas las cabras ya eran negativas a la prueba con un valor promedio de 64 ump (DE 13,0).

En el G2 al igual que para el G1, a los 15 días se detectó la presencia de anticuerpos y al día 22 los tres animales resultaron positivos con un valor promedio de 118 ump (DE 16,4). El pico máximo de anticuerpos ocurrió a los 45 días post vacunación con 137 ump promedio (DE 28,5). Luego la curva comenzó a descender de manera amesetada, y todos los animales permanecieron positivos hasta el final del ensayo, con un valor promedio de 98 ump (DE 7,4) el día 360 del ensayo.

En el G3 los animales se mantuvieron siempre negativos a lo largo de todo el ensayo con un valor promedio de 62 ump (DE 4,9).

Al realizarse la comparación de medias de anticuerpos del G1 respecto al G3 en el día 37, en que el G1 alcanzó el pico de anticuerpos (mayor valor de ump), se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos con un valor de $p=0,0125$. Sin embargo, al comparar el G1 con el G3 el día 180, en que todos los animales del G1 se negativizaron, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,2994$) entre ambos grupos.

Prueba de I-ELISA

Los resultados de la prueba de I-ELISA se muestran en la figura 2.

En el G1 se detectó la presencia de anticuerpos a partir del día 15 y al día 22 el 100% de los animales resultaron positivos (PP>30) con un PP promedio de 67,2 (DE 19,4). A partir de allí los niveles de anticuerpos continuaron subiendo hasta el día 45, alcanzando un PP de 113 (DE 14,1) y a partir de allí comenzaron a bajar hasta negativizarse el total de los

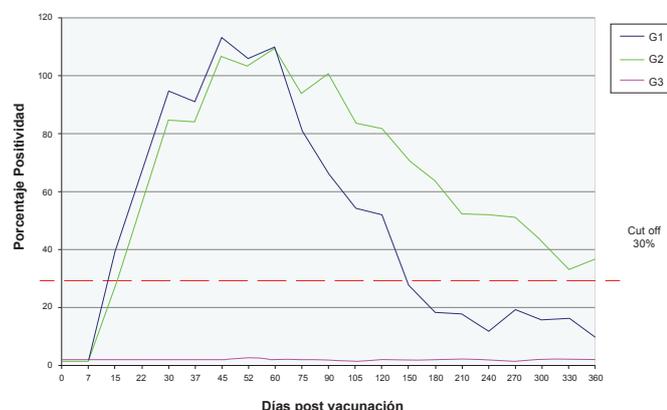


Figura 2. Niveles de anticuerpos en caprinos vacunados con la vacuna REV 1, medidos mediante un test de I-ELISA indirecto a lo largo de los 360 días que duró el estudio y expresados como porcentajes de positividad respecto al suero control positivo de referencia. G1 (5 hembras vacunadas); G2 (3 machos vacunados); G3 (3 hembras sin vacunar).

animales el día 180 con un PP promedio de 18,0 (DE 11,3).

En el G2 a partir del día 22 el 100% de los machos presentaron resultados positivos con un PP de 53,3 (DE 26,6). A partir de ese momento, los niveles de anticuerpos continuaron subiendo hasta el día 60 (PP: 109) en que comenzaron a descender. Sin embargo, estos animales nunca se negativizaron, y llegaron al día 360 del ensayo con un valor de PP promedio de 34 (DE 2,1).

En el G3 todos los animales se mantuvieron negativos a lo

largo del ensayo con un PP promedio de 1,9 (DE 0,1).

Cuando la comparación de medias de anticuerpos del G1 respecto al G3 se realizó en el día 45 en que G1 alcanzó el pico de anticuerpos (mayor valor de PP), se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, con un valor de $p=0,0001$. Sin embargo al comparar G1 con G3 en el día 180 en que todos los animales del G1 se negativizaron, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,0667$) entre ambos grupos.

DISCUSIÓN

La vacuna *Brucella melitensis* REV 1, aplicada en forma conjuntival en dosis completa en adultos, produjo una buena respuesta inmune humoral, similar a lo descrito por otros autores^{17,18,20}.

A diferencia de lo que ocurre con la aplicación de esta misma vacuna por la vía subcutánea, al vacunar animales adultos, estos quedan serológicamente positivos por largos periodos de tiempo, haciendo imposible diferenciar la respuesta vacunal de la producida por una infección de campo¹⁷⁻¹⁹. Por el contrario, en este caso mediante el uso de la aplicación conjuntival, tras haber transcurrido un periodo de 180 días post vacunación, todas las hembras se negativizaron a las pruebas del FPA e I-ELISA.

En cuanto a las técnicas diagnósticas utilizadas en este estudio, se observaron diferencias de interés práctico, respecto a la detección y medición de la respuesta serológica a la vacuna.

Las 3 técnicas detectaron de manera temprana la presencia de anticuerpos generados por la vacuna. En el caso del BPA a los 15 días post vacunación todos los animales resultaron positivos, mientras que en el caso de FPA y el I-ELISA, ello ocurrió a los 22 días post vacunación, lo cual reafirma la validez del BPA como prueba tamiz en las estrategias de diagnóstico y control de la enfermedad vigentes en el país²¹.

Esta información es de suma utilidad para determinar el uso más apropiado de estas técnicas para medir por ejemplo la cobertura vacunal lograda en una campaña. Tomando los datos de este estudio, se debería recomendar un sangrado entre los 30 y 40 días post vacunación (cuando se produce el pico de anticuerpos) de un porcentaje de los animales vacunados y realizarse la prueba del BPA. De obtenerse entre un 90% o más de los animales con reacción positiva, se podría concluir que la vacunación fue bien realizada y que hubo una buena respuesta inmune adecuada por parte de los animales.

Por otro lado, es de importancia el tiempo que demandó que las pruebas serológicas se negativizaran, esto es, que se dejaran de detectar los anticuerpos generados por la vacuna. Con la prueba del BPA, solo 4 de las 5 cabras se habían negativizado al finalizar el estudio a los 360 días, mientras que con el test de I-ELISA y FPA, la totalidad de las cabras se negativizaron al día 180 post vacunación. Este dato es de gran importancia, ya que, ante un programa de vacunación de tipo masivo, donde año por medio se vacunan a todas las hembras adultas y a la reposición como se está realizando desde hace 10 años en la provincia de Mendoza (Resolución 899/2009 del SENASA), permitiría llevar adelante una actividad de monitoreo utilizando las pruebas de I-ELISA o FPA, mediante la realización de muestreos periódicos entre los 6 y los 12 meses posteriores a la aplicación de la vacuna, y así poder determinar si la prevalencia de la enfermedad disminuye a medida que se avanza con el programa de control.

Con el test de I-ELISA, los valores de anticuerpos de los animales control (G3) se mantuvieron en valores promedio muy bajos (Figura 2) lejos del punto de corte de positividad

fijado en 30%, lo que da un buen margen de seguridad para la clasificación correcta de positivos y negativos. En el caso del FPA los valores de anticuerpos de G3 se mantuvieron muy cerca del valor de corte estipulado por el SENASA (Figura 1), lo que implica un mayor riesgo de tener resultados falsos positivos por la vacunación usando el FPA que con el test de I-ELISA. Esto quizá amerite realizar ajustes en la dilución de los sueros y/o del conjugado en la técnica de FPA para su uso en caprinos y recalculando el punto de corte, a fin de lograr una mejor separación entre los valores de los animales vacunados y sin vacunar y eventualmente, entre estos y animales infectados en condiciones de campo que aquí no se evaluaron.

A diferencia de lo que ocurrió con las hembras, los machos vacunados nunca se negativizaron al BPA, I-ELISA y FPA al término de los 360 días que duró el ensayo. No tenemos una explicación a este fenómeno y no hemos encontrado bibliografía respaldatoria de este hallazgo. Este fenómeno debería ser evaluado cuidadosamente a futuro, incluyendo quizá estudios bacteriológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos en tejidos en un número mayor de animales, para determinar si eventualmente la vacuna coloniza los órganos reproductivos de los machos y es por ello la reacción serológica persistente. Asimismo, se debería determinar si afecta la calidad del semen y si la cepa vacunal se excreta por esta vía. Esta información refuerza la recomendación de que no deben vacunarse machos adultos, indistintamente de cuál sea su uso o destino, tal como se expresa en la Resolución 372-E/2017 del SENASA.

CONCLUSIONES

Si bien el presente estudio se realizó con un número reducido de animales debido a cuestiones de disponibilidad

de animales y de costos, los resultados obtenidos son los primeros reportados en el país, e indican que la vacuna *Brucella melitensis* REV 1 aplicada de manera conjuntiva en caprinos criollos adultos de nuestro país genera una buena respuesta inmune.

También se ha determinado preliminarmente el comportamiento y utilidad que tendrían cada uno de los test serológicos evaluados para detectar la respuesta vacunal, con el fin de monitorear la efectividad de las campañas de vacunación a los 30-40 días post vacunación, y por otro lado, evaluar la dinámica de la prevalencia de la enfermedad, a través de muestreos serológicos posteriores a los 180 días de aplicada la vacuna.

Este trabajo aporta información objetiva que podría ser utilizada para mejorar o reforzar las actividades de control que se llevan a cabo en el país dentro del Plan Nacional de Control de la Brucelosis Caprina, según lo reglamentado por la Resolución 372-E/2017 del SENASA.

Agradecimientos

Al personal del Campo Experimental (CAP) del INTA en Pilcaniyeu, Prov. de Río Negro por el cuidado de los animales y la colaboración en todas las actividades de muestreo y a los Dres. Marcela Larroza y Agustín Martínez, por la revisión crítica del manuscrito.

Este estudio fue financiado por el Proyecto de INTA PNSA 1115052 y por el SIRSA (Sistema Integrado Regional de Sanidad Animal) del INTA Bariloche

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Radostitis OM, Blood DC, Gay CC. Veterinary Medicine. 9th Edition. Philadelphia, USA: WB Saunders; 2000.
- Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. FAO, OIE & WHO. ISBN 9241547138; 2006, 86 pág.
- European Commission. Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*). Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Adopted 12 July 2001 (SANCO.C.2/AH/R23/2001).
- Alton G. *Brucella melitensis*. En: Animal Brucellosis. Boca Ratón, USA: Ed. Nielsen & Duncan; 1990:384-402.
- Megid J, Mathias L, Robles C. Clinical manifestations of Brucellosis in domestic animals and humans. Open Vet Sci J. 2010;4:119-126.
- Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2^{da} ed. Publicación científica N° 503, Ed. Organización Panamericana de la Salud, Washington, USA. 1986, 989.
- Wallach JC, Samartino LE, Efron A, Baldi PC. Human infection by *Brucella melitensis*: an outbreak attributed to contact with infected goats. FEMS Immunol & Med Microbiol 1998;19: 315-321.
- OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 1.2.4. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf, París, 2020.
- Crespo León F. Brucelosis ovina y caprina. Ed. Office International des Epizooties, París, Francia, 1994, 451 pág.
- Rossetti C, Arenas-Gamboa A, Maurizio E. Caprine brucellosis: a historically neglected disease with significant impact on public health. PloS Negl Trop Dis 2017;11(8):1-17.
- Robles C, Gaído A, Spath E, Torioni de Echaide S, Vanzini V, Zielinski G, y col. Brucellosis caprina en la Argentina. Ed. INTA. 2014; 29 pág. ISBN 978-987-521-557-3. DOI: 10.13140/RG.2.1.2561.4324.
- Russo AM, Mancebo OA, Monzón CM, Gait JJ, Casco RD, Torioni de Echaide SM. Epidemiología de la brucelosis caprina y ovina en la provincia de Formosa. Rev Arg Microbiol 2016, Abr-Jun;48(2):147-153.
- Trezeguet MA, Muñoz GA, Rodríguez R, Nicola A, Marcos A, Elena S, y col. *Brucella melitensis* en caprinos en Santiago del Estero, República Argentina. Vet Arg 2017; XXXIV (345):1-8.
- Alton G, Jones L, Angus R, Verger J. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: INRA; 1988, 190 pág.
- Alvarez L, Marcellino R, Martínez A, Robles C. Duplex PCR for the diagnosis of *Brucella melitensis* and its differentiation from the REV 1 vaccine strain. Small Rum Res 2017;146:1-4.
- Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Robles C, y col. Towards single screening test for Brucellosis. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2005;24(3):1027-1038.
- Blasco JM, Molina-Florez B. Control and Eradication of *Brucella melitensis* Infection in Sheep and Goats. Vet Clin Food Anim 2011;27:95-104.
- Blasco JM. A review of the use of *Brucella melitensis* REV 1 vaccine in adult sheep and goat. Prev Vet Med 1997;31:275-283.
- Goodwin ZI, Pascual DW. Brucellosis vaccines for livestock.

- Vet Immunol & Immunopath 2016;181:51-58.
20. Alton G, Elberg S. Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. Vet Bull 1967;37:793-799.
 21. SENASA. Manual del diagnóstico serológico de la Brucelosis Animal. Versión 3.0/2009, 95 pág.
 22. Segovia CN, Uzal FA, Robles CA. Evaluación de un enzimo-inmunoensayo indirecto para la detección de anticuerpos contra *Brucella melitensis* en suero de caprinos. Therios 2000;29:177-182.



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>