

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TITULO DEL TRABAJO

RESPUESTA INMUNE Y CAPACIDAD PROTECTORA DE UNA CEPA MUTANTE DE  
*BRUCELLA ABORTUS* S19 EN BOVINOS

AUTOR: FIORENTINO, María Andrea

DIRECTOR: PAOLICCHI, Fernando Alberto

CO-DIRECTOR: DI LORENZO, Cecilia

LUGAR DE TRABAJO: DPTO PRODUCCION ANIMAL, EEA INTA BALCARCE

MIEMBROS DEL JURADO:

JORGE, María Cristina

CERONE, Silvia

TORIONI DE ECHAIDE, Susana

AÑO: 2010

**PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS**

Fiorentino MA, Campos E, Cravero S, Arese A, Paolicchi F, Campero C, Rossetti O.  
Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-*luc*  
and INTA 2. Vet Microbiol 2008; 132: 302-311.

## INDICE DE CONTENIDOS

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS .....	I
INDICE DE CONTENIDOS.....	II
INDICE DE TABLAS .....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	X
RESÚMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. OBJETIVOS.....	9
3. HIPOTESIS .....	11
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1. Historia .....	12
4.2. El Género <i>Brucella</i> .....	12
4.2.1. Propiedades y clasificación.....	12
4.2.2. Estructura Bacteriana.....	14
4.2.2.1. Envoltura celular.....	14
4.2.2.2. Proteínas de membrana externa.....	16
4.2.2.3. Proteínas citoplasmáticas .....	17
4.2.3. Virulencia.....	18
4.2.3.1. Factores de virulencia .....	18
4.2.2.2. Invasión y vida intracelular.....	19
4.3. Respuesta inmune .....	21
4.3.1. Inmunidad innata.....	21
4.3.1.1. Complemento .....	21
4.3.1.2. Células NK.....	22
4.3.1.3. Células presentadoras de antígenos y neutrófilos.....	22
4.3.2. Inmunidad adaptativa .....	23
4.3.2.1. Respuesta inmune humoral .....	23

4.3.1.2. Respuesta inmune celular.....	24
4.4. La enfermedad en los bovinos .....	25
4.5. La enfermedad en el hombre .....	27
4.6. Vacunas .....	28
4.6.1. Vivas atenuadas.....	29
4.6.1.1. <i>Brucella abortus</i> S19 .....	29
4.6.1.2. <i>Brucella abortus</i> RB51 .....	30
4.6.2. Vacunas de nueva generación .....	31
4.6.2.1. Vivas genéticamente atenuadas.....	31
4.6.2.2. Vacunas a ADN .....	33
5. <b>ENSAYO 1: Respuesta inmune y capacidad protectora de la cepa mutante de <i>Brucella abortus</i> S19 en hembras bovinas desafiadas con <i>B. abortus</i> 2308</b> .....	34
5.1. Introducción.....	35
5.2. Materiales y métodos .....	36
5.2.1. Primera Etapa.....	36
5.2.1.1. Animales.....	36
5.2.1.2. Vacunación.....	36
5.2.1.3. Preparación de las cepas vacunales.....	37
5.2.1.4. Hemocultivos .....	37
5.2.1.5. Serología.....	37
5.2.1.4. Servicio.....	39
5.2.2. Segunda Etapa.....	40
5.2.2.1. Desafío .....	40
5.2.2.2. Serología y hemocultivos .....	40
5.2.2.3. Pérdidas reproductivas .....	41
5.2.2.4. Cultivo Bacteriológico .....	41
5.2.2.5. Histopatología e inmunohistoquímica .....	42
5.2.3. Tercera Etapa .....	42
5.2.4. Análisis Estadístico .....	43
5.2.4.1. Resultados de las pruebas serológicas .....	43
5.2.4.2. Resultados de los hemocultivos.....	43
5.2.4.3. Evaluación de los abortus.....	43
5.2.4.4. Análisis de Riesgo Relativo.....	43

5.3. Resultados.....	44
5.3.1. Primera Etapa.....	44
5.3.1.1. Serología.....	44
5.3.1.2. Hemocultivos.....	49
5.3.1.3. Servicio.....	49
5.3.2. Segunda Etapa.....	49
5.3.2.1. Desafío.....	49
5.3.2.2. Serología.....	49
5.3.2.3. Hemocultivos.....	50
5.3.2.4. Pérdidas Reproductivas.....	50
5.3.2.5. Cultivo bacteriológico.....	53
5.3.2.6. Histopatología e inmunohistoquímica.....	53
5.3.2.7. Análisis de Riesgo Relativo.....	61
5.3.3. Tercera Etapa.....	62
5.4. Discusión.....	63
6. <b>ENSAYO 2:</b> Respuesta inmune y capacidad protectora de una cepa mutante de <i>Brucella abortus</i> S19 en toros adultos desafiados con <i>B. abortus</i> 2308.....	69
6.1. Introducción.....	70
6.2. Materiales y métodos.....	72
6.2.1. Selección de los animales.....	72
6.2.2. Vacunación.....	72
6.2.3. Serología.....	72
6.2.4. Muestras de semen.....	72
6.2.5. Inspección clínica.....	73
6.2.6. Desafío.....	73
6.2.7. Serología, bacteriología y evaluación andrológica.....	73
6.2.8. Sacrificio.....	73
6.2.9. Análisis estadístico de los datos.....	74
6.2.9.1. Resultados de las pruebas serológicas.....	74
6.2.9.2. Análisis de lesiones.....	74
6.3. Resultados.....	75
6.3.1. Posvacunación.....	75
6.3.2. Posdesafío.....	76

6.3.2.1. Serología.....	76
6.3.2.2. Evaluación andrológica .....	78
6.3.2.3. Aislamientos bacterianos.....	78
6.3.2.4. Histopatología.....	79
6.4. Discusión.....	87
7. <b>ENSAYO 3:</b> Evaluación serológica de la revacunación con una cepa mutante de <i>Brucella abortus</i> en vaquillonas y en vacas adultas previamente vacunadas cuando terneras con <i>Brucella abortus</i> S19 .....	90
7.1. Introducción.....	91
7.2. Materiales y métodos .....	92
7.2.1. Ensayo 1: Evaluación serológica de la revacunación de vaquillonas preservicio	92
7.2.1.1. Selección de animales .....	92
7.2.1.2. Primovacunación.....	92
7.2.1.3. Revacunación.....	92
7.2.1.4. Preparación de las cepas vacunales.....	93
7.2.1.5. Serología.....	93
7.2.2. Ensayo 2: Evaluación serológica de la revacunación de vacas adultas .....	93
7.2.2.1. Selección de animales .....	93
7.2.2.2. Revacunación.....	93
7.2.2.3. Serología.....	94
7.2.3. Análisis estadístico de los datos.....	94
7.2.3.1. Resultados de las pruebas serológicas.....	94
7.3. Resultados.....	95
7.3.1. Ensayo 1: Evaluación serológica de la revacunación de vaquillonas preservicio	95
7.3.2. Ensayo 2: Evaluación serológica de la revacunación de vacas adultas .....	101
7.4. Discusión.....	109
8. DISCUSIÓN GENERAL.....	114
9. REFERENCIAS .....	122

## ÍNDICE DE TABLAS

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

*Tabla 1:* Principales características biológicas de especies y biovares del Genero *Brucella* .. 15

**ENSAYO 1:** Respuesta inmune y capacidad protectora de la cepa mutante de *Brucella abortus* S19 en hembras bovinas desafiadas con *B. abortus* 2308.

*Tabla 1:* Dosis finales en UFC utilizadas para la vacunación de terneras..... 46

*Tabla 2:* Abortos o pérdidas neonatales y porcentaje de terneros logrados de vaquillonas de los grupos vacunados y control sin vacunar luego del desafío con *B. abortus* 2308..... 55

*Tabla 3:* Comparación entre la serología previa al calostro (prueba de FC) y los aislamientos en los terneros nacidos vivos y sus madres..... 56

*Tabla 4:* Frecuencia de aislamiento de *B. abortus* (muestras de calostro/leche, mucus cervico vaginal y placenta) e inmunohistoquímica de placenta de las vaquillonas luego del desafío con *B. abortus* 2308 ..... 57

*Tabla 5:* Frecuencia de cultivos positivos, inmunohistoquímica positiva y lesiones histopatológicas en fetos y terneros no viables ..... 57

*Tabla 6:* Fracción atribuible en el grupo expuesto (Grupo 3 no vacunado) y riesgo relativo de aborto e infección en las vaquillonas del grupo no vacunado vs. los grupos vacunados 1 y 2..... 61

**ENSAYO 2:** Respuesta inmune y capacidad protectora de una cepa mutante de *Brucella abortus* S19 en toros adultos desafiados con *B. abortus* 2308

*Tabla 1:* Dosis finales en UFC utilizadas para la vacunación de los toros..... 76

*Tabla 2:* Respuesta serológica antiBP26 en toros podesafío ..... 82

*Tabla 3:* Lesiones histopatológicas halladas en órganos genitales luego del desafío con *B. abortus* 2308, en toros vacunados con M-1*luc* (1 y 2 dosis), RB51 y controles sin vacunar . 83

**ENSAYO 3:** Evaluación serológica de la revacunación con una cepa mutante de *Brucella abortus* en vaquillonas y en vacas adultas previamente vacunadas cuando terneras con *Brucella abortus* S19.

*Tabla 1:* Dosis finales en UFC utilizadas para la revacunación vaquillonas..... 95

*Tabla 2:* Dosis finales en UFC utilizadas para la revacunación vacas ..... 102

## ÍNDICE DE FIGURAS

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

*Figura 1:* Esquema de la estructura del LPS de *Brucella spp.*..... 15

#### **ENSAYO 1:** Respuesta inmune y capacidad protectora de la cepa mutante de *Brucella abortus* S19 en hembras bovinas desafiadas con *B. abortus* 2308.

*Figura 1:* Proporción de muestras de suero positivas a las pruebas de BPA, SAT/2ME y FC en terneras vacunadas con M1-*luc* (Grupo 1) ..... 47

*Figura 2:* Proporción de muestras de suero positivas a las pruebas de BPA, SAT/2ME y FC en terneras vacunadas con S19 (Grupo 2)..... 47

*Figura 3:* Respuesta serológica posvacunación en vaquillonas de los grupos 1, 2 y 3 a la prueba de SAT (media y desvío estándar). ..... 48

*Figura 4:* Respuesta serológica posvacunación en vaquillonas de los grupos 1, 2 y 3 a la prueba de 2-ME (media y desvío estándar)..... 48

*Figura 5:* Porcentaje de seroreactores positivos a las pruebas de SAT, 2-ME y FC en las vaquillonas luego del desafío con *Brucella abortus* 2308 ..... 51

*Figura 6:* Análisis de la curva ROC del ELISAI antiBP26 realizado con los sueros obtenidos a los 4 meses posdesafío ..... 51

*Figura 7:* Frecuencia de muestras positivas y negativas al ELISAI antiBP26 en los sueros tomados a los 4 meses posdesafío ..... 52

*Figura 8:* Histopatología e inmunohistoquímica en cortes de pulmones de fetos/terneros no viables y de placentas con aislamiento de *B. abortus* ..... 58

*Figura 9:* Lesiones histopatológicas halladas en fetos/terneros no viables con aislamiento de *B. abortus*. ..... 60

#### **ENSAYO 2:** Respuesta inmune y capacidad protectora de una cepa mutante de *Brucella abortus* S19 en toros adultos desafiados con *B. abortus* 2308

*Figura 1:* Respuesta serológica postvacunación y posdesafío en toros de los grupos 1, 1b, 2, 3 y 3b a la prueba de Seroaglutinación Lenta en Tubo..... 80

*Figura 2:* Respuesta serológica postvacunación y posdesafío en toros de los grupos 1, 1b, 2, 3 y 3b a la prueba de 2 Mercaptoetanol. .... 81

*Figura 3:* Lesiones histológicas de los órganos del tracto reproductor de los toros.. ..... 85

**ENSAYO 3:** Evaluación serológica de la revacunación con una cepa mutante de *Brucella abortus* en vaquillonas y en vacas adultas previamente vacunadas cuando terneras con *Brucella abortus* S19.

*Figura 1:* Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en vaquillonas de los grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de Seroaglutinación Lenta en Tubo (media )...... 98

*Figura 2:* Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en vaquillonas de los grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de 2-Mercaptoetanol (media ). ..... 99

*Figura 3:* Porcentaje de seroreactores positivos a las pruebas de BPA, SAT/2-ME, FPA y FC en vaquillonas vacunadas con *B. abortus* S19 y revacunadas con S19 o M1-*luc* por diferentes vías. A- Grupo 1a; B- Grupo 1b; C- Grupo 2a y D- Grupo 2b. .... 99

*Figura 4:* Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en las vaquillonas de los grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de ELISAI Bp26 en los diferentes grupos (media). .... 101

*Figura 5:* Respuesta serológica postrevacunación dosis reducida en vacas de los grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de Seroaglutinación Lenta en Tubo (media). ..... 105

*Figura 6:* Respuesta serológica postrevacunación dosis reducida en vacas de los grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de 2-Mercaptoetanol (media)..... 105

*Figura 7:* Porcentaje de seroreactores positivos a las pruebas de BPA, SAT/2-ME, FPA y FC en vacas vacunadas con *B. abortus* S19 y revacunadas con S19 o M1-*luc* por diferentes vías. A- Grupo 1a; B- Grupo 1b; C- Grupo 2a y D- Grupo 2b..... 106

*Figura 8:* Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en las vacas de los grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de ELISAI Bp26 en los diferentes grupos (media)..... 108

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

<b>AC</b>	Anticuerpos
<b>ASC</b>	Agar sangre Columbia
<b>ASK</b>	Agar Skirrow
<b>AT</b>	Agar triptosa
<b><i>B. abortus</i></b>	<i>Brucella abortus</i>
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígenos
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DR</b>	Dosis reducida
<b>ELISA</b>	“enzyme linked immunosorbent assay”
<b>hs</b>	Horas
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IMC</b>	Inmunidad mediada por células
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
<b>kDa</b>	Kilo Daltons
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LPS-R</b>	Lipopolisacárido rugoso
<b>LPS-S</b>	Lipopolisacárido liso
<b>min.</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Mm</b>	Micrómetro
<b>NK</b>	Células natural killer

<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD</b>	Post-desafío
<b>PRV</b>	Post-revacunación
<b>PV</b>	Post-vacunación
<b>RER</b>	Retículo endoplásmico rugoso
<b>SC</b>	Subcutánea
<b>SENASA</b>	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>T°</b>	Temperatura
<b>°C</b>	Grados Celcius
<b>μL</b>	Microlitros

1     **RESPUESTA INMUNE Y CAPACIDAD PROTECTORA DE UNA CEPA MUTANTE**  
2                                    **DE *BRUCELLA ABORTUS* S19 EN BOVINOS**

3

4     **PALABRAS CLAVES:** *Brucella abortus*, vacuna, bovino, M1-*luc*

5

6     **RESUMEN**

7             *Brucella abortus* es el agente etiológico de la brucelosis bovina, enfermedad zoonótica  
8 que ocasiona graves pérdidas económicas. En Argentina, uno de los pilares del Plan Nacional  
9 de Control y Erradicación de esta enfermedad es la vacunación de las terneras con la cepa *B.*  
10 *abortus* S19, ésta otorga un alto nivel de protección pero presenta limitaciones: 1) los  
11 animales infectados naturalmente no son fácilmente diferenciables de los vacunados; 2) no  
12 puede ser utilizada en toros y; 3) es patógena para el hombre. *Brucella abortus* M1-*luc* es una  
13 cepa mutante derivada de la cepa S19 en la cual la secuencia *bp26* fue reemplazada por el gen  
14 codifica para luciferasa. La BP26 es una proteína reconocida por suero de bovinos, cabras,  
15 ovejas y humanos infectados. En ensayos ratones BALB/c, M1-*luc* se comportó de manera  
16 similar a S19 en cuanto a persistencia, producción de esplenomegalia y protección. Con el  
17 objetivo de evaluar la M1-*luc* en su huésped natural fueron diseñados tres ensayos: 1) se  
18 investigó respuesta inmune y su capacidad protectora en hembras bovinas desafiadas con *B.*  
19 *abortus* 2308, 2) se evaluó la respuesta inmune y capacidad protectora de la M1-*luc* en toros  
20 adultos desafiados con *B. abortus* 2308, y 3) se determinó la respuesta serológica de post-  
21 revacunación con una dosis reducida de M1-*luc* (aplicada por dos vías diferentes) en  
22 vaquillonas y en vacas adultas previamente vacunadas cuando terneras con *B. abortus* S19.  
23 Los resultados obtenidos demuestran que la cepa M1-*luc* se comporta de manera similar que  
24 la S19 en cuanto a la respuesta inmune anti-LPS post-vacunación y post-revacunación en

25 hembras de diferentes categorías. Los machos adultos vacunados con M1-*luc* no la eliminaron  
26 a través de semen ni desarrollaron alteraciones a la inspección andrológica. El nivel de  
27 protección en vacas fue similar al de S19, sugiriendo que BP26 no es esencial para la  
28 inducción de una respuesta inmune protectora. La prueba de ELISAi BP26, presentó bajos  
29 niveles de sensibilidad y especificidad. Futuros trabajos deberían orientarse a mejorar el  
30 desempeño de una prueba diagnóstica que nos permita diferenciar entre animales vacunados e  
31 infectados. Finalmente, destacamos que en este trabajo se evaluó por primera vez el  
32 rendimiento de la vacuna *B. abortus* M1-*luc* en su huésped natural.

33

34

35

36 **IMMUNE RESPONSE AND PROTECTIVE CAPACITY OF A MUTANT STRAIN OF**  
37 ***BRUCELLA ABORTUS* S19 IN CATTLE**

38

39 **KEY WORDS:** *Brucella abortus*, vaccine, bovine, M1-*luc*

40

41 **ABSTRACT**

42 *Brucella abortus* is the ethiological agent of bovine brucellosis, a zoonotic disease that  
43 causes serious economic losses. In Argentina, one of bases of the National Plan for Control  
44 and Eradication of Bovine Brucellosis is the vaccination of calves with a vaccine strain *B.*  
45 *abortus* S19, although this vaccine gives a high level of protection it has the following  
46 limitations: 1) naturally infected animals are not easily distinguishable from vaccinated ones,  
47 2) this vaccine cannot be used in bulls, and 3) it is pathogenic for humans. *Brucella abortus*  
48 M1-*luc* is a mutant strain derived from the S19. In M1-*luc* strain the BP26 sequence was  
49 replaced by the gene encoding luciferase. The BP26 is a protein recognized by sera of  
50 infected cattle, goats, sheep and humans. In previous trials, using BALB/c mice, M1-*luc*  
51 behaved similarly to S19 in terms of persistence, production of splenomegaly and protection  
52 from challenge with a pathogenic strain. In order to evaluate the mutant strain M1-*luc* in its  
53 natural host, three trials were designed. In trial 1, the immune response and protective  
54 capacity was tested in bovine females that were challenged with *B. abortus* 2308. In trial 2,  
55 the immune response and protective capacity of the M1-*luc* were studied in adult bulls  
56 challenged with *B. abortus* 2308. Finally, in the trial 3, the serological post-revaccination  
57 response was measured with a reduced dose of M1-*luc* (applied in two different ways) in  
58 heifers and mature cows, previously vaccinated as calves with *B. abortus* S19. The results  
59 showed that the strain M1-*luc* presents an anti-LPS post-vaccination and post-revaccination

60 immune response similar to strain S19 in different categories of females. Furthermore, when  
61 adult males were vaccinated, the strain M1-*luc* was not found in semen and no andrological  
62 changes were developed. The level of protection afforded in cows was also similar to that of  
63 strain S19, suggesting that the protein BP26 is not necessary for the induction of a protective  
64 immune response. ELISAI BP26 test presented low levels of sensitivity and specificity.  
65 Future works should be aimed at improving the performance of a diagnostic test that might  
66 allow to differentiate between vaccinated and infected animals. This is the first research in  
67 which *B. abortus* M1-*luc* performance is evaluated in its natural host.

68

69

## 70 1. INTRODUCCIÓN

71

72 En nuestro país el sector agropecuario cumple un rol protagónico, las exportaciones  
73 provenientes del mismo tienen una importante influencia en el intercambio comercial y dan  
74 lugar al desarrollo de una intensa actividad industrial, que procesa y elabora productos y  
75 subproductos. Durante el año 2008 en Argentina se produjeron 3,1 millones de toneladas de  
76 carne (en res con hueso) y 10.030 millones de litros de leche. En materia de comercio exterior  
77 se exportaron 381,9 mil toneladas de carne (en peso producto) por un valor de US\$ 1667,7  
78 millones y 296 toneladas de leche por un monto total de US\$ 1138 (1).

79 La brucelosis bovina provoca grandes pérdidas económicas en todo el mundo, se  
80 estima que en nuestro país se pierden alrededor de US\$ 60.000.000 anualmente por causa de  
81 esta enfermedad (2). Relevamientos serológicos en la provincia de Buenos Aires indicaron  
82 una prevalencia del 5,6% en el año 1999 (3).

83 *Brucella abortus* es el agente causal de la brucelosis bovina y es la causa más  
84 frecuentemente diagnosticada de abortos en rodeos de carne en la provincia de Buenos Aires.  
85 Sobre 214 fetos estudiados durante el periodo 1983-1993 *B. abortus* fue la principal causa de  
86 abortos, de 45 fetos procesados se aisló *B. abortus* de 14 (4). En un trabajo posterior *B.*  
87 *abortus* también fue la principal causa infecciosa, aislándose de 6 de 40 fetos procesados (5).  
88 Posteriormente, Campero *et. al.* (6) sobre 354 fetos de rodeos de carne y leche, arribados al  
89 Grupo de Sanidad Animal entre los años 1994 y 2000 desde varias provincias Argentinas,  
90 indican a *B. abortus* como el agente etiológico más frecuente.

91 En las vacas no preñadas pueden producirse infecciones auto limitantes o pueden  
92 convertirse en portadoras latentes. La glándula mamaria y los ganglios linfáticos  
93 supramamarios pueden infectarse en forma permanente, con excreción constante o

94 intermitente de bacterias en la leche. Estas alteraciones de la glándula mamaria reducen la  
95 producción en un 10% aproximadamente (7). Alrededor del 5% de las hijas de vacas  
96 infectadas permanecen como portadoras latentes hasta el primer parto o aborto (7).

97         En los machos se han observado manifestaciones en los órganos genitales hasta en un  
98 60% de los casos, ocasionando vesiculitis seminal, ampulitis, orquitis y/o epididimitis (8, 9).  
99 Con menor frecuencia se observan higromas, bursitis y artritis (10, 11). Muchas veces el  
100 diagnóstico de brucelosis en los toros es problemático por la presencia de toros seronegativos  
101 portadores de infección (12).

102         En el hombre la infección con *B. abortus* puede producir: debilidad, cefaleas, dolores  
103 musculares o articulares, fiebre, sudores, escalofríos y llevar a la muerte como consecuencia  
104 de toxemia, trombocitopenia, endocarditis u otras complicaciones (7). A pesar de que en  
105 muchos países la brucelosis es una enfermedad de denuncia obligatoria, la incidencia real de  
106 la enfermedad en humanos es desconocida y varía ampliamente, entre  $< 0.03$  y  $>160$  por cada  
107 100.000 habitantes (13).

108         Como en el resto de las bacterias Gram negativas, el lipopolisacárido (LPS) de  
109 *Brucella* está formado por una región proximal hidrofóbica compuesta por el lípido A, unido  
110 a un núcleo o *core*, asociado (LPS liso) o no (LPS rugoso) a una cadena polisacárida externa  
111 “O” hidrofílica. El LPS de *B. abortus* posee características estructurales que lo diferencian de  
112 los LPS “clásicos” de las enterobacterias como *Escherichia coli*, esta estructura “no clásica”  
113 le confiere propiedades de factor de virulencia (14, 15). Si bien se reconoce al LPS  
114 (básicamente su Cadena “O”) como el antígeno dominante (16), poco se sabe acerca de la  
115 importancia de las diferentes proteínas de *B. abortus* en la respuesta inmune y la capacidad  
116 protectora de ellas (17, 18).

117 La vacuna elaborada con la cepa 19 (S19) es usada en la mayor parte del mundo, en  
118 Argentina la implementación de la Resolución 73/1982 del entonces Servicio Nacional de  
119 Sanidad Animal legalizó la obligatoriedad de la vacunación con *B. abortus* S19 en el año  
120 1982 (19). Esta vacuna confiere un 70% de protección contra el aborto y un 55% contra la  
121 infección (20, 21, 22, 23), a pesar de lo cual su utilidad es limitada fundamentalmente porque:  
122 1) los animales infectados naturalmente no son fácilmente diferenciables de los vacunados  
123 (24, 25, 26) razón por la cual la edad de vacunación en terneras ha sido restringida a los 3 a 8  
124 meses de edad; 2) produce infecciones en algunos bovinos (27, 28, 29, 30), la vacunación de  
125 los toros con S19 produce un cuadro clínico similar al provocado por la infección natural por lo  
126 cual no es utilizada en esta categoría (31, 32, 33) y; 3) es patógena para el hombre (34).  
127 Mediante la revacunación con dosis reducidas (DR) de S19, utilizando diferentes  
128 concentraciones y vías de aplicación, se ha logrado elevar la resistencia a la infección de  
129 hembras (35, 36). Sin embargo, la persistencia de títulos en las pruebas serológicas  
130 convencionales es el principal inconveniente para su uso (37, 38, 39).

131 Varias vacunas han tratado de superar las desventajas de *B. abortus* S19 manteniendo  
132 el mismo nivel de protección. Rossetti *et al.* (40), a partir de una biblioteca de ADN genómico  
133 de *B. abortus* S19 en  $\lambda$ gt11, seleccionaron un gen que codifica una proteína de 26 kDa (BP26)  
134 capaz de expresarse a partir de su promotor original de *B. abortus* en *E. coli*. La proteína  
135 BP26 está conservada en las diferentes cepas de *B. abortus*. Esta proteína, de función  
136 desconocida, es reconocida por sueros de bovinos infectados y, en menor grado, por sueros de  
137 bovinos vacunados con S19 (40). Se obtuvieron mutantes de la cepa S19 (M1-*luc*) incapaces  
138 de expresar la BP26 que poseen como marcador genético una luciferasa eucariota. Dichas  
139 mutantes se comportan igual que la cepa S19 en cuanto a tiempo de crecimiento en medios de  
140 cultivos, morfología y a la virulencia y persistencia en bazo de ratones (17, 41). Hasta la

141 fecha no se han realizado aún ensayos en bovinos. La ausencia de anticuerpos contra BP26 en  
142 los sueros de animales vacunados con la cepa mutante permitiría discriminarlos de los  
143 animales infectados con cepas silvestres, que poseen anticuerpos contra esta proteína.

144 El presente trabajo permitió conocer la respuesta inmune y la capacidad protectora de  
145 la cepa mutante M1-*luc* de *B. abortus* S19 en hembras bovinas vacunadas de terneras y en  
146 toros adultos. Además, en una tercera etapa, evaluar su utilidad como refuerzo en hembras  
147 bovinas de diferentes categorías vacunadas previamente con *B. abortus* S19.

148

149 **2. OBJETIVOS**

150

151 **2.1. OBJETIVOS GENERALES**

- 152 1. Determinar la capacidad protectora de la cepa M1-*luc* en relación a la cepa S19 en  
153 hembras bovinas vacunadas cuando terneras y desafiadas durante la preñez con una cepa  
154 de *B. abortus* con patogenicidad conocida.
- 155 2. Determinar la capacidad protectora y/o efectos nocivos en el área genital de la cepa M1-  
156 *luc* en toros desafiados con una cepa de *B. abortus* con patogenicidad conocida.
- 157 3. Evaluar la aplicación de la cepa M1-*luc* como refuerzo vacunal con dosis reducida en  
158 hembras bovinas vacunadas cuando terneras con cepa S19.

159

160 **2.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 161 1.a. Conocer la cinética de aparición y persistencia de los anticuerpos en hembras bovinas  
162 vacunadas con la cepa M1-*luc* en comparación con aquellos vacunados con la cepa S19.
- 163 1.b. Evaluar la capacidad de la cepa M1-*luc*, respecto de la cepa S19, de producir bacteriemia  
164 durante las primeras semanas posvacunación.
- 165 1.c. Evaluar la protección vacunal de la cepa M1-*luc* mediante estudios bacteriológicos,  
166 histopatológicos e inmunohistoquímicos en tejidos y fluidos de hembras bovinas desafiadas  
167 con *B. abortus* patógena y en fetos, natimortos y terneros viables de dichas hembras.
- 168 2. Estudiar los efectos de la vacunación y la protección de la cepa M1-*luc* en toros desafiados  
169 con una cepa patógena de *B. abortus* mediante estudios bacteriológicos, histopatológicos e  
170 inmunohistoquímicos en tejidos y fluidos genitales y la cinética y persistencia de anticuerpos  
171 en suero y plasma seminal.
- 172 3. En hembras bovinas vacunadas cuando terneras con cepa S19, estudiar la cinética de

173 anticuerpos pos-revacunación con dosis reducida de la cepa M1-*luc* administrada por las vías  
174 subcutánea o conjuntival a la edad del preservicio (15 - 18 meses) o en hembras adultas.  
175

176 **3. HIPÓTESIS**  
177

178           La vacunación de terneras entre 4 y 5 meses de edad con la cepa mutante de *B.*  
179 *abortus* M1-*luc* induce inmunidad protectora equivalente a la obtenida con la cepa S19.

180

181           En toros, la utilización de la vacuna M1-*luc* induce protección contra la infección.

182

183           En hembras primo-vacunados con cepa S19, la revacunación con dosis reducida de  
184 M1-*luc* induce una respuesta inmune humoral similar a la generada por revacunación con  
185 dosis reducida de S19 sin detectarse títulos antiBP26.

186

## 187 **4. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

188

### 189 **4.1. HISTORIA**

190 La brucelosis es producida por bacterias del género *Brucella*. Sir David Bruce 1887  
191 descubrió el origen bacteriano de la enfermedad denominada fiebre de Malta (posteriormente  
192 designada como fiebre Mediterránea o fiebre ondulante) al estudiar bazos de soldados  
193 británicos muertos como consecuencia de la enfermedad adquirida durante su estancia en la  
194 Isla de Malta. La bacteria aislada inicialmente denominada *Micrococcus melitensis* fue  
195 renombrada posteriormente como *Brucella melitensis* en su honor (42).

196 En cuanto a la enfermedad en los bovinos, si bien el llamado aborto epidémico del  
197 ganado vacuno era conocido con anterioridad, la bacteria causante no fue aislada hasta 1895,  
198 cuando el veterinario Bernhard Bang en Copenhague la obtuvo a partir de productos de  
199 abortos de ganado vacuno y la denominó *Bacillus abortus*. Fue Alice Evans en 1918 quien  
200 comprueba el íntimo parentesco entre el *Micrococcus melitensis* y el *Bacillus abortus*, estos  
201 resultados junto con los de Meyer y Shaw en 1920 permitieron agrupar a estos  
202 microorganismos en un solo género bacteriano denominado *Brucella* en honor a David Bruce  
203 (43, 44).

204 Desde entonces y a pesar de los innumerables avances en el conocimiento de la  
205 enfermedad, existen aspectos de la brucelosis que aún no han sido esclarecidos.

206

## 207 **4.2 EL GENERO BRUCELLA**

### 208 **4.2.1. PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN**

209 El género está formado por bacterias polimórficas Gram negativas que se presentan  
210 bajo la forma de cocos, cocobacilos o bacilos cortos, inmóviles y sin cápsula. Miden de 0.5 a

211 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 0.6 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo. Crecen bajo condiciones aerobias (aunque  
212 muchas cepas requieren suplementación con  $\text{CO}_2$  para su crecimiento) y a una temperatura  
213 óptima de 37 °C. Los valores de pH adecuados para su desarrollo se ubican entre 6.6 y 7.4.  
214 Por regla general son positivos a las pruebas de catalasa y de oxidasa (excepto *B. ovis* y *B.*  
215 *neotomae*).

216 Las bacterias del Genero *Brucella* por su capacidad de cultivarse *in vitro* y sobrevivir  
217 en el medio ambiente por periodos limitados, son consideradas patógenos intracelulares  
218 facultativos. El análisis del ácido nucleico de 16S del ribosoma (16S rRNA), la composición  
219 lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general ubican a *Brucella* dentro de la  
220 subdivisión  $\alpha$ -2 de la Clase *Proteobacteria* (45), en la que se encuentran también otros  
221 patógenos intracelulares de animales (*Riquetsias*), así como destacados patógenos y  
222 endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*), las propias mitocondrias y ciertas  
223 bacterias de la tierra. Por tanto, parece que la asociación intracelular con eucariotas es una  
224 tendencia evolutiva compartida con otros miembros de la subdivisión  $\alpha$  -2.

225 El género está integrado por seis especies clásicas de *Brucella* divididas en 15  
226 biovariedades: *Brucella abortus* (8 biovariedades), *Brucella melitensis* (3 biovariedades),  
227 *Brucella suis* (5 biovariedades), *Brucella canis*, *Brucella ovis* y *Brucella neotomae* (34). La  
228 clasificación de las diferentes especies está basada en las discrepancias en la preferencia de  
229 huésped y en la patogenicidad (Tabla 1). Sin embargo, estudios de hibridación ADN-ADN  
230 (46) y de secuenciación de los genes 16S rRNA (47) han demostrado una homología superior  
231 al 95% entre las diferentes especies de *Brucella*. Esta homología genética ha llevado a agrupar  
232 desde el punto de vista taxonómico a todas las especies de *Brucella* dentro de una única  
233 especie (*B. melitensis*) y a considerar a cada una de las especies como biovariedades (48). A

234 pesar de ello y por razones prácticas se mantiene la terminología antigua salvo cuando se trata  
235 de nominarlas con fines taxonómicos.

236 Recientemente se han incorporado 3 especies más al género *B. microti* (49) aislada en  
237 la República Checa de un roedor y *B. ceti* y *B. pennipedialis* (50, 51, 52), que han sido  
238 aisladas de mamíferos marinos (cetáceos y pinnípedos, respectivamente).

239

## 240 **4.2.2. ESTRUCTURA BACTERIANA**

### 241 **4.2.2.1. ENVOLTURA CELULAR**

242 Los microorganismos del género *Brucella* poseen una envoltura celular característica  
243 formada por: la membrana externa (ME), la membrana interna y un espacio periplásmico. En  
244 el periplasma se encuentran las proteínas y enzimas relacionadas con el transporte de solutos  
245 y un gel glicopeptídico denominado peptidoglicano (PG) o mureína, responsable de la forma e  
246 integridad osmótica de la bacteria. En el citoplasma podemos encontramos ADN, ARN y  
247 proteínas citosólicas.

248 La ME representa es el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador.  
249 Por este motivo, los componentes de la ME de *Brucella* han sido estudiados por varios autores  
250 por su utilidad para el diagnóstico e inmunoprofilaxis (53).

251 La membrana externa contiene, distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y  
252 un lipopolisacárido (LPS). La asimetría en la distribución del LPS, junto con sus propiedades  
253 y las de las proteínas que actúan como poros en la ME (porinas), hacen que ésta actúe como  
254 una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos. El LPS es  
255 vital tanto para integridad estructural como funcional de la membrana externa de las bacterias  
256 Gram negativas. Presente en todas las bacterias Gram negativas e inclusive con algunos  
257 dominios bien conservados, el LPS es uno de los objetivos primarios de la respuesta inmune

258 Tabla 1: Principales características biológicas de especies y biovars del Género *Brucella*.

Especie		Requerimiento CO2	Producción CO2	Crecimiento en presencia de Tionina Fucsina		Ag	Hospedador	Patogenicidad para el hombre
<i>B. abortus</i> Biovar	1	+	+	-	+	A	Ganado vacuno y otros bóvidos	Moderada
	2	+	+	-	-	A		
	3	+	+	+	+	A		
	4	+	+	-	+	M		
	5	-	-	+	+	M		
	6	-	+	+	+	A		
<i>B. melitensis</i> Biovar	9	-	+	+	+	M		
	1	-	-	+	+	A	Ganado ovino y caprino	Alta
	2	-	-	+	+	M		
3	-	-	+	+	AM			
<i>B. suis</i> Biovar	1	-	+	+	-	A	Porcinos	Alta
	2	-	-	-+		A	Porcinos	Baja
	3	-	-	+	+	A	Porcinos	Alta
	4	-	-	+	-	AM	Renos Caribúes	Moderada
	5	-	-	+	-	M	Roedores	Alta
<i>B. neotaomae</i>		-	+	-	-	A	Rata del desierto	Sin casos descriptos
<i>B. ovis</i>		+	-	+	-	R	Ovinos	Sin casos descriptos
<i>B. canis</i>		-	-	+	-	R	Perros	Baja

259

260 innata de los mamíferos. El LPS de *Brucella*, sin embargo, posee algunas características que  
261 lo alejan de los LPS clásicos como el de *Escherichia coli* (15). Su estructura puede ser  
262 dividida en tres regiones (Fig. 1): una región proximal hidrofóbica compuesta por el lípido A,  
263 unido a un núcleo o *core*, asociado (LPS liso) o no (LPS rugoso) a una cadena polisacárida  
264 externa "O" (cadena O) hidrofílica. La cadena O de las especies lisas de *Brucella* es  
265 polisacárido formado por un homopolímero no ramificado de unión  $\alpha$ 1,2 4-formamido-4,6-  
266 dideoxi-D-manosa (N-formil-perosamina) en las cepas con epítipo A dominante,  
267 característico de *B. abortus* (serotipo A), pero  $\alpha$ 1,3 cada 5 residuos en las cepas con epítipo  
268 M dominante, característico de *B. melitensis* (serotipo M). Todas las cepas lisas de *Brucella*

269 contienen ambos tipos de polisacáridos formando parte de su LPS, pero siempre existe uno  
270 preponderante que determina el serotipo al cual pertenecen (54). La cadena O está unida *core*  
271 que está compuesto por manosa, glucosa, quinovosamina, glucosamina, 2-ceto, 3-  
272 deoxioctulosonato (KDO) y otros azúcares no identificados.

273 El lípido A es químicamente diferente al de las Gram negativas clásicas y está  
274 formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con betahidroxiácidos y otros ácidos  
275 grasos de cadena larga. A esta composición diferente se debe el que algunas de las actividades  
276 características de los LPS relacionadas con la endotoxicidad, como la pirogenicidad, sean  
277 diferentes en *Brucella*, lo que podría tener significación en la patogénesis. Como antígeno, el  
278 lípido A no parece tener relevancia diagnóstica. Al lípido A se unen fuertemente fragmentos  
279 de proteínas de membrana externa las que no pueden ser removidas por los protocolos  
280 convencionales usados para separa proteínas de lípidos en las enterobacterias (55).

281

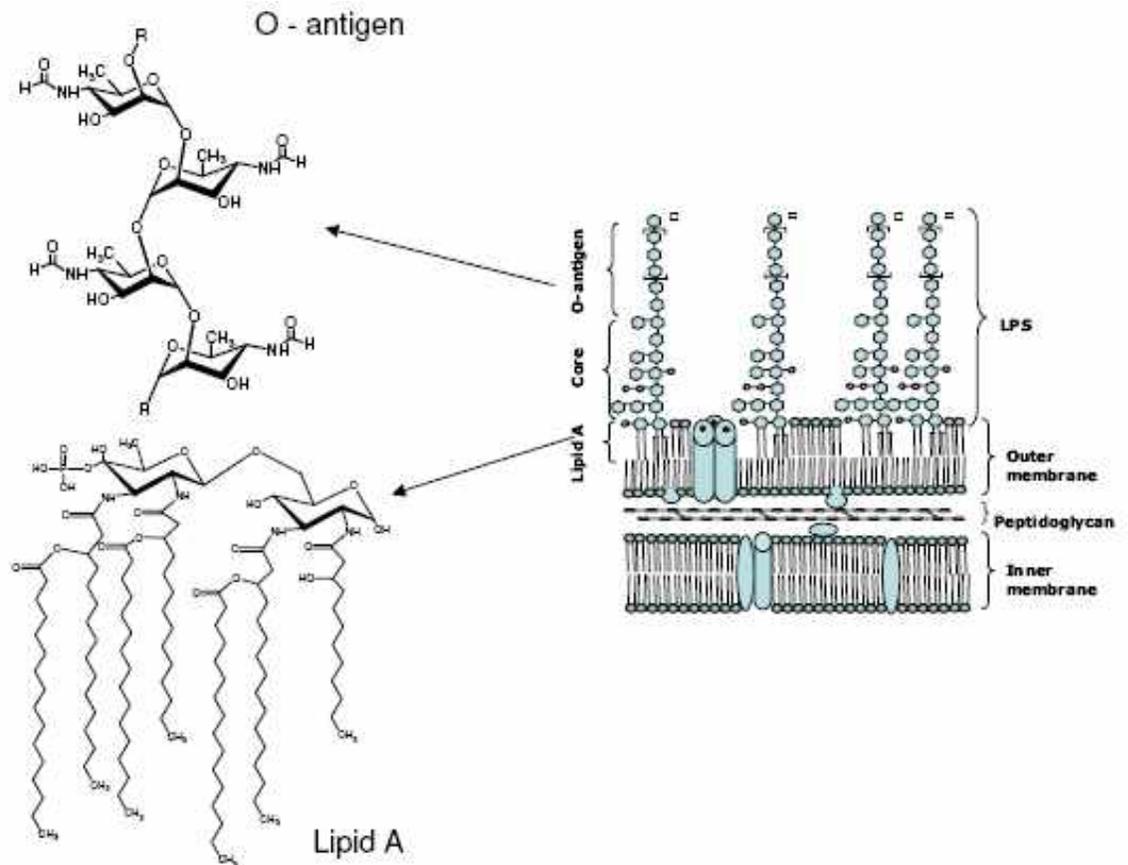
#### 282 **4.2.2.2. PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMPs)**

283 Las OMPs de *Brucella* se clasifican de acuerdo a la cantidad en la que están presentes  
284 en mayores y menores, ambos grupos se encuentran unidas de manera estrecha al LPS por  
285 fuerzas hidrofóbicas (56). Las OMPs mayores son insolubles en disolventes acuosos, fueron  
286 identificadas por primera vez en la década del 80' en *B. abortus* de acuerdo a sus pesos  
287 moleculares, dos de las proteínas más importantes de este grupo son: una de 25-27 kDa y otra  
288 de 36-38 kDa (57). Verstraete *et al.* en 1982 (58) clasificaron a estas proteínas como grupo 3  
289 y grupo 2, respectivamente, y actualmente son denominadas como Omp25 (grupo 3) y Omp2b  
290 (grupo 2). Adicionalmente en *B. melitensis* se identificó una proteína de 31-34 kDa  
291 denominada Omp31 y ausente en *B. abortus* (59, 60).

292

293 Figura 1: Esquema de la estructura del LPS de *Brucella spp.* (55)

294



295

296

297 Existen algunas diferencias en la relación proteínas del grupo 3/grupo 2 presentes en la  
 298 diferentes especies de *Brucella*, así en *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. canis* y *B. suis* las proteínas  
 299 del grupo 3 se encuentra en mayor proporción que las del grupo 2, mientras que en *B. abortus*,  
 300 ambos grupos se presentan en cantidades equivalentes (61).

301

#### 302 4.2.2.3. PROTEÍNAS CITOPLASMATICAS

303 Varios trabajos han enfatizado la importancia de la respuesta inmune humoral contra  
 304 las proteínas citoplasmáticas de *Brucella*, por lo cual han sido consideradas como antígenos

305 para el diagnóstico serológico e incluso, y en este sentido, más importantes que las OMPs (62,  
306 63, 64, 65). Entre las proteínas periplasmáticas cuyos genes han sido clonados y que han sido  
307 identificadas como inmunogénicas, podemos citar la Cu-Zn superóxido dismutasa (66), la  
308 BP26 (40, 67) y la P39 (68).

309 En cuanto a la proteína de *Brucella* BP26, CP28 o Omp28 ha sido identificada por  
310 separado por tres grupos de investigación como un antígeno inmunodominante de importancia  
311 diagnóstica en bovinos, ovinos, caprinos y humanos infectados (40, 67, 69, 70, 71, 72, 73,  
312 74). Esta proteína es comúnmente llamada BP26 siguiendo la nomenclatura de Rossetti *et al.*  
313 (40), quien la localizó en el espacio periplásmico de *Brucella* y fue el primero en publicar la  
314 secuencia de nucleótidos del gene *bp26*. De función desconocida, la BP26 fue reconocida por  
315 sueros de bovinos infectados y, en menor grado, por sueros de bovinos vacunados con S19  
316 (40).

317 Algunas proteínas citosólicas también han sido caracterizadas, para evaluar la  
318 actividad inmunogénica y la protección otorgada por las mismas se han elaborado vacunas  
319 subcelulares que han sido ensayadas mayormente en ratones. Dentro de este grupo de  
320 proteínas citoplasmáticas están las proteínas, por ejemplo, de estrés térmico: GroEL, GroES,  
321 DnaK, HtrA (75, 76); las proteínas YajC, UvrA (75, 77); la bacterioferritina (78), la  
322 gliceraldehódp-3-fosfato deshidrogenada (79) y las proteínas ribosomales: L7/L12 y cp24 (80,  
323 81).

324

### 325 **4.2.3. VIRULENCIA**

#### 326 **4.2.3.1. FACTORES DE VIRULENCIA**

327 En contraste con otros patógenos intracelulares, en las especies de *Brucella* no han  
328 sido demostrados factores de virulencia clásico tales como: exotoxinas, citolisinas, cápsula,

329 formas de resistencia, fimbrias, plasmados, fagos lisogénicos, y no muestran variaciones  
330 antigénicas, ni inducen apoptosis, ni poseen sistemas de secreción tipo I-III (82, 83). La  
331 virulencia de las bacterias de este género puede ser atribuida su capacidad de escapar de los  
332 mecanismos de defensa del hospedador, y posteriormente entrar, sobrevivir y replicarse  
333 dentro de células fagocíticas profesionales, como los macrófagos (84) y no fagocíticas (85).

334         Se cree que la cadena O del LPS tiene algún papel en la virulencia, ya que las cepas  
335 lisas de *Brucella* invaden de manera más eficiente las células del hospedador que las cepas  
336 rugosas (a pesar de que éstas son naturalmente virulentas) (86). El LPS de *Brucella* ha sido  
337 reconocido como un factor de virulencia debido a su, relativamente, baja inmunogenicidad, lo  
338 cual impide la activación de la vía alternativa del complemento (87). La cadena O inhibe la  
339 apoptosis celular evitando la activación de la respuesta inmune (88).

340         Otro factor de virulencia clave para *Brucella* es el sistema de secreción Tipo IV,  
341 codificado en la región *virB*, que es necesario para el crecimiento intracelular tanto en células  
342 fagocíticas como no fagocíticas (89, 90). Además, y aunque los mecanismos moleculares por  
343 los cuales el sistema influye en el tráfico intracelular de *B. abortus* no están claros, al parecer,  
344 los efectores secretados desempeñan un papel en la biogénesis y maduración de la vacuola  
345 que contiene la bacteria, y en el transporte de *B. abortus* a su sitio de la replicación  
346 intracelular (89, 90, 91), y con evidencias de que el sistema es necesario para la fusión de la  
347 vacuola con el retículo endoplásmico rugoso (RER) (92).

348

#### 349 **4.2.3.2. INVASIÓN Y VIDA INTRACELULAR**

350         *Brucella abortus* es capaz de invadir la mucosa intestinal, especialmente a través de  
351 las células M (93). Los fagocitos intra-epiteliales podrían también favorecer la migración  
352 transepitelial y el transporte de *B. abortus* hacia la lámina propia y la submucosa (94). El

353 mecanismo por el cual *Brucella* se une y entra a las células aún no está completamente  
354 esclarecido, aparentemente las brucellas opsonizadas son internalizadas a través del  
355 complemento o los receptores Fc, mientras que los organismos no opsonizados  
356 aparentemente invaden por la interacción con lectinas y los receptores para la fibronectina  
357 (95). Las bacterias opsonizadas son fagocitadas por los macrófagos activados generalmente  
358 mueren dentro del fagolisosoma antes de alcanzar su sitio de replicación intracelular (96). Las  
359 cepas atenuadas son capaces de adherirse e invadir las células del huésped pero no de  
360 sobrevivir intracelularmente (96, 97).

361 La supervivencia intracelular de *B. abortus* se debe a su capacidad de resistir el medio  
362 ambiente acidificado intrafagosomal y de impedir la fusión fago-lisosoma (98, 99). Una vez  
363 dentro de la célula, *B. abortus* redirige el tráfico intracelular, cambiando el proceso de  
364 maduración normal y bloqueando la unión de los fagosomas que contienen la bacteria con los  
365 lisosomas (96). La acidificación temprana de la vacuola que contiene a *Brucella* es necesaria  
366 para la supervivencia intracelular del microorganismo. Este medio acidificado induce cambios  
367 en el perfil de genes de expresión de las bacterias favoreciendo la vida intracelular de las  
368 mismas (99).

369 Luego *Brucella* se traslada desde el fagosoma al RER de la célula huésped, donde  
370 encuentra un ambiente óptimo para su replicación (97, 100).

371 La replicación de *Brucella* en las células del trofoblasto es influenciada por el  
372 momento de la gestación, y las mayores tasas de replicación se observan en la gestación tardía  
373 cuando las células secretan de manera activa hormonas esteroideas (101). En el trofoblasto *B.*  
374 *abortus* induce la síntesis de esteroides y modula el metabolismo de los precursores de las  
375 prostaglandinas, favoreciendo el crecimiento bacteriano (100).

376

377 **4.3. RESPUESTA INMUNE**

378 **4.3.1. INMUNIDAD INNATA**

379 La inmunidad innata es una respuesta inmune no específica, es la primera en activarse  
380 ante la entrada de los agentes infecciosos. La patogenicidad de las bacterias está relacionada  
381 con su habilidad para resistir a los mecanismos de la inmunidad innata: lisis por  
382 complemento, muerte por células NK y fagocitosis por macrófagos. La inmunidad innata  
383 juega un papel importante en la infección por *B. abortus* ya que disminuye el número inicial  
384 de bacterias y tiene influencia sobre el desarrollo de la inmunidad adaptativa.

385

386 **4.3.1.1. COMPLEMENTO**

387 Es un sistema de proteínas plasmáticas que interactúan con los anticuerpos o la  
388 superficie bacteriana opsonizando o directamente matando los patógenos formando un  
389 sistema de ataque de membrana. Tres vías de activación de complemento han sido descritas:  
390 (i) la vía clásica, mediado por complejos antígeno-anticuerpos; (ii) la vía alternativa, inducida  
391 por ciertas estructuras sobre la superficie de microorganismos (vía anticuerpo independiente),  
392 y (iii) la vía de las lectinas, activada por la unión de lectinas que ligan manosa a los hidratos  
393 de carbono de la superficie microbiana. Como el componente principal de la superficie de  
394 *Brucella* es el LPS, la interacción entre *Brucella* y los componentes de complemento son  
395 mediados por esta molécula. En general, las cepas lisas de *B. abortus* son más resistentes que  
396 las cepas rugosas OPS-deficientes a la actividad bactericida del suero ya que el LPS de las  
397 cepas lisas no activa la vía alternativa del complemento (102, 103). La vía clásica mediada  
398 por IgM y concentraciones más bajas de IgG ha sido considerada la acción bactericida  
399 dominante del suero contra *B. abortus* en etapas tempranas de la infección. Sin embargo,  
400 Fernández Prada *et al.* (104) usando *B. abortus* y *B. melitensis* mutantes para *wboA* que

401 carecen OPS, han sugerido que tanto la vía clásico como la de las lectinas están implicadas en  
402 la lisis de *Brucella*.

403

#### 404 **4.3.1.2. CÉLULAS NK**

405 Las células natural killer (NK) constituyen la primera línea de defensa contra  
406 patógenos y luego de su activación pueden lisar las células infectadas. *Brucella abortus*  
407 induce la liberación de interleuquina 12 (IL-12) por las células presentadoras de antígenos y  
408 de esta manera es capaz de activar las células NK. Las células NK activadas por la IL-12  
409 además secretan IFN- $\gamma$ , esta característica podría desempeñar un importante rol en el  
410 establecimiento de una respuesta del tipo Th1 (105). Sin embargo, el rol de las células NK en  
411 el control de la infección por *Brucella* es discutido; hay autores que afirman que IFN- $\gamma$   
412 liberado en la fase inicial de la infección proviene de los linfocitos T y no de las células NK  
413 (106). Ratones deficientes en células NK, infectados con una cepa patógena de  
414 *Brucella* no mostraron diferencias en el número de bacterias aisladas de hígado y bazo cuando  
415 se compararon con ratones normales (86).

416

#### 417 **4.3.1.3. CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (CPAs) Y NEUTRÓFILOS**

418 Las CPAs son los macrófagos y las células dendríticas (CD) y junto con las células  
419 NK son las primeras células en reaccionar contra los microorganismos invasores. Están  
420 ubicadas de manera estratégica debajo de la piel y en las zonas mucosas y fagocitan a los  
421 microorganismos de manera no específica. Las bacterias fagocitadas por las CPAs son  
422 procesadas resultando en la expresión de péptidos bacterianos en la superficie celular en  
423 asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Por otro lado,  
424 los neutrófilos son células abundantes en sangre y cuya función principal es la fagocitosis.

425 Según algunos autores han postulado, luego de la infección, la bacteria es rápidamente  
426 fagocitada por los neutrófilos en los cuales es capaz de sobrevivir y multiplicarse (107). De  
427 esta manera, los neutrófilos facilitarían la diseminación de las bacterias por el organismo  
428 transportándolas hacia los tejidos linfoides y los órganos del sistema reticuloendotelial y  
429 sirviendo de protección frente a la actividad bactericida de los Ac y el Complemento (86).

430 Sin embargo, tanto los macrófagos como los neutrófilos tienen la capacidad de destruir  
431 a las brucellas fagocitadas (108). Es más, los fenotipos resistentes han sido asociados con la  
432 habilidad de los macrófagos bovinos para inhibir el crecimiento intracelular de *B. abortus* (95,  
433 109). Algunos autores han correlacionado esta resistencia al polimorfismo en el gen  
434 NRAMP1 (proteína 1 de los macrófagos asociada a la resistencia natural); sin embargo, no  
435 existe consenso aún al respecto y más estudios son necesarios para verificar esta asociación  
436 (110, 111, 112). Los mecanismos que se activan para destruir los microorganismos son el  
437 estallido respiratorio y la producción de radicales libres de oxígeno en los neutrófilos (113).

438

#### 439 **4.3.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA**

440 Los experimentos realizados en ratones, mediante transferencia de suero y células, han  
441 demostrado que la protección contra *Brucella* es debida en parte a los anticuerpos y en parte a  
442 los linfocitos T (114) de manera no aditiva (115).

443

##### 444 **4.3.2.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

445 Existen evidencias sobre la participación de los anticuerpos en la protección contra las  
446 infecciones con *Brucella*. Araya y Winter (116) demostraron que la inmunización pasiva con  
447 suero inmune de ratones recuperados de la infección o vacunados con S19 confiere protección  
448 contra el desafío de *B. abortus* patógena. Son varios los trabajos que han investigado la

449 protección otorgada por anticuerpos monoclonales dirigidos contra el LPS o proteínas de ME  
450 (OMPs) de *Brucella* (117, 118, 119). El LPS de *Brucella* es un antígeno T independiente,  
451 puede activar directamente las células B para producir anticuerpos dirigidos contra el LPS y  
452 más específicamente contra la cadena O, que es el antígeno más inmunodominante (120). En  
453 ratones BALB/c infectados con *Brucella abortus* 2308, la IgM es la inmunoglobulina  
454 predominante durante las primeras 2 semanas, y posteriormente los isotipos de IgG aumentan  
455 lentamente durante las primeras 3 semanas. A partir de la sexta semana el isotipo IgG3  
456 presenta los niveles más altos y la IgM, IgG1, IgG2a y IgG2b se presentan todas en niveles  
457 moderados (120). Estos trabajos y otros realizados con otros microorganismos intracelulares,  
458 vienen a romper con el dogma que le otorga a la IMC un rol crucial contra estos  
459 microorganismos (121). Y en efecto, aunque *Brucella* es un parásito intracelular facultativo,  
460 mientras se encuentra en el espacio extracelular puede ser blanco de Ac. Algunos autores han  
461 sugerido que los Ac podrían actuar sobre la bacteria de tres maneras diferentes: 1-  
462 opsonización y posterior fagocitosis, 2- activación del complemento por la vía clásica y lisis  
463 de la bacteria, 3- citotoxicidad dependiente de Ac por células asesinas o fagos, o 4- efecto  
464 antiadherente, aglutinante o antiinflamatorio que pueden ejercer los anticuerpos a nivel de las  
465 mucosas (120, 122, 123).

466

#### 467 **4.3.2.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR**

468 Una respuesta inmune adaptativa efectiva contra *B. abortus* requiere de la inmunidad  
469 mediada por células promovida por la activación específica de las células T (124). Los  
470 linfocitos T (CD4+ T helper y CD8+ T citotóxicos) reconocen a los antígenos de *B. abortus*  
471 procesados por las células presentadoras de antígenos (que expresan moléculas del CMH de  
472 clase I o II) mediante los receptores  $\alpha/\beta$  (125). Existe, además, una subpoblación de linfocitos

473 T con receptores  $\gamma/\delta$  que están presentes en gran cantidad en terneros jóvenes y se cree que  
474 serían de importancia en terneros infectados (86). Esta subpoblación de linfocitos no expresa  
475 CD4+ ni CD8+ por lo cual la forma en que se le presentan los antígenos no ha sido definida  
476 aún. Sin embargo, las células  $\gamma/\delta$  tienen una acción lítica in vitro, producen Factor de Necrosis  
477 Tumoral  $\alpha$  (FNT $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  por lo cual pueden activar macrófagos y modular la activación de  
478 las células T con receptores  $\alpha/\beta$  (126).

479 La activación de las células T CD4+ es estimulada por la interleuquina 12 (IL-12) secretada  
480 por los macrófagos infectados (127). La IL-12 promueve la diferenciación de los T helper en  
481 Th1 y este es el tipo celular más importante en la respuesta inmune contra *B. abortus*. Por otro  
482 lado, la IL-12 también promueve la activación de las células T CD8+ (128). Los linfocitos  
483 Th1 también secretan IL-12 que promueve la expansión clonal de las células T y contribuye al  
484 control de la multiplicación de *B. abortus* en los macrófagos (127). Inversamente, la  
485 citoquinas asociadas a la respuesta de tipo Th2, como la IL-10, en ensayo en ratones se ha  
486 visto que actúan limitando la respuesta inflamatoria y favoreciendo el establecimiento de las  
487 infecciones persistentes (105).

488 Las células T CD8+ también tienen un papel importante en la protección contra *B. abortus*,  
489 ratones knock-out para CD8+ son más susceptibles a la infección por *Brucella* (129). Además  
490 los linfocitos T CD8+ secretan IFN- $\gamma$  y aumenta la citotoxicidad de los macrófagos infectados  
491 por *B. abortus* (122, 129).

492

#### 493 **4.4. LA ENFERMEDAD EN LOS BOVINOS**

494 De las 8 biovariedades de *B. abortus*, el biovar 1 ha sido descrito como el aislado con  
495 mayor frecuencia en bovinos (130). Estudios más recientes de prevalencia de biovares  
496 realizados en USA, India y en varios países de América Latina (entre ellos Brasil y Argentina)

497 se ajustan a esta afirmación (131, 132, 133, 134). *Brucella suis* (específicamente los biovares  
498 1 y 3) y *B. melitensis*, pueden infectar de manera transitoria a los bovinos cuando comparten  
499 pasturas, aunque esta infección generalmente no se asocia con signos clínicos (135, 136). La  
500 importancia principal de las infecciones con *B. suis* o *B. melitensis* es su interferencia en el  
501 diagnóstico serológico con las infecciones con *B. abortus* (135, 137).

502 El síntoma principal de la infección con *B. abortus* en las hembras preñadas es el  
503 aborto o el nacimiento de terneros prematuros que mueren durante su primera semana de vida.  
504 Los abortos se producen generalmente durante la segunda mitad de la gestación con retención  
505 placentaria y metritis (138). Luego del aborto por *Brucella* las vacas generalmente tienen  
506 pariciones normales, aunque un nuevo episodio de aborto podría ocurrir (130). Los terneros  
507 que adquieren la infección verticalmente podrían permanecer serológicamente negativos y no  
508 mostrar ningún signo de enfermedad. Sin embargo, las vaquillonas con infección asintomática  
509 latente pueden abortar o parir terneros infectados, manteniendo así la infección en el rodeo  
510 (130, 139).

511 Las brucellas se localizan en los linfonodos supramamarios y en la glándula  
512 mamaria del 80% de los animales infectados y, de esta manera, los mismos continúan  
513 excretando la bacteria en leche de por vida (140). En la glándula mamaria, *B. abortus* induce  
514 una mastitis intersticial multifocal con acumulación intersticial de macrófagos y de neutrófilos  
515 a nivel intra-acinar (141, 142) asociados con una moderada cantidad de microorganismos  
516 ubicados principalmente dentro de las células (142).

517 La mayoría de las vacas infectadas abortan solamente una vez a pesar de que la  
518 placenta puede verse severamente infectada en los nacimientos subsecuentes aunque se  
519 presenten aparentemente normales (143). En condiciones de campo, en general los fetos no  
520 son recuperados o la presencia de autólisis no permite su examinarlos en busca de lesiones.

521 Sin embargo, algunos trabajos con infecciones experimentales indican que la autólisis de fetal  
522 podría producirse dentro del útero (93). La lesión hallada con más frecuencia en los fetos  
523 abortados por *Brucella* es la pleuroneumonía, aunque puede no estar presente en todos los  
524 casos (144). Histológicamente, se puede observar pleuritis fibrinosa asociada a  
525 bronconeumonía intersticial, esta última caracterizada por la acumulación de macrófagos y  
526 neutrófilos, presencia de fibrina, hemorragias y bacterias en las áreas con lesiones. En algunos  
527 casos, puede presentarse vasculitis necrotizante en el parénquima pulmonar (142, 144, 145).  
528 En algunos fetos podría ocurrir también pericarditis fibrinosa (142). En los linfonodos y  
529 bazo se observa hiperplasia, mientras que en el timo es más frecuente la depleción (144).  
530 Eventualmente también se pueden observar procesos de tipo granulomatosos en el hígado,  
531 bazo y riñones, y con menos frecuencia meningitis multifocal o difusa (146).

532 Los toros infectados pueden desarrollar una infección sistémica caracterizada por  
533 fiebre, anorexia y depresión, aunque esta sintomatología suele pasar desapercibida (31). La  
534 patogénesis de la enfermedad en los toros es similar a la de las hembras salvo que están  
535 involucrados las vesículas seminales y los testículos (24). La orquitis es la lesión observada  
536 con mayor frecuencia, asociada en ocasiones con semino-vesiculitis y epididimitis (9, 147,  
537 148, 149, 150). Como resultado de la orquitis crónica y la fibrosis del parénquima testicular,  
538 los toros infectados pueden desarrollar infertilidad permanente (31).

539

#### 540 **4.5. LA ENFERMEDAD EN EL HOMBRE**

541 A pesar de que en la mayoría de los países la brucelosis es una enfermedad de  
542 notificación obligatoria a las autoridades sanitarias, los números oficiales de la enfermedad en  
543 el hombre constituyen solamente una fracción de la verdadera incidencia de la enfermedad.  
544 Por lo tanto, la verdadera incidencia de la enfermedad es desconocida y las estimaciones de la

545 misma son extremadamente variables, desde menos de 0.03 a más de 160 por cada 100.000  
546 habitantes (151, 152).

547 Cinco de las nueve especies conocidas de *Brucella* puede infectar al hombre. La especie más  
548 patógena e infectiva para los humanos es *B. melitensis*, seguida en orden por *B. suis*, *B.*  
549 *abortus* y *B. canis* (138). Además, en años recientes la naturaleza zoonótica de *B. ceti* ha  
550 sido documentada (153, 154, 155). Las vacunas animales *B. melitensis* Rev. 1 y *B. abortus*  
551 S19 pueden causar también la enfermedad en el hombre, aunque el curso de la enfermedad en  
552 estos casos es, usualmente, más corto y benigno que el de las infecciones con las cepas de  
553 campo (138).

554 Los síntomas más comunes de la enfermedad en el hombre incluyen: fiebre ondulante  
555 (la temperatura puede variar desde 37,8 °C durante la mañana a 40,8 °C en la tarde),  
556 sudoración nocturna, escalofríos y debilidad general, malestar, insomnio, anorexia, dolor de  
557 cabeza, artralgia, constipación, impotencia sexual, nerviosismo depresión (138). Además, la  
558 brucelosis humana es conocida por las complicaciones que pueden involucrar órganos  
559 internos, en estos casos los síntomas pueden ser muy variados dependiendo del sitio de  
560 infección e incluyen encefalitis, meningitis, espondilitis, artritis, endocarditis, orquitis y  
561 prostatitis (138).

562 Debido a que la transmisión de persona a persona ocurre en raras ocasiones, la  
563 eliminación de la enfermedad en los reservorios animales se traduce en una drástica  
564 disminución de la incidencia de la infección en humanos (151).

565

#### 566 **4.6. VACUNAS**

567 La vacunación en brucelosis bovina es uno de los componentes de los programas de  
568 control y erradicación de la enfermedad (156). Las vías subcutáneas o intramusculares son las

569 más comúnmente utilizadas para la vacunación contra brucelosis, aunque la vía conjuntival ha  
570 sido también empleada de manera efectiva. La utilización de la vía oral ha sido reportada  
571 como eficaz, sin embargo los resultados han sido menos consistentes o repetitivos al ser  
572 comparados con las vías subcutánea o intramuscular (157).

573

#### 574 **4.6.1. VIVAS ATENUADAS**

575 Las vacunas vivas tienen la ventaja de replicar en el hospedador asegurando la  
576 estimulación lenta y continua de su sistema inmune contra un gran número de componentes.  
577 La eventual eliminación de la cepa vacunal es, sin embargo, necesaria para asegurar la  
578 inocuidad de la vacuna (158). Las dos vacunas vivas atenuadas utilizadas en los programas de  
579 control y erradicación en bovinos son las producidas por las cepas de *B. abortus* S19 y RB51.

580

##### 581 **4.6.1.1. BRUCELLA ABORTUS CEPA 19 (S19)**

582 La vacuna elaborada con la cepa *Brucella abortus* S19 ha sido la más usada  
583 mundialmente para el control de la brucelosis bovina y es la de uso oficial actualmente en  
584 Argentina. Descrita por primera en el año 1930, fue aislada originalmente a partir de una  
585 muestra de leche de una vaca Jersey como una cepa virulenta en el año 1923, pero luego de  
586 permanecer en el laboratorio a temperatura ambiente por casi un año se volvió atenuada  
587 naturalmente. Las bases moleculares de su atenuación son aún desconocidas. Si bien se ha  
588 demostrado que posee una delección en los genes que intervienen en el catabolismo del  
589 eritritol, la delección de estos genes en cepas virulentas no derivó en la obtención de mutantes  
590 atenuadas (159, 160).

591 La vacuna S19 ha demostrado ser capaz de otorgar una respuesta inmune protectora en  
592 bovinos. A pesar de ser poco virulenta, la vacunación con S19 en vacas preñadas puede

593 producir abortos, que oscilan entre el 1 al 2,5% bajo condiciones de campo (161, 162). Un  
594 efecto adverso menos frecuente de la vacunación con S19 es la presentación de artropatías  
595 asociadas a la formación de inmunocomplejos conteniendo antígenos de *Brucella* (158, 161).

596 La presencia del LPS con la cadena O en la S19 explica la aparición de anticuerpos en  
597 suero que no pueden ser diferenciados de los de infección con las técnicas de utilizadas  
598 rutinariamente para el diagnóstico de la enfermedad. La aparición y persistencia de estos  
599 anticuerpos depende de la edad de vacunación, la raza, la dosis y rutas utilizadas (29, 163,  
600 164). Los títulos podrían persistir más de 10-11 meses cuando se vacuna animales adultos con  
601 una dosis estándar de  $3 \times 10^{10}$  UFC (165, 166). Este es uno de los mayores inconvenientes  
602 asociados al uso de la S19 en programas de erradicación de la enfermedad los cuales se  
603 fundamentan principalmente en la vacunación y la eliminación de los animales seroreactores.  
604 Algunas técnicas serológicas como el ELISA de competición y el test de polarización  
605 fluorescente (FPA) han sido desarrolladas con el fin de superar este problema (167, 168).

606

#### 607 **4.6.1.2. BRUCELLA ABORTUS RB51 (RB51)**

608 La cepa RB51 es una mutante rugosa de la cepa virulenta *B. abortus* 2308, obtenida de  
609 manera espontanea luego de repetidos pasajes *in vitro* en medios de cultivo con rifampicina y  
610 penicilina. Es una cepa estable y resistente a rifampicina, y al ser rugosa los animales  
611 vacunados con esta mutante no producen anticuerpos anti-cadena “O” por lo que no hay  
612 anticuerpos que interfieran en el diagnóstico serológico mediante las pruebas convencionales  
613 (169). La falta de expresión de la cadena O se debe a una disrupción en el gen *wboA* (170).  
614 Sin embargo, se cree que RB51 porta otros cambios genéticos aún no conocidos.

615 La RB51 ha sido aprobada como vacuna oficial en varios países, en USA, Chile y  
616 Uruguay en reemplaza a la S19 (171; 172), y en Méjico, Paraguay, Venezuela y algunos  
617 países de América Central se usa de manera conjunta con la S19 (173, 174, 175). En la

618 mayoría de estos países, la RB51 es administrada en terneros (4 – 12 meses) a dosis completa  
619 de  $1.0 - 3.4 \times 10^{10}$  UFC y por vía subcutánea.

620 En los ensayos realizados en bovinos vacunados subcutáneamente con RB51, el 100%  
621 de los animales desarrollaron anticuerpos contra los antígenos R que pudieron ser detectados  
622 por dotELISA u otros test (176, 177). Por el contrario, la vacuna con RB51 no tuvo  
623 interferencia con los test serológicos tradicionales para cepas lisas de *Brucella* (177, 178, 179,  
624 180, 181). Algunos autores han reportado que un bajo número de animales primo-vacunados  
625 con S19 y revacunados con RB51, presentan reacciones positivas en los test rápidos de  
626 aglutinación, que luego son confirmados como negativos por otras pruebas (182). Bajo este  
627 mismo esquema de revacunación con S19 hay autores que han reportado interferencias con las  
628 pruebas de SAT y ELISA en animales con reacciones persistentes en las pruebas de  
629 aglutinación rápidas (183). Los extractos de *brucellae* S siempre contienen una cantidad  
630 significativa de R-LPS que se encuentra presente normalmente en la superficie de la bacteria.  
631 Por esta razón, es posible que vacunas R muestren algún grado de interferencia en esos test.

632

#### 633 **4.6.2. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN**

634 Son varias las estrategias que diversos grupos de investigación persiguen en post del  
635 desarrollo de vacunas de nueva generación de *Brucella* e incluyen el desarrollo de vacunas  
636 genéticamente atenuadas, vacunas a subunidades, la utilización de vectores bacterianos, la  
637 superexpresión de antígenos homólogos protectivos y la inmunización con plásmidos ADN  
638 que codifican antígenos capaces de generar protección.

639

##### 640 **4.6.2.1. VIVAS GENETICAMENTE ATENUADAS**

641 Uno de los objetivos de la investigación de brucelosis es la identificación de antígenos  
642 proteicos que induzcan una respuesta humoral intensa durante la infección y esto no es  
643 esencial para la inmunidad protectora o para la supervivencia de la bacteria. La vacunación  
644 con una mutante de la cepa vacunal que carece del gen que codifica para una proteína de  
645 interés, en asociación con una prueba serológica basada en la proteína purificada, debería  
646 permitir la diferenciación entre animales vacunados e infectados. Sobre esta base, varias  
647 vacunas candidatas han sido logradas empleando técnicas de genética molecular (178, 184,  
648 185). Por ejemplo, la delección del gen P39 en *B. abortus* S19 o *B. melitensis* Rev.1 no tuvo  
649 efecto sobre la resistencia residual o la capacidad protectora de ambas vacunas cuando fueron  
650 evaluadas en ratones (185) y hasta el momento no se han realizado ensayos en los huéspedes  
651 naturales. Mutantes de *B. abortus* con delección para Cu-Zn superóxido dismutasa o para la  
652 proteína periplásmica de 31 kD llamada BSCP31, fueron evaluadas en bovinos y presentaron  
653 ante el desafío con *B. abortus* patógena niveles de protección similares a la cepa de la cual  
654 derivan (178, 184). Sin embargo estas proteínas no resultaron inmunodominantes en bovinos  
655 infectados razón por la cual no otorgan ventajas con respecto al diagnóstico de la enfermedad.

656 Ha sido creada una mutante de la cepa S19 incapaz de expresar la proteína BP26 y que  
657 posee como marcador genético una luciferasa eucariota, esta cepa ha sido denominada M1-*luc*, esta  
658 mutante ha comportado igual que la cepa S19 en ensayos en ratones en cuanto a tiempo de  
659 crecimiento en medios de cultivos, morfología y virulencia y persistencia en bazos (17, 41).  
660 De la misma manera, mutantes de Rev. 1 para el gen *bp26* o de manera conjunta, para los  
661 genes *bp26* y *omp31* evaluadas en ratones mantuvieron una adecuada virulencia residual y  
662 protegieron de la infección con *B. ovis* y *B. melitensis* en igual medida que lo hizo Rev. 1  
663 (186).

664

665 **4.6.2.2. VACUNAS A ADN**

666 La inmunización con plásmidos de ADN codificando antígenos de interés representa  
667 un nuevo y prometedor método en la investigación y desarrollo de vacunas. Varios trabajos  
668 han demostrado que luego de la inmunización con ADN, el antígeno es naturalmente es  
669 procesado y presentado induciendo una completa respuesta inmune que incluye la producción  
670 de anticuerpos, linfocitos T CD8+ citotóxicos, y la activación de células T helper CD4+ (187,  
671 188, 189).

672 Varios antígenos de *Brucella* han sido reportados como protectores contra brucelosis  
673 al ser administrados como vacunas a ADN en animales de laboratorio (190, 191, 192, 193).  
674 Sin embargo, estos resultados no pueden ser extrapolados directamente al huésped definitivo.

675 En grandes animales las vacunas a ADN han demostrado ser seguras pero  
676 desencadenando una respuesta inmune modesta (194, 195).

677 Son pocos los trabajos en los cuales las vacunas de *Brucella* a ADN se han ensayado  
678 en sus huéspedes definitivos, entre ellos el trabajo realizado por Sáez *et al.* (196) que  
679 reportaron que la inoculación intramuscular en bovinos de un plásmido de ADN conteniendo  
680 el gen de la superóxido dismutasa Cu-Zn indujo un bajo nivel de anticuerpos y una respuesta  
681 inmune celular específica contra *B. abortus*. Sin embargo, en este trabajo no se evaluó la  
682 protección conferida por dicha vacuna.

683

684

685

686

687

688

## ENSAYO 1

689

690

**RESPUESTA INMUNE Y CAPACIDAD PROTECTORA DE UNA CEPA**

691

**MUTANTE DE *Brucella abortus* S19 EN HEMBRAS BOVINAS DESAFIADAS CON *B.***

692

***abortus* 2308.**

693

694 **5.1. INTRODUCCIÓN**

695 La proteína BP26 ha sido previamente identificada como un antígeno  
696 inmunodominante en bovinos, ovinos, caprinos, caninos y humanos infectados con *Brucella*  
697 (70, 197). Por otro lado, cuando la expresión del gene *bp26* fue interrumpido en la cepa S19  
698 con un *cassette* de resistencia a la kanamicina, en ratones BALB/c la cepa mutante presentó la  
699 misma resistencia residual y capacidad de protección que la cepa S19 (17).

700 Sin embargo, ha sido demostrado que los ratones son relativamente resistentes a la  
701 brucelosis y muchos estímulos inespecíficos podrían modificar la resistencia o susceptibilidad  
702 de los mismos. A pesar de esto los ratones han sido utilizados como un paso preliminar en el  
703 análisis de vacunas contra brucelosis por el bajo costo y corto intervalo de tiempo que implica  
704 la realización de ensayos en este modelo. Una vez superada esta etapa es necesario realizar la  
705 evaluación de las vacunas en su huésped definitivo.

706 La protección en brucelosis bovina es medida por la disminución en la tasa de abortos,  
707 de muertes perinatales y una disminución en la colonización por la bacteria en animales  
708 vacunados cuando son comparados con un grupo control no vacunado luego del desafío con  
709 una cepa de comprobada patogenicidad (198).

710 El objetivo del Ensayo 1 fue determinar la capacidad protectora de la cepa M-1*luc* en  
711 relación a la cepa S19 en hembras bovinas vacunadas cuando terneras y desafiadas durante la  
712 preñez con una cepa de *B. abortus* con patogenicidad conocida.

713

## 714 **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

715 El ensayo fue dividido en tres etapas: la primera se realizó en el Campo Experimental  
716 N° 8 de la EEA INTA Balcarce, la segunda en instalaciones de confinamiento que posee  
717 SENASA en la localidad de Azul y la tercera en la Reserva Experimental N° 5 de la EEA  
718 INTA Balcarce.

719

### 720 **5.2.1. PRIMERA ETAPA**

721 5.2.1.1. Animales: se seleccionaron 45 hembras Aberdeen Angus, Hereford o sus cruza,  
722 provenientes de rodeos seronegativos, de 2 a 4 meses de edad, no vacunadas contra brucelosis  
723 y serológicamente negativas a la enfermedad. Los animales recibieron el plan sanitario  
724 tradicional de reservas ganaderas de la EEA INTA Balcarce. Las terneras permanecieron en  
725 pasturas consociadas perennes asegurando una ganancia diaria de aproximadamente 0,400  
726 Kg, hasta el momento del servicio. Todos los animales fueron manejados en un lote único.

727 5.2.1.2. Vacunación: las terneras se vacunaron a los 6-8 meses de edad. Se realizó un  
728 sangrado previo y las pruebas de rutina para confirmar la negatividad a brucelosis. Las  
729 terneras fueron divididas al azar en tres grupos experimentales y se vacunaron siguiendo el  
730 siguiente esquema:

731 a) Grupo 1: Vacuna *B. abortus* S19 comercial, (n= 15), por vía SC con 2 mL  
732 en el área axilar de una suspensión de  $15-30 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC).  
733 Se utilizó una vacuna comercial previamente titulada con la dosis recomendada por  
734 SENASA.

735 b) Grupo 2: Vacuna *B. abortus* M1-luc, (n= 15), por vía SC con 2 mL en el  
736 área axilar de una suspensión de  $15-30 \times 10^9$  UFC.

737 c) Grupo 3: Controles sin vacunar, (n= 15), recibieron por vía SC 2 mL de PBS

738 estéril.

739 5.2.1.3 Preparación de cepas vacunales:

740 Para la vacunación del Grupo 1 se utilizó una vacuna comercial de *B. abortus* S19  
741 (Laboratorio San Jorge Bagó, Argentina). La cepa liofilizada S19 fue utilizada de acuerdo a  
742 los procedimientos recomendados por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA).  
743 Antes e inmediatamente después de la vacunación, cada frasco fue evaluado respecto de su  
744 pureza y número de UFC por conteo en placas.

745 La cepa *B. abortus* M-11uc se dejó crecer a 37°C durante 48 hs en placas de AT (Difco,  
746 Detroit, MI, USA), luego se colectó y se resuspendió en solución salina estéril (0,85% NaCl)  
747 a la concentración buscada. La dosis vacunal fue calculada considerando los límites  
748 estipulados para las vacunas de *B. abortus* S19 y los utilizados en experimentos previos en  
749 bovinos (178, 184)

750 5.2.1.4. Hemocultivos: se obtuvo sangre por punción yugular de todos los animales en tubos  
751 de 10 mL con el anticoagulante EDTA los días 1, 3, 7 y 14 posvacunación (PV). La misma se  
752 inoculó en frascos con medio líquido específico para hemocultivo de *Brucella* spp.  
753 (HemoBrucella®, Lab. Britania, Argentina) se incubaron a 37°C. A partir del medio de  
754 cultivo líquido se realizaron subcultivos a placas con AT (Difco, Detroit, MI, USA)  
755 suplementado con 5% de suero equino y agar Skirrow con antibióticos (199) los días 1, 7, 15  
756 y 30 posteriores a la inoculación de cada frasco. Las placas fueron incubadas a 37°C en  
757 atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> y revisadas cada 48 hs durante al menos 10 días en busca de  
758 colonias sospechosas de *B. abortus*. Para confirmación de *B. abortus* se realizó tinción de  
759 Gram, pruebas bioquímicas: oxidasa, ureasa y actividad de la catalasa, producción de SH<sub>2</sub> y  
760 tolerancia a los colorantes fucsina y tionina (34).

761 5.2.1.5. Serología: para la extracción de sueros se obtuvo sangre por punción yugular en tubos

762 de 10 mL de todos los animales en tubos sin anticoagulante a los 7 días PV y posteriormente  
763 cada 15 días hasta los 3 meses PV, luego 1 vez por mes hasta la fecha de desafío. Las  
764 muestras fueron centrifugadas y los sueros separados en alícuotas (2 mL) y almacenados a  
765  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para la detección de anticuerpos anti-*B. abortus* se realizaron las  
766 siguientes pruebas: antígeno bufferado en placa (BPA), seroaglutinación lenta en tubo (SAT),  
767 2-mercaptoetanol (2-ME), fijación de complemento microtécnica (FC) y ELISA anti BP26.  
768 La prueba de BPA descrita previamente por Angus y Barton (200) fue realizada siguiendo  
769 las recomendaciones de SENASA (201). Los resultados fueron expresados como positivo o  
770 negativo.

771 Las pruebas de SAT y 2-ME fueron realizadas en paralelo como describen Alton *et al.*  
772 (202). La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las especificaciones del Manual  
773 de Diagnóstico Serológico de la Brucelosis Bovina del SENASA, Argentina (203). Sueros  
774 con títulos  $\geq 1:200$  a SAT y/o  $\geq 1:50$  a 2-ME fueron considerados positivos.

775 La prueba de FC fue realizada siguiendo el método Hill's de 50% de hemólisis (204),  
776 utilizando referencia el segundo Suero Internacional Estándar anti-*Brucella* (ISAbS). Sueros  
777 que con un resultado 30 Unidades Internacionales fueron considerados positivos (205).

778 La presencia de IgG contra BP26 fue determinada mediante la realización de un  
779 ELISA indirecto descrito previamente por Arese *et al.* (197). La proteína BP26  
780 recombinante fue diluida a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  en buffer bicarbonato ( $\text{pH}=9,6$ ) y  
781 con ellas se cubrieron los pocillos de las placas de poliestireno (200  $\mu\text{L/well}$ ; Polysorp, Nunc-  
782 Immuno). Después de incubarlas durante toda la noche a temperatura ambiente, las placas se  
783 lavaron 4 veces con el buffer de lavado (PBS,  $\text{pH}$  7,2 con Tween 20 al 0,05%) y bloqueadas  
784 con buffer de lavado con el agregado de 5% de leche descremada. Luego de incubarse 1 h a  
785  $37^{\circ}\text{C}$ , la solución de bloqueo fue retirada, y las placas fueron lavadas 5 veces con buffer de

786 lavado. A continuación, los sueros (1:200) fueron agregados en los pocillos (200  $\mu$ L/well).  
 787 Las placas fueron incubadas 1 h a 37°C, lavadas 6 veces con buffer de lavado y luego se  
 788 procedió a agregar un anticuerpo producido en cabra anti-IgG bovina conjugado con  
 789 peroxidasa de rábano picante (Accurate, USA) en una dilución 1:2000. Luego de 1 h de  
 790 incubación a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas y 200  $\mu$ L de la solución de  
 791 sustrato (ABTS 0,04 M en buffer citrato 0,05 M pH5 y 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 V) fueron agregados  
 792 a cada pocillo. Después de incubar a temperatura ambiente durante 7-10 min, la lectura con  
 793 filtro A<sub>450</sub> fue registrada en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan, ICN). Los  
 794 resultados de absorbancia se expresaron como Porcentaje de Positividad (PP), el cual se  
 795 calculó de la siguiente manera:

796

797

Densidad óptica del suero problema

798

$$PP = \frac{\text{Densidad óptica del suero problema}}{\text{Densidad óptica del control positivo}} \times 100$$

799

Densidad óptica del control positivo

800

801 El punto de corte será establecido tomando como referencia los datos obtenidos por Campos  
 802 (2003) y evaluando en una curva ROC los resultados que se obtengan en este trabajo.

803 5.2.1.6. Servicio: a los 15-17 meses de edad (12 meses PV) las hembras recibieron servicio.

804 Dos semanas antes de entrar en servicio, fueron sincronizadas hormonalmente con dos dosis,

805 separadas por 11 días, de una Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  sintética (150  $\mu$ g D(+)) cloprostenol en 2 mL

806 intramuscular) (Ciclase, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Transcurridas 48 hs de la última

807 aplicación de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , las hembras recibieron servicio natural durante 45 días con 2 toros de

808 raza Criolla Argentina de dos años de edad. Los toros fueron examinados previamente

809 demostrando poseer un estatus reproductivo satisfactorio en la base a sus condiciones físicas,

810 circunferencia escrotal y examen seminal (206). A los 35 días de terminado el servicio las  
811 preñeces fueron confirmadas por palpación transrectal y ecografía (Scanner 100 Vet equipado  
812 con transductor de 6,5 MHz, Pie Medical, Maastricht, The Netherlands). Posteriormente, el  
813 status de preñez fue monitoreado nuevamente por palpación transrectal, aproximadamente, a  
814 los 5 meses de gestación.

815 Todas las vaquillonas permanecieron sobre pasturas hasta llegar a los 4 meses de  
816 preñez y aquellas preñadas fueron trasladadas al campo experimental donde se realizó el  
817 desafío.

818

## 819 **5.2.2. SEGUNDA ETAPA**

820 5.2.2.1. Desafío: a los 5-6 meses de preñez, se desafiaron todas las vaquillonas vacunadas y  
821 las controles con la cepa virulenta *B. abortus* 2308. Después de crecer en AT durante 48 hs a  
822 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, una suspensión salina de la cepa 2308 fue preparada y  
823 ajustada a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, la cual fue confirmada luego por conteo en  
824 placa mediante el método de Miles *et al.* (207). Los animales fueron expuestos a la cepa de  
825 desafío por vía conjuntival instilando 100 µL (50 µL/ojo) de la suspensión *B. abortus* 2308,  
826 resultando en una dosis de  $3 \times 10^7$  UFC/animal desafiado.

827 5.2.2.2 Serología y hemocultivo: se obtuvo sangre por punción yugular sin anticoagulante los  
828 días 7, 15, 30, 45 y 60 PD y de cada animal al momento del parto o aborto para la realización  
829 de pruebas serológicas. Los días 2 y PD se obtuvieron muestras de sangre con anticoagulante  
830 de todos los animales para la realización de hemocultivos. Tanto para los hemocultivos como  
831 para la serología se siguió la metodología detallada en la primera etapa. De manera adicional,  
832 en el último muestreo realizado a los 126 días PD se realizó la prueba de polarización  
833 fluorescente (FPA) a todos los animales. La prueba fue realizada con un kit comercial

834 (*Brucella Abortus* Antibody Test Kit (*Brucella* FPA), Diachemix, USA) se siguieron para su  
835 ejecución las especificaciones del fabricante. Para la lectura de las muestras se utilizó el  
836 analizador de FPA (Sentry® 100, Diachemix, USA). El punto de corte considerado fue de  
837 94% mP, que corresponde al valor determinado por SENASA para la República Argentina  
838 (203).

839 5.2.2.3 Pérdidas reproductivas: cuando la pérdida fetal ocurrió entre los 42 y 260 días de  
840 gestación fue definida como aborto, cuando la pérdida ocurrió desde los 260 hasta el término  
841 de la preñez fue clasificada como prematuro (208). La edad fetal fue determinada por la  
842 distancia entre la corona y la grupa (6, 208). Las muertes de terneros que se presentaron entre  
843 el día 1 y 7 de edad se definieron como neonatales (208). La protección fue medida como el  
844 número de animales que no abortaron con respecto al total de animales por grupo. Sólo para  
845 los fines de este análisis, tanto las pérdidas perinatales como las neonatales fueron  
846 consideradas como abortos.

847 Del resto de los terneros se registró la viabilidad hasta el momento del destete.

848 Los fetos abortados y los terneros prematuros no viables fueron recolectados dentro de las 12  
849 hs de producido el aborto o nacimiento.

850 5.2.2.4. Cultivo bacteriológico: Las muestras arribaron al laboratorio dentro de las 8 hs  
851 posteriores a su recolección. Para el aislamiento de *B. abortus* se obtuvieron muestras de  
852 líquido de abomaso, pulmón, bazo y placentomas (cuando estuvieron disponibles) de los  
853 fetos/terneros no viables, y de leche/calostro y mucus cervico vaginal de las madres. Todas  
854 las muestras fueron cultivadas en placas con ASC (Oxoid Ltd, Wad Road, Basingstoke, UK)  
855 adicionado con 5% de sangre bovina desfibrinada estéril y en placas con ASK con  
856 antibióticos (199). Todas las placas fueron incubadas a 37° C, en atmósfera conteniendo 10%  
857 CO<sub>2</sub> las con ASC y en microaerofilia las con ASK y examinadas diariamente durante 7 días,.

858 Los aislamientos fueron identificados por los procedimientos de rutina descritos por Alton  
859 (34).

860 Se descartó la presencia de otros agentes bacterianos, virales o protozoarios que pudieran  
861 ocasionar pérdidas reproductivas (209).

862 5.2.2.5. Histopatología e Inmunohistoquímica: De los fetos abortados se tomaron múltiples  
863 muestras para análisis histopatológico que incluyeron: cerebro, pulmón, hígado, corazón,  
864 riñón, glándula adrenal, bazo, timo, linfonódulos, abomaso, intestino, músculo esquelético y  
865 placenta (cuando estuvo disponible). Las muestras fueron fijadas en formol 10%,  
866 deshidratadas y embebidas en parafina. Posteriormente los tejidos fueron cortados a 4-5  $\mu\text{m}$  y  
867 teñidos con hematoxilina-eosina. Se registraron los cambios histológicos y se clasificaron las  
868 lesiones (6). Los cortes de placentas y pulmones fueron también examinados mediante la  
869 técnica de avidin biotina, siguiendo la metodología ya descrita (210, 211). El anticuerpo  
870 primario policlonal (antisuero *B. abortus*, Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) fue usado a  
871 una dilución 1:200, incubado durante 45 min a 37° C. Cortes de pulmón fetal bovino positivo  
872 a *B. abortus* por cultivo fueron utilizados como controles positivos y para titular el anticuerpo  
873 primario. Como control negativo se aplicó suero normal de conejo a los portaobjetos del  
874 control positivo.

875 Se realizaron pruebas serológicas en las vacas y terneros que nacidos viables  
876 siguiendo la metodología detallada previamente.

877

### 878 **5.2.3. TERCERA ETAPA**

879 Culminada la segunda etapa y una vez destetados los terneros, los animales vacunados con  
880 M1-*luc* fueron trasladados al campo experimental R5 de INTA Balcarce donde recibieron  
881 servicio natural con un toro negativo a brucelosis. Se evaluó la eficiencia reproductiva de las

882 vacas y se realizó seguimiento serológico de las mismas hasta el destete de los terneros  
883 obtenidos en esta etapa.

884

#### 885 **5.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

886 5.2.4.1. Resultados de las pruebas serológicas: los valores de los títulos que se obtuvieron en  
887 las pruebas serológicas de SAT, 2-ME fueron transformados para su análisis a  $\log_{10}(x + 1)$ .  
888 La significancia entre los tratamientos se estimó por un ANOVA (versión 3.10, GraphPad,  
889 San Diego, CA). Las comparaciones de medias de los tratamientos respecto del grupo control  
890 se realizaron por la prueba de Dunnett. Además, se analizaron las diferencias estadísticas  
891 entre grupos mediante la prueba de Tuckey. Se empleó el Test Exacto de Fisher para  
892 comparar la proporción de vaquillonas de cada grupo rectoras a las pruebas serológicas  
893 cualitativas (BPA, SAT/2ME, FC y ELISAI anti BP26).

894 5.2.4.2. Resultados de los hemocultivos: se utilizó el Test Exacto de Fisher para comparar la  
895 proporción de hemocultivos positivos en cada grupo experimental.

896 5.2.4.3. Evaluación de los abortos: se utilizó el Test Exacto de Fisher para comparar la  
897 proporción de abortos producidos en cada grupo experimental.

898 5.2.4.4. Análisis de Riesgo Relativo: el riesgo relativo fue utilizado como una medida de  
899 asociación entre expuestos (grupo control no vacunado) y la incidencia acumulativa de  
900 abortos e infección en vaquillonas en los grupos vacunados. El intervalo de confianza de este  
901 radio fue calculado utilizando una aproximación logarítmica (212, 213).

902 La eficacia vacunal fue estimada bajo la forma de una fracción atribuible en el grupo  
903 expuesto  $[(RR - 1)/RR]$ , donde el grupo no vacunado es el grupo expuesto o factor de riesgo  
904 positivo. Fue interpretada como la proporción de casos que deberían haber ocurrido en los  
905 grupos vacunados de no haber sido vacunados (214). Para los fines de este análisis, tanto las

906 perdidas perinatales como las neonatales fueron consideradas como abortos.

907

908 **5.3. RESULTADOS**

909 **5.3.1. PRIMERA ETAPA**

910 5.3.1.1. Serología: Todas las terneras fueron serológicamente negativas a brucelosis previo a  
911 la vacunación a las pruebas de BPA, SAT, 2-ME, FC y ELISAI anti BP26. Las dosis  
912 utilizadas para la vacunación estuvieron dentro de los rangos esperados tanto para el Grupo 1  
913 como para el 2 (Tabla 1). Luego de la vacunación todas las vaquillonas Grupo 1 como las del  
914 Grupo 2 desarrollaron anticuerpos anti LPS *Brucella* a partir primer semana PV las cual fue  
915 evidenciada por las pruebas de BPA, SAT y 2-ME. Los animales del grupo control  
916 permanecieron negativos durante todos los muestreos hasta el momento del desafío.

917 No se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) en la proporción de animales  
918 positivos a las pruebas de BPA, SAT/2ME y FC en los grupos vacunados en las diferentes  
919 semanas PV (Fig. 1 y 2). Desde la semana 1 hasta la 8 PV el 100% de los animales vacunados  
920 fueron positivos a la prueba de BPA. Posteriormente esta proporción fue disminuyendo  
921 lentamente, a las 54 semanas PV 2 animales del Grupo 1 y 1 animal del Grupo 2  
922 permanecieron positivos a esta prueba.

923 La respuesta humoral medidas por las pruebas de SAT/2ME y FC fue similar a la de  
924 BPA, pero declinó de manera más temprana. Para las pruebas de SAT/2ME a partir de la 8 en  
925 el caso del Grupo 1 y semana 6 en el caso del Grupo 2, comenzó a disminuir el número de  
926 animales positivos, siendo negativos el total de los animales a las 12 y 16 semanas PV en los  
927 grupos 1 y 2, respectivamente. Por otro lado, en la prueba de FC la proporción de animales  
928 positivos comenzó a disminuir de manera significativa a partir de la semana 6 PV en ambos  
929 grupos vacunados, siendo el 100% de los animales negativos a las 10 y 16 semanas PV para  
930 los grupos 1 y 2, respectivamente.

931 No hubo diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los grupos vacunados en la  
 932 evolución de la cinética de anticuerpos anti LPS en los diferentes muestreos PV, tanto para las  
 933 prueba de SAT como para la de 2ME. En cambio las diferencias fueron significativas  
 934 ( $p<0.001$ ) cuando se compararon los grupos vacunados (1 y 2) con el grupo 3. El pico de  
 935 anticuerpos se observó entre las semanas 1-2 PV en la prueba de SAT, siendo los títulos  
 936 máximos 1/3200 y 1/1600 para los grupos 1 y 2, respectivamente. En la prueba de 2ME el  
 937 pico de anticuerpos se presentó entre las semana 2-4 PV, siendo los títulos máximos 1/400 y  
 938 1/200 para los grupos 1 y 2, respectivamente (Fig. 3 y 4).

939 En los sueros de los diferentes grupos no fueron detectados anticuerpos anti luciferasa  
 940 mediante la técnica de *western blot* realizada con los sueros de 1, 2 y 6 meses PV (datos no  
 941 mostrados), indicando por lo tanto que la luciferasa no interfiere con la reacción serológica  
 942 del hospedador.

943 Las vaquillonas de los grupos 1 y 2, no presentaron anticuerpos anti BP26 cuando las  
 944 muestras fueron ensayadas por el ELISAi utilizando la proteína recombinante BP26 como  
 945 antígeno. Los valores de OD del ELISA de las vaquillonas de los grupos vacunados fueron  
 946 negativos ( $\leq 0.115$ ) y no se diferenciaron de los OD obtenidos en los animales del grupo  
 947 control sin vacunar ( $\leq 0.106$ ). Un suero obtenido de un animal infectado naturalmente fue  
 948 utilizado como control positivo con un valor de OD de 1.2.

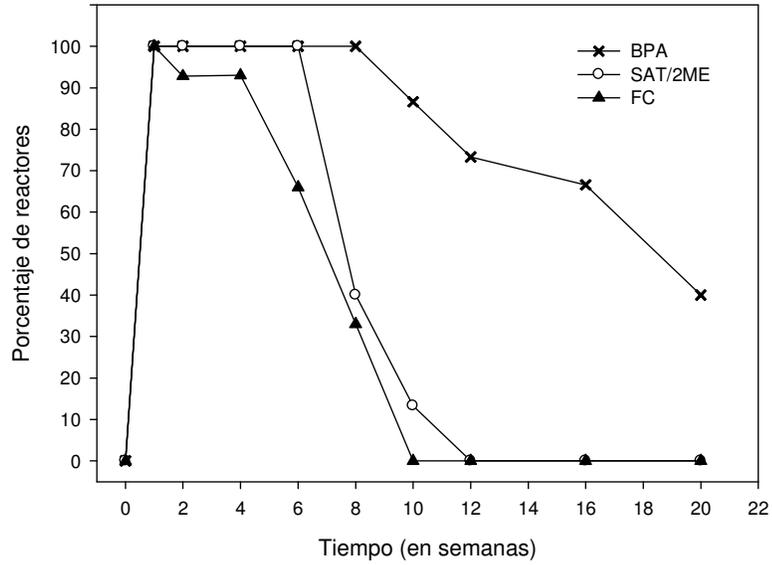
949

950 **Tabla 1:** Dosis finales en UFC utilizadas para la vacunación de terneras.

Grupo	Dosis Esperada (en UFC)	Dosis Inoculada (en UFC)
1	15-30 x 10 <sup>9</sup>	20 x 10 <sup>9</sup>
2	15-30 x 10 <sup>9</sup>	16 x 10 <sup>9</sup>

951

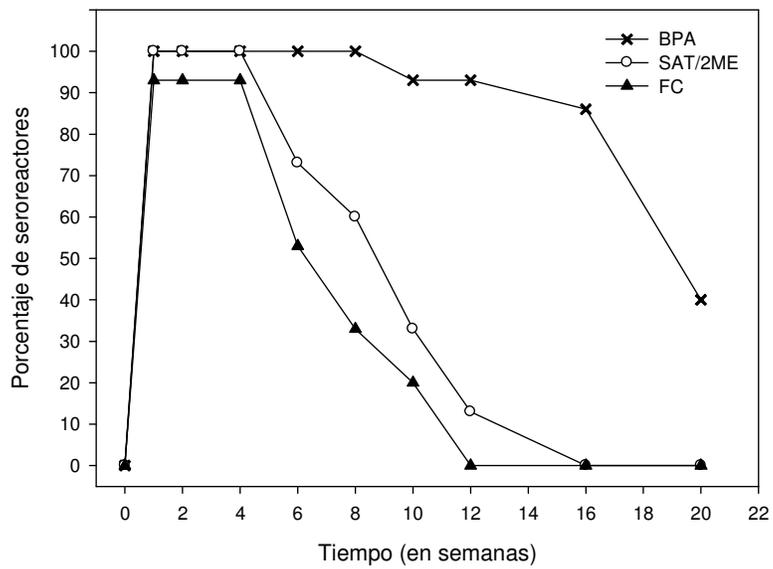
952 **Figura 1:** Proporción de muestras de suero positivas a las pruebas de BPA, SAT/2ME y FC  
953 en terneras vacunadas con M1-*luc* (Grupo 1).



954

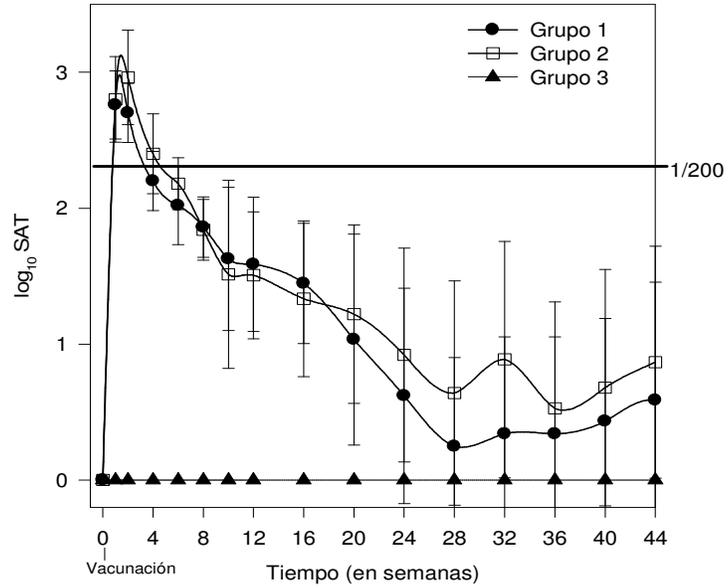
955

956 **Figura 2:** Proporción de muestras de suero positivas a las pruebas de BPA, SAT/2ME y FC  
957 en terneras vacunadas con S19 (Grupo 2).



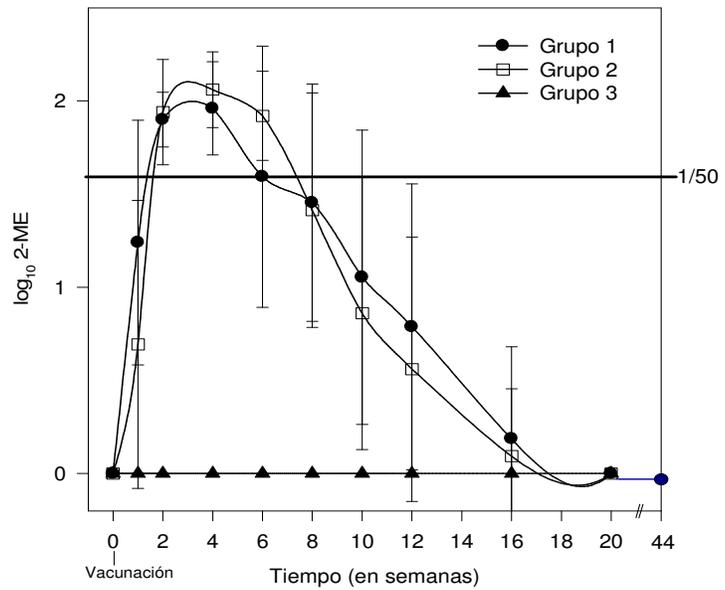
958

959 **Figura 3:** Respuesta serológica posvacunación en vaquillonas de los grupos 1, 2 y 3 a la  
 960 prueba de SAT (media y desvío estándar).



961

962 **Figura 4:** Respuesta serológica posvacunación en vaquillonas de los grupos 1, 2 y 3 a la  
 963 prueba de 2-ME (media y desvío estándar).



964

965 5.3.1.2. Hemocultivos: La cepa S19 no fue recuperada a partir de los hemocultivos realizados  
966 en los animales del Grupo 1. Sin embargo *B. abortus* M1-luc fue aislada a partir de los  
967 hemocultivos de dos terneras del Grupo 2 en los muestreos realizados los días 1 y 7 PV,  
968 respectivamente, siendo esta diferencia con el Grupo 1 y 3 no significativa ( $p>0.05$ ). Las  
969 cepas aisladas mantuvieron el fenotipo y los marcadores genéticos de la cepa inoculada. No se  
970 aislaron cepas de *Brucella* en los muestreos de los días 3 y 14 PV en ninguno de los grupos  
971 vacunados.

972 5.3.1.3. Servicio: Previo y durante el servicio todas las vaquillonas mantuvieron una adecuada  
973 condición corporal (score 6). Luego de 45 días de servicio natural, la preñez fue confirmada  
974 por ecografía y posterior tacto transrectal en 37/45 animales. Los grupos experimentales  
975 quedaron entonces constituidos de la siguiente manera: Grupo 1: n= 14 vaquillonas; Grupo 2:  
976 n=11 vaquillonas y Grupo 3: n= 12 vaquillonas.

977

## 978 **5.3.2. SEGUNDA ETAPA**

979 5.3.2.1. Desafío: Al momento del desafío 3/14 vaquillonas del Grupo 1 y 3/11 de las del  
980 Grupo 2, presentaron reacciones positivas a BPA y títulos residuales bajos a la prueba de  
981 SAT, pero fueron negativas tanto a 2-ME como a la FC (Fig. 5).

982 La dosis de desafío estuvo dentro de los rangos esperados, siendo la dosis total  
983 inoculada a cada animal de  $5 \times 10^7$  UFC.

984 5.3.2.2. Serología: A los 39 días PD el 50% de los animales del grupo 3 fueron positivos a las  
985 pruebas serológicas clásicas y este porcentaje fue aumentando paulatinamente. Al finalizar el  
986 ensayo a los 126 días PD la incidencia acumulativa de infección en vacas en los grupos  
987 vacunados fue del 50% (7/14) para el Grupo 1 y del 45% (5/11) para el Grupo 2, mientras que

988 en el Grupo 3 (controles sin vacunar) la incidencia de infección en las vaquillonas fue del  
989 92% (11/12) (Fig. 5).

990 En cuanto a la respuesta anti BP26 PD presentó grandes variaciones individuales en  
991 las fechas evaluadas. No encontrándose una correlación entre animal infectado y título en  
992 ELISA anti BP26. Cuando se analizaron los sueros obtenidos a los 126 días PD, la  
993 sensibilidad obtenida fue del 45,4% y la especificidad del 84,6%, con un área bajo la curva  
994 ROC de 0,6014 (IC= 0.4133 - 0.7895) con un valor de corte para el ensayo de PP= 9.2 (Fig. 6  
995 y 7).

996 Los sueros de este mismo muestreo fueron analizados de manera complementaria por  
997 la técnica de FPA. Los resultados de dicha técnica fueron coincidentes con los resultados de  
998 FC en todos los sueros de los grupos 1 y 3. Sin embargo, dos animales del grupo 2 (N° 36 y  
999 37) resultaron negativos a la FC y positivos al FPA, uno de dichos animales fue positivo  
1000 también al aislamiento.

1001 5.3.2.3. Hemocultivos: La cepa utilizada para el desafío no pudo ser recuperada a partir de los  
1002 hemocultivos por problemas de contaminación el día del muestreo.

1003 5.3.2.4. Pérdidas reproductivas: El tiempo promedio transcurrido entre el desafío y el aborto o  
1004 parto en los diferentes grupos fue de 100.5, 98.4 y 74.3 días para los grupos 1, 2 y 3  
1005 respectivamente. La comparación de medias de los días transcurridos entre el desafío y el  
1006 parto y aborto arrojó diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 versus el grupo 3 control  
1007 sin vacunar ( $p < 0.0009$ ).

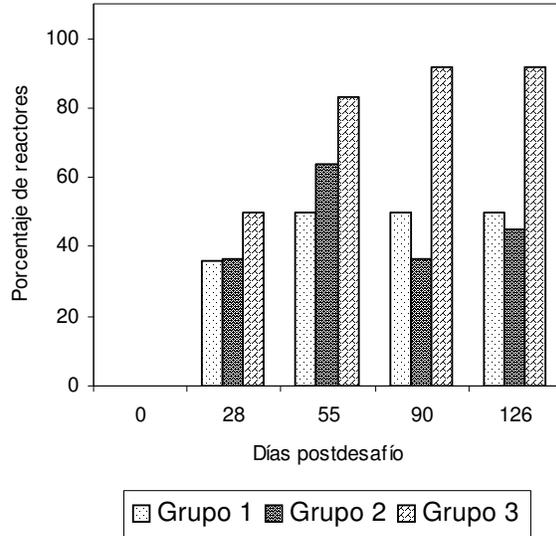
1008

1009

1010

1011

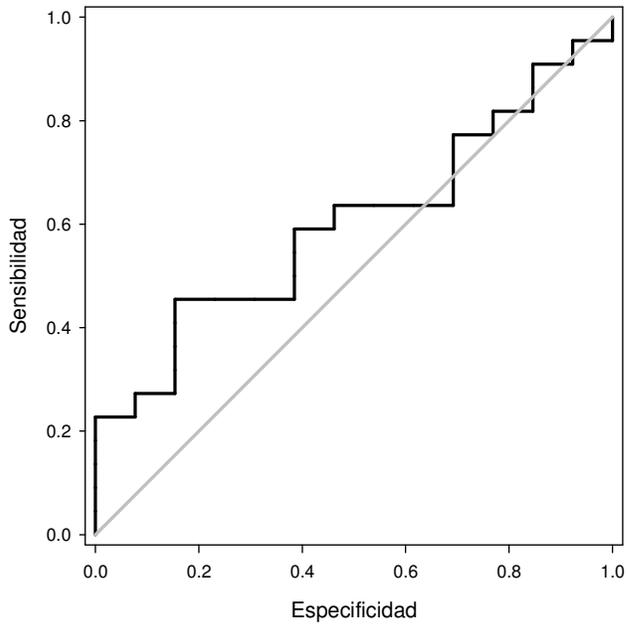
1012 **Figura 5:** Porcentaje de seroreactores positivos a las pruebas de SAT, 2-ME y FC en las  
 1013 vaquillonas luego del desafío con *Brucella abortus* 2308.



1014

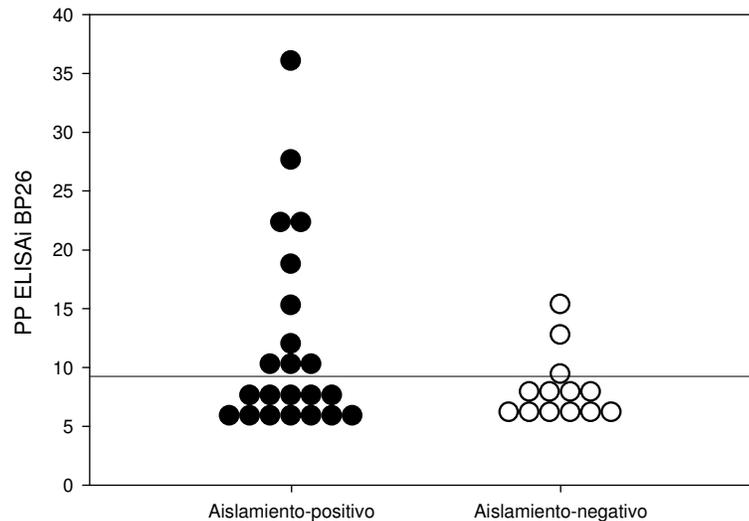
1015 **Figura 6:** Análisis de la curva ROC del ELISAI antiBP26 realizado con los sueros obtenidos  
 1016 a los 4 meses posdesafío.

1017



1018

1019 **Figura 7:** Frecuencia de muestras positivas y negativas al ELISAI antiBP26 en los sueros  
 1020 tomados a los 4 meses posdesafío.



1021

1022

1023 La tasa de protección contra pérdidas reproductivas fue del 78,6% y 81,8% para los  
 1024 Grupos vacunados 1 y 2, respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre ambos  
 1025 grupos ( $p>0.05$ ). En el Grupo 3 solo un 25% de los terneros fueron viables, existiendo una  
 1026 diferencia significativa con los terneros logrados en ambos grupos vacunados ( $p<0.02$ ) (Tabla  
 1027 2). De 2/3 de los animales que parieron terneros viables del grupo control sin vacunar, *B.*  
 1028 *abortus* fue aislada a partir de las muestras de mucus cervico vaginal y calostro, presentando  
 1029 ambas además títulos serológicos positivos a las pruebas de BPA, SAT, 2-ME y FC. El  
 1030 animal restante presentó títulos serológicos positivos temporarios luego del desafío,  
 1031 posteriormente se negativizó a todas las pruebas, *B. abortus* no fue aislada de ninguno de sus  
 1032 fluidos y parió un ternero sano. De 2/3 vaquillonas abortadas del grupo 1 *B. abortus* fue  
 1033 aislada de mucus cervico-vaginal y calostro pero no pudo ser recuperada de los tejidos fetales.

1034 Se tomaron muestras de sangre antes de que 5/13, 6/11, 6/10 terneros tomen calostro,  
1035 los animales pertenecían a los grupos 1, 2 y 3, respectivamente. Una proporción de estos  
1036 animales murió dentro de los 7 días de nacidos y *B. abortus* fue aislada de sus tejidos. Los  
1037 sueros fueron procesados por la técnica de FC y tanto los resultados como los detalles de  
1038 viabilidad de los terneros y aislamientos y serología de sus madres se observan en la Tabla 3.

1039 5.3.2.5. Cultivo bacteriológico: La frecuencia de aislamientos de *B. abortus* en las muestras  
1040 de leche/calostro y mucus cervico vaginal de las vacas y placentas luego del desafío con *B.*  
1041 *abortus* 2304 es resumida en la Tabla 4. Mientras que, la frecuencia de aislamientos a partir  
1042 de las muestras de fetos y terneros no viables se resumen en la Tabla 5. Los aislamientos de *B.*  
1043 *abortus* obtenidos de todos los fetos/terneros no viables y vacas se correspondieron con la  
1044 cepa de desafío, en ninguno de los casos fueron recuperadas las cepas vacunales. Las  
1045 bacterias aisladas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa,  
1046 citrato, reducción de nitratos, producción de sulfhídrico y ureasa), aglutinación con acriflavina  
1047 y PCR con *primers* para *bp26* y western blot contra BP26 (datos no mostrados).

1048 5.3.2.6. Histopatología e inmunohistoquímica: La frecuencia de alteraciones histopatológicas  
1049 observadas en fetos/terneros no viables es resumida en la Tabla 5. La presencia de  
1050 bronconeumonía severa o neumonía intersticial de distribución multifocal fueron los cambios  
1051 histopatológicos observados con mayor frecuencia (Fig. 8). La lesiones estuvieron  
1052 compuestas por un infiltrado de tipo mixto, con la presencia de macrófagos, linfocitos y  
1053 neutrófilos, acompañado en algunas ocasiones de edema y hemorragia. Otro de los hallazgos  
1054 frecuentes fue la presencia de placentitis necrotizante aguda, difusa de grado leve a moderada,  
1055 acompañada de vasculitis. En 4 animales del grupo 3 se presentó meningitis leve a moderada  
1056 con infiltrado de células mononucleares (Fig. 9), sin embargo las lesiones a nivel sistema  
1057 nervioso central no se presentaron en los fetos/terneros no logrados hijos de las vaquillonas de

1058 los grupos 1 y 2. En los cortes de bazo las lesiones fueron similares en los animales de los  
1059 diferentes grupos consistiendo en congestión y respuesta folicular que varió de leve a  
1060 moderada (Fig. 9). En riñones las alteraciones observadas se caracterizaron por congestión  
1061 medular o corticomedular cuyo grado varió de leve a moderada y nefritis intersticial no  
1062 supurativas leves a moderadas ubicadas con mayor frecuencia en la corteza o  
1063 subcapsularmente. En hígado los cambios fueron de tipo degenerativos en la mayoría de los  
1064 animales, con degeneración grasa centrolobulillar leve a moderada, presentando hepatitis  
1065 periportal no supurativa leve un animal en cada uno de los grupos (Fig. 9). A nivel de los  
1066 linfonódulos mesentéricos: en todos los grupos se observó hiperplasia cortical, de moderada a  
1067 severa (Fig. 9). En glándula adrenal, las lesiones encontradas consistieron básicamente en  
1068 congestión cortical o corticomedular, hemorragias leves o moderadas en corteza, presentando  
1069 un animal del grupo 3 hemorragia leve y exudado inflamatorio en el conectivo adyacente. Los  
1070 animales del grupo 2 no presentaron cambios a nivel cardíaco, los cuales sí estuvieron  
1071 presentes en los animales de los grupos 1 y 3 donde las lesiones encontradas consistieron en:  
1072 epicarditis o pericarditis leves a moderadas no supurativas.

1073         Mediante la prueba de IHQ se evidenció la presencia de inmuno-tinción específica de  
1074 *Brucella* en los cortes de pulmón (Tabla 3) y placenta (Tabla 4 y Fig. 8). Una reacción  
1075 positiva a la IHQ se presentó en una sección de pulmón de un feto hijo de una vaca del grupo  
1076 1 del cual no pudo ser recuperada la cepa de desafío comprobando la infección en la vaca que  
1077 eliminó *B. abortus* en leche. En cuanto a la IHQ de los cortes de placenta los resultados  
1078 obtenidos en las muestras del grupo 3 coinciden con la frecuencia de aislamientos de *B.*  
1079 *abortus*. Sin embargo, en los grupos 1 y 2 se encontraron discrepancias entre los resultados de  
1080 los aislamientos y la IHQ. Dos placentas del grupo 1 y tres del grupo 2 presentaron  
1081 inmunoreacción positiva, siendo las vacas negativas al aislamiento de *B. abortus* a partir de

1082 todas las muestras recuperadas y no teniendo tampoco evidencia serológica de infección a lo  
 1083 largo del ensayo.

1084

1085 **Tabla 2:** Abortos o pérdidas neonatales y porcentaje de terneros logrados de vaquillonas de  
 1086 los grupos vacunados y control sin vacunar luego del desafío con *B. abortus* 2308.

	Aborto	Pérdidas neonatales	Terneros logrados (%)
Grupo 1	1	2	11 (78.6)
Grupo 2	0	2	9 (81.1)
Grupo 3	2	7	3 (25)

1087

1088

1089 **Tabla 3:** Comparación entre la serología previa al calostrado (prueba de FC) y los  
 1090 aislamientos en los terneros nacidos vivos y sus madres.

	Ternero N°	FC	Aislamiento <i>B. abortus</i> *	Madre	
				Serología	Aislamiento <i>B. abortus</i> **
Grupo 1	19	-	+	+	NR
	23	-	NR	+	+
	24	-	NR	-	-
	55	-	+	+	+
	58	-	NR	-	-
Grupo 2	1	-	+	+	+
	3	-	NR	+	-
	35	-	NR	-	-
	38	-	-	+	+
	41	-	-	-	+
	43	-	-	-	-
Grupo 3	15	-	+	+	+
	16	+	+	+	+
	27	-	+	+	+
	28	-	-	+	+
	30	-	+	+	+
	34	-	+	+	+

1091

1092 **Tabla 4:** Frecuencia de aislamiento de *B. abortus* (muestras de calostro/leche, mucus cervico  
 1093 vaginal y placenta) e inmunohistoquímica de placenta de las vaquillonas luego del desafío con  
 1094 *B. abortus* 2308.

Grupo	Aislamientos			IHQ
	Calostro	MCV	Placenta	Placentas positivas
Grupo 1	3/14	6/14	1/5	<sup>3</sup> / <sub>4</sub>
Grupo 2	2/11	3/12	1/6	4/6
Grupo 3	9/12	11/12	9/10	6/7

1095

1096

1097 **Tabla 5:** Frecuencia de cultivos positivos, inmunohistoquímica positiva y lesiones  
 1098 histopatológicas en fetos y terneros no viables.

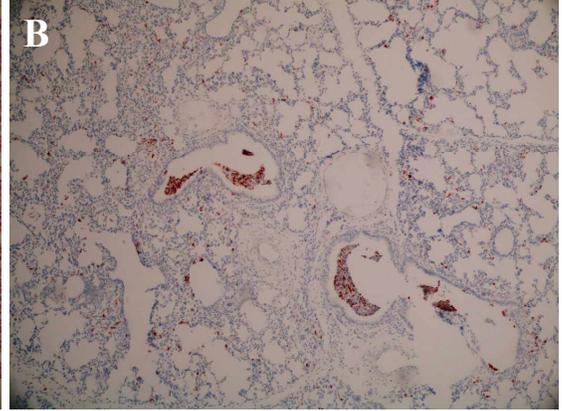
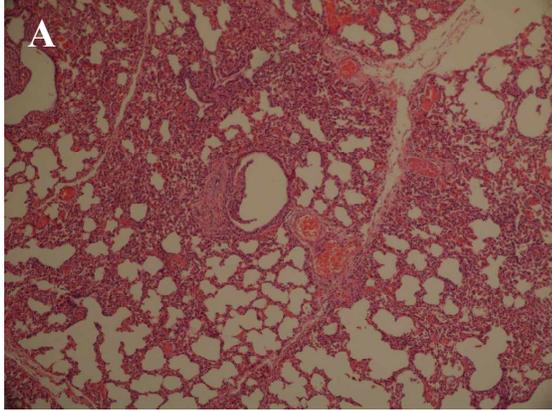
Cultivo positivo	IHQ	Lesiones en tejidos						
	Pulmones positivos	Pulmón	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Cerebro	
Grupo 1	1/3	2/3	3/3	3/3	1/2	1/3	1/3	0/3
Grupo 2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
Grupo 3	9/9	8/9	9/9	7/9	6/9	4/9	5/9	4/9

1099

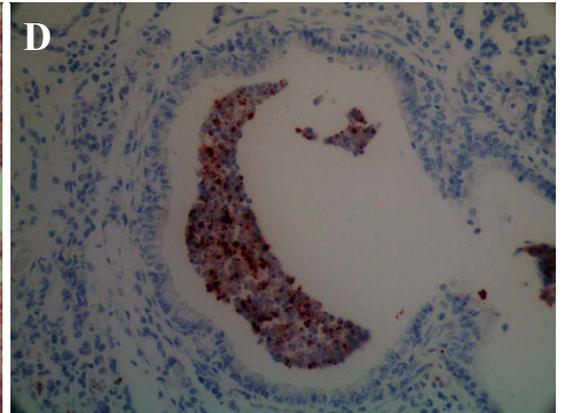
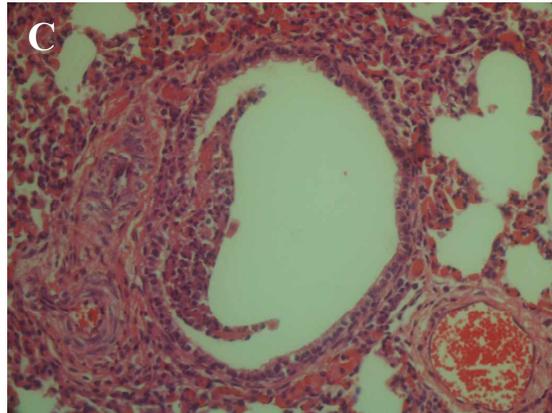
1100

1101 **Figura 8:** Histopatología e inmunohistoquímica en cortes de pulmones de fetos/terneros no  
1102 viables y de placentas con aislamiento de *B. abortus*.

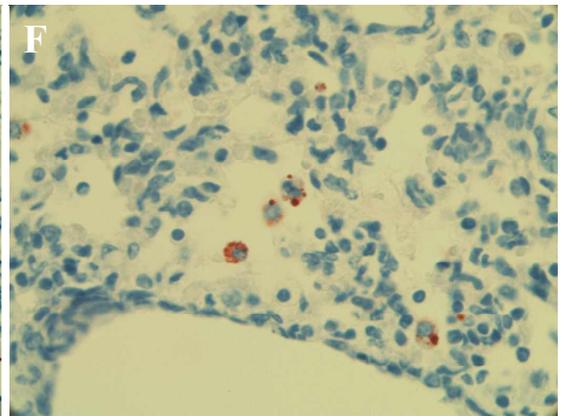
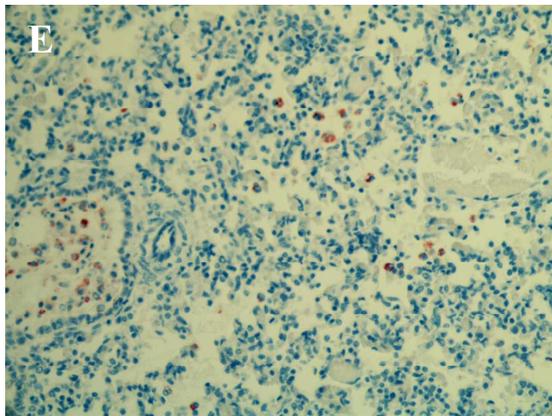
1103



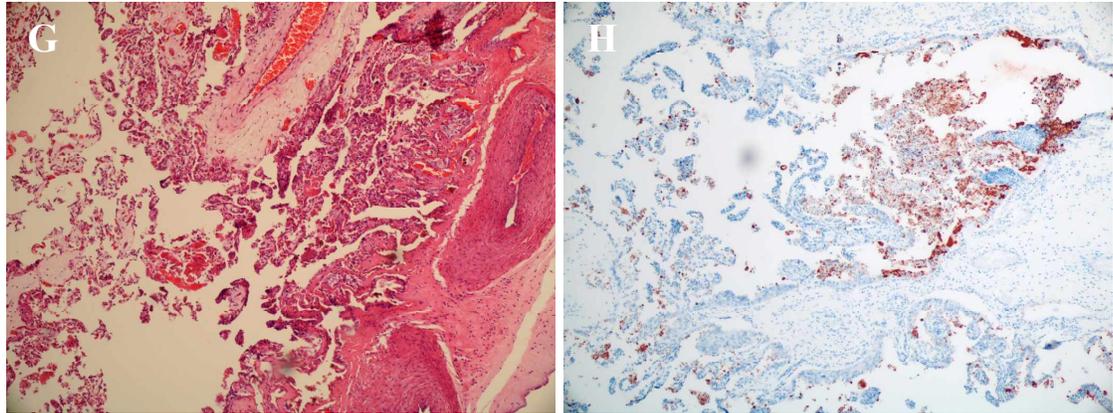
1104



1105



1106



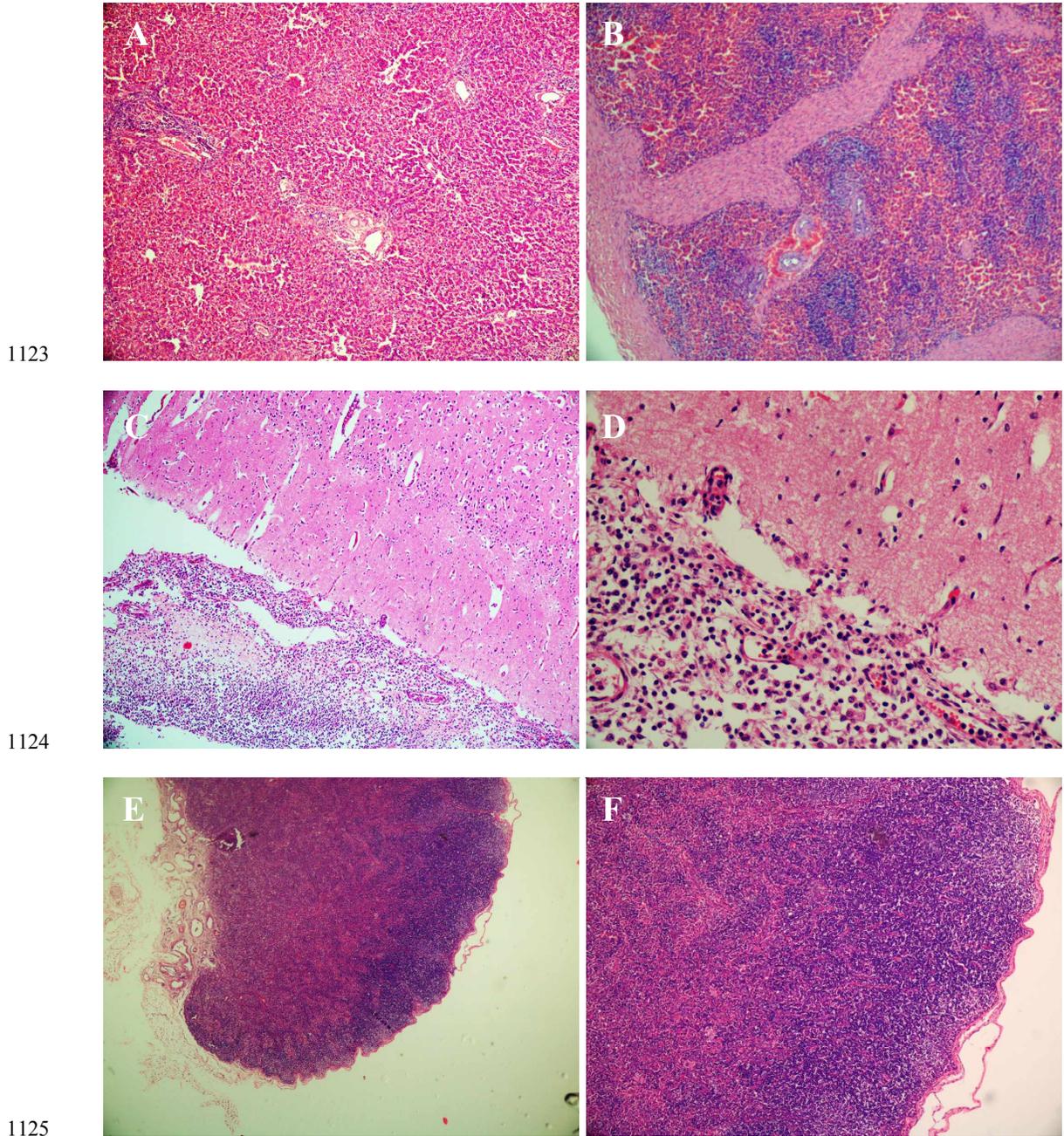
1107

1108

1109 A- Ternero prematuro de 1 día de vida: bronconeumía y neumonía intersticial severas,  
 1110 congestión, hemorragia a nivel intersticial y áreas enfisematosas. HE 10x. B- El mismo  
 1111 animal de la fotografía A, presencia de brucelas en el exudado acumulado en la luz de  
 1112 bronquios y bronquiolos y en el tejido intersticial. IH 10x. C- Detalle de la fotografía A,  
 1113 bronconeumonía supurativa severa presencia de neutrófilos en el exudado de la luz del  
 1114 bronquio detalle de la fotografía A, HE 40x. D- Con mayor detalle brucelas en la luz  
 1115 bronquial del feto de la fotografía A, IH 40x. E y F – Feto: presencia de brucelas en el  
 1116 intersticio de un pulmón con neumonía intersticial, nótese la disposición dentro de células  
 1117 mononucleares (macrófagos) IH 10x y 40x, respectivamente. G- Placenta de la vaca N°28 del  
 1118 grupo 3, Placentitis necrotizante, HE 10x. B- Del mismo animal de la foto anterior brucelas  
 1119 en áreas necróticas. IH 10x.

1120

1121 **Figura 9:** Lesiones histopatológicas halladas en fetos/terneros no viables con aislamiento de  
1122 *B. abortus*.



1126 A- Ternero prematuro de 8 meses, hepatitis periportal no supurativa leve, congestión y  
1127 degeneración grasa moderada, HE 10x. B- Ternero de 1 día de vida, bazo marcada respuesta  
1128 linfoidea y congestión. C- Feto 7 meses, meningitis proliferativa supurativa, HE 10x. D- Del

1129 mismo animal de la foto E, detalle del infiltrado celular mixto con predominancia de  
 1130 mononucleares, HE 40x. E y F- Ternero de 1 día de vida, linfonódulo con hiperplasia cortical,  
 1131 HE 4x y 10x, respectivamente.

1132

1133 5.3.2.7. Análisis de Riesgo Relativo: Los datos correspondientes a la fracción atribuible en el  
 1134 grupo expuesto y el riesgo relativo en los controles versus las vaquillonas vacunadas es  
 1135 mostrado en la Tabla 6. Los resultados del riesgo relativo muestran que las vaquillonas no  
 1136 vacunadas tuvieron 3,5 veces mayor riesgo de abortar que las de los Grupos 1 y 4,1 veces  
 1137 mayor riesgo de abortar que las del Grupo 2. Si la fracción atribuible es interpretada como  
 1138 una fracción de prevención, entonces podemos decir que la vacunación con M1-*luc* (Grupo 2)  
 1139 previno el 75,8% de los abortos y el 50,4% de la infección en vaquillonas. Mientras que la  
 1140 vacunación con S19 (Grupo 1) previno el 71,4% de los abortos y el 45,5% de la infección en  
 1141 vaquillonas.

1142

1143 **Tabla 6:** Fracción atribuible en el grupo expuesto (Grupo 3 no vacunado) y riesgo relativo de  
 1144 aborto e infección en las vaquillonas del grupo no vacunado vs. los grupos vacunados 1 y 2.

		Fracción atribuible en el	Riesgo	Intervalo de
		grupo no vacunado	Relativo	Confianza 95%
Grupo 1	Aborto	0.714	3.500	1.219-10.050
	Infección	0.455	1.833	1.057-3.181
Grupo 2	Aborto	0.758	4.125	1.129-15.070
	Infección	0.504	2.017	1.032-3.939

1145

1146

1147 **5.3.3. TERCERA ETAPA**

1148 Al momento del segundo servicio 4/11 de animales presentaban títulos a las pruebas de BPA,  
1149 SAT, 2ME y FC, y así permanecieron hasta culminada esta etapa. El resto de los animales  
1150 fueron negativos incluso el animal N° 61 que había resultado positivo a la serología clásica al  
1151 culminar la segunda etapa, aunque sin aislamiento bacteriológico. En cuanto al ELISA  
1152 antiBP26, solamente 2 de los 4 reaccionantes a las pruebas clásicas fueron positivos también a  
1153 esta prueba con OD<sub>450</sub> de 0.215 (animal N° 19) y 0.115 (animal N° 55), los animales N° 19 y  
1154 55, Todas los animales recibieron servicio con un toro Aberdeen Angus negativo a brucelosis  
1155 que conservó su estatus de sano una vez terminado el servicio de 45 días. Llegado el momento  
1156 de la parición todas las hembras parieron normalmente terneros sanos que llegaron a la edad  
1157 de destete en buenas condiciones.

1158

#### 1159 **5.4. DISCUSIÓN**

1160 En la presente sección se logró determinar la capacidad protectora de la cepa M-1*luc*  
1161 en relación a la cepa S19 en hembras bovinas vacunadas cuando terneras y desafiadas entre  
1162 los 5 y 6 meses de preñez con la cepa de *B. abortus* 2308.

1163 La evaluación de vacunas de brucelosis en los huéspedes naturales se realiza  
1164 normalmente usando protocolos de desafíos estandarizados, con animales mantenidos en  
1165 boxes de aislamiento donde los hallazgos clínicos, bacteriológicos y serológicos pueden ser  
1166 evaluados de manera adecuada (214). Los ensayos realizados a campo dan una perspectiva  
1167 más real de la performance que podría tener la vacuna al ser aplicada en un establecimiento  
1168 con problemas. En el presente trabajo se buscó un punto intermedio entre ambos tipos de  
1169 ensayos, manteniendo los animales de los diferentes grupos juntos y bajo condiciones de  
1170 campo hasta el momento del desafío. Llegado dicho momento, los animales se trasladaron a  
1171 un campo experimental de SENASA que permitió separar los grupos manteniendo  
1172 condiciones similares a las de campo pero estrictamente controladas.

1173 Al evaluar la respuesta inmune humoral, en la primera etapa PV, la proporción de  
1174 animales positivos y la cinética de evolución de los anticuerpos anti LPS fue similar en ambos  
1175 grupos vacunados, lo que confirma que la estructura de este antígeno no se vio afectada en la  
1176 mutante M1-*luc*. Para ambos grupos vacunados, cuando la prueba utilizada fue la SAT el pico  
1177 de anticuerpos se presentó a los 15 días PV indicando la presencia de IgM e IgG, siendo estos  
1178 resultados concordantes con los observados por Cheville *et al.* (178). Por otro lado, cuando la  
1179 prueba realizada fue la de 2ME el pico de anticuerpos se presentó entre la semana 2 y 4 PV,  
1180 debido a la capacidad del 2ME de romper los puentes disulfuro de la IgM y hacerla no  
1181 aglutinante detectando sólo la presencia de IgG. En cuanto a la proporción de animales  
1182 positivos PV fue similar a la registrada previamente por otros autores (215). Sin embargo, la

1183 disminución de dicha proporción se presentó de manera más temprana, (a partir de la 4ta y 6ta  
1184 semana PV para las pruebas de SAT/2ME y FC, respectivamente) que en los ensayos  
1185 realizados por los autores antes nombrados registraron la disminución a partir de la semana 8  
1186 PV. En el presente trabajo a las 12 semanas PV el 100% de los animales de ambos grupos  
1187 vacunados resultaron negativos a la prueba de FC. Esta metabolización de las IgG PV resulta  
1188 algo temprana en comparación con la observada por otros autores, quienes indican que en  
1189 animales *Bos taurus* la mayoría de las IgG desaparecen entre los 6 y 8 meses PV (21, 23,  
1190 216).

1191 La segunda etapa del trabajo comenzó con el desafío vía conjuntival con una cepa de  
1192 patogenicidad reconocida de los animales preñados. Si bien no existe una estandarización de  
1193 los pasos a seguir en la evaluación de vacunas para brucelosis bovina, la vía de desafío  
1194 utilizada por la gran parte de las publicaciones es la vía conjuntival por ser una de las vías  
1195 normales de infección (217). Luego de la aplicación se tópica en la conjuntiva las cepas  
1196 patógenas atraviesan la conjuntiva y llegan a través de los vasos linfáticos a los linfonódulos  
1197 parotídeos y subsecuentemente a los linfonódulos craneales antes de expandirse a otros tejidos  
1198 linfoides periféricos, a los 21 días de la exposición conjuntival *Brucella* es encontrada en  
1199 múltiples órganos (218).

1200 Estudios previos indican que una dosis conjuntival que se encuentre en un rango de  
1201 entre  $10^3$  y  $10^9$  UFC de *B. abortus* es capaz de causar infección en bovinos (219, 220). En el  
1202 presente trabajo, la dosis de utilizada para el desafío fue de  $5 \times 10^7$  y estuvo dentro del rango  
1203 de las utilizadas en trabajos previos de evaluación de vacunas de brucelosis en bovinos (178,  
1204 214). Los animales de cada grupo permanecieron juntos desde el momento del desafío y hasta  
1205 la culminación del trabajo, esta situación pudo provocar un desafío mayor generado por alta  
1206 tasa de contacto de los animales con los materiales abortados. Sin embargo, a pesar de que

1207 esto pudo haber ocurrido, la protección frente a pérdidas reproductivas conferida por M1-*luc*  
1208 (81,8%) fue buena y similar a la conferida por S19 (78,6%). Por otro lado, en el grupo control  
1209 no vacunado solamente el 25% de los animales parieron terneros viables. El número de  
1210 abortos observado en el grupo control no vacunado coincide con los reportes previos  
1211 realizados por otros autores que también utilizaron como cepa de desafío *B. abortus* 2308  
1212 (169, 178). En brucelosis la protección contra el aborto se traduce en una disminución de las  
1213 pérdidas directas ocasionadas por la enfermedad, mientras que la protección contra la  
1214 infección se traduce en una disminución del riesgo de contraer brucelosis para otros animales  
1215 y el hombre. En cuanto a este último punto, en el presente trabajo no se observaron  
1216 diferencias entre los grupos vacunados, siendo el porcentaje de animales protegidos del 63,7%  
1217 para M1-*luc* y del 57,2% para S19. En el grupo control no vacunado 11/12 animales se  
1218 infectaron, situación que se asemeja a la citada como ideal previamente por otros autores y  
1219 que por lo tanto valida los resultados obtenidos en los grupos vacunados (217).

1220       En cuanto a las lesiones encontradas en los fetos y terneros no viables infectados con  
1221 aislamiento de *B. abortus*, tanto las halladas a la necropsia como los cambios histopatológicos  
1222 fueron similares a los descritos previamente por otros autores en infecciones experimentales  
1223 y naturales (93, 144, 221). Las lesiones histopatológicas a nivel pulmonar estuvieron  
1224 presentes en todos los fetos con aislamiento de *B. abortus*. La presencia de un exudado de tipo  
1225 supurativo con predominancia de neutrófilos ha sido reportada previamente en fetos con  
1226 aislamiento de *B. abortus* (222), sin embargo en el presente trabajo tanto las bronquitis como  
1227 las bronconeumonías se caracterizaron por presentar un infiltrado de tipo mononuclear de  
1228 manera predominante. La pleuritis fibrinosa fue una lesión encontrada solamente en algunos  
1229 fetos infectados así también como la presencia de meconio en pulmones, concordando con lo  
1230 descrito previamente (142, 144). La placentitis necrótica que afectó la profundidad de las

1231 vellocidades también ha sido descripta en trabajos previos en bovinos y en ovinos (142, 223)  
1232 con brucelosis. Sin embargo, la presencia de neutrófilos en el presente trabajo fue encontrada  
1233 solamente en 2 placentas, en contraposición a otros autores que describen la presencia de este  
1234 tipo celular como un hallazgo frecuente (142). Las diferencias encontradas podrían deberse a  
1235 diferentes condiciones en los trabajos realizados, ya que en los trabajos realizados aquellos  
1236 autores los animales fueron inoculados entre los 6 y 7 meses de preñez, en tanto que, las  
1237 lesiones descritas por Pérez *et al.* (222) fueron observadas en pulmones de animales  
1238 infectados naturalmente.

1239         Los resultados de la inmunohistoquímica de tejidos son similares a los publicados  
1240 previamente en trabajos en bovinos, cabras, ovejas y ratones infectados con *B. abortus*. A  
1241 nivel placentario los microorganismos fueron detectados extracelularmente en los tejidos  
1242 necróticos e intracelularmente en macrófagos y mononucleares del trofoblasto (221, 222, 223,  
1243 224). Esta localización es una característica de las infecciones por *Brucella*, los miembros de  
1244 este género son patógenos intracelulares facultativos que se introducen en células fagocíticas  
1245 como los neutrófilos, macrófagos y células del trofoblasto inhibiendo los mecanismos de lisis  
1246 de estos fagocitos profesionales y haciendo del compartimiento intracelular su lugar de  
1247 supervivencia y replicación (225). Sin embargo, se presentaron algunos resultados  
1248 discordantes entre la inmunohistoquímica y los aislamientos en las muestras de placenta,  
1249 éstos podrían ser consecuencia de los altos niveles de contaminación que se observaron en  
1250 este tejidos que dificultan el aislamiento de *B. abortus*. Sin embargo, los animales con  
1251 inmunohistoquímica positiva en placenta y negativos al aislamientos fueron también  
1252 negativos a las pruebas serológicas clásicas situación que podría sugerir que en realidad se  
1253 trataría de animales no infectados con resultados de IHQ falsos positivos.

1254 El aborto en la infección por *B. abortus* no es provocado por la gravedad de las  
1255 lesiones a nivel fetal sino la falta de oxígeno y nutrientes al feto ocasionada por las lesiones en  
1256 la placenta en las últimas etapas de la gestación (144, 145). Por este motivo *B. abortus* ha sido  
1257 aislada de tejidos fetales caprinos sin cambios histopatológicos en trabajos donde las cabras  
1258 preñadas fueron infectadas (226). Aparentemente, la infección fetal es el resultado de la  
1259 aspiración del líquido amniótico que contiene *B. abortus* y este proceso sería exacerbado por  
1260 la anoxia secundaria a la placentitis. Tras la invasión a través de las vías respiratorias, la  
1261 bacteria puede producir bacteremia y difundir vía hematológica a otros órganos (144). Las  
1262 graves lesiones a nivel placentario pudieron haber sido la causa de encontrar sólo en 1/8  
1263 terneros infectados respuesta serológica positiva. Tampoco pudo ser comprobada la respuesta  
1264 humoral al LPS en el líquido exudado a la cavidad abdominal de 5 fetos necropsiados con  
1265 aislamiento de *B. abortus* (datos no presentados). La respuesta inmune humoral contra *B.*  
1266 *abortus* ha sido detectada por otros autores mediante la prueba de tarjeta o la aglutinación en  
1267 placa en fetos bovinos de más de 6 meses gestación. Sin embargo, en estos trabajos los  
1268 antígenos inoculados eran inactivados o bien la inoculación se realizó directamente sobre los  
1269 fetos (227, 228), de esta manera los daños sobre la placenta no ocurrieron y los fetos tuvieron  
1270 el tiempo suficiente como para poner en marcha los mecanismos necesarios para montar un  
1271 respuesta inmune evidenciable mediante pruebas serológicas.

1272 Los animales vacunados con M1-*luc* y S19 tuvieron menores tasas de aborto e  
1273 infección que los controles no vacunados. De manera coincidente con los resultados obtenidos  
1274 por nuestro grupo en ratones y por otros grupos utilizando otras especies de *Brucella* en  
1275 ensayos en ratones y rumiantes, la pérdida de expresión de BP26 en la cepa S19 no conlleva  
1276 diferencias en la virulencia y en la capacidad de protección de las mutantes respecto de la  
1277 cepa original (41, 186, 229, 230). En el presente trabajo una capacidad protectora similar fue

1278 observada por las cepas S19 y M1-*luc*, indicando que BP26 no es una proteína necesaria para  
1279 el establecimiento de una inmunidad protectora.

1280 De manera ideal, las vacunas mutantes de *Brucella* no deberían inducir anticuerpos  
1281 contra la proteína blanco, la cual entonces podría ser usada para el diagnóstico serológico.  
1282 Esta proteína debería ser además inmunodominante durante la infección para permitir la  
1283 detección del animal infectado. En trabajos previos BP26 ha sido fuertemente reconocida por  
1284 suero de animales infectados, mientras que los animales vacunados con S19 no presentaron  
1285 reacciones o lo hicieron de manera débil (40, 70, 197). En el presente trabajo, ninguna de las  
1286 vaquillonas vacunadas con S19 o M1-*luc* desarrollaron anticuerpos contra BP26 cuando las  
1287 muestras de suero fueron evaluadas con el ELISAI anti BP26. Sin embargo, tanto los grupos  
1288 vacunados como el grupo control fallaron en producir anticuerpos contra BP26 o lo hicieron  
1289 de manera pobre cuando fueron expuestos a la cepa de desafío *B. abortus* 2308. Los  
1290 resultados de la prueba realizada a los 4 meses PD arrojaron una sensibilidad muy baja  
1291 (45,4%) y una especificidad del 84,6%. Estos resultados indican que el ELISAI anti BP26 no  
1292 fue una prueba útil para identificar animales infectados. Este punto será analizado de manera  
1293 más exhaustiva en la conclusión final de este trabajo de tesis.

1294 A modo de conclusión para esta sección, podemos decir que bajo las condiciones del  
1295 presente ensayo la cepa S19 con una delección en el gen *bp26* (M1-*luc*) confiere inmunidad  
1296 contra la infección y el aborto por *B. abortus* en hembras bovinas en la misma medida que lo  
1297 hace la cepa S19 no modificada.

1298

1299

1300

1301

1302

1303

## **ENSAYO 2**

1304

**1305 RESPUESTA INMUNE Y CAPACIDAD PROTECTORA DE UNA CEPA**

**1306 MUTANTE DE *BRUCELLA ABORTUS* S19 EN TOROS ADULTOS**

**1307 DESAFIADOS CON *BRUCELLA ABORTUS* 2308.**

1308

1309

1310

1311

1312

1313

1314

1315

1316

## 1317 **6.1. INTRODUCCIÓN**

1318           Existen numerosos trabajos que han tratado de establecer el rol del toro en la  
1319 introducción de la enfermedad en un rodeo sano. Algunos trabajos han demostrado que los  
1320 toros podrían infectarse a una edad temprana pero que raramente son responsables de la  
1321 introducción o diseminación de la enfermedad en las vacas por servicio natural (24). Sin  
1322 embargo, cuando se realiza inseminación artificial con semen de toros infectados es posible la  
1323 transmisión de la enfermedad, esto ocurre particularmente porque el semen es depositado  
1324 directamente en el útero. Se ha estimado que el semen de un toro infectado podría contener  
1325 entre 100 y 50000 organismos por mililitro (24).

1326           La vacunación en toros con S19 no es recomendada ya que los anticuerpos en suero  
1327 persisten por un mayor tiempo que en las vacas y se ha reportado la localización de la cepa  
1328 vacunal en los genitales de toros vacunados.

1329           Por otro lado, la vacuna de *B. abortus* RB51 está formulada con una cepa rugosa,  
1330 atenuada, desarrollada con el objetivo de superar los problemas de la S19 asociados al  
1331 diagnóstico serológico. Si bien su uso en toros no es recomendado por los fabricantes, en  
1332 contraste con lo que ocurre con la vacuna S19 los estudios referentes al uso de la RB51 en  
1333 toros, si bien son limitados, sugieren que esta vacuna es segura para el uso en machos adultos  
1334 (231, 232, 233). Sin embargo, estos trabajos se han limitado a evaluar el grado de  
1335 colonización y la excreción a través de semen de la cepa PV sin determinar la protección  
1336 otorgada por la misma ante el desafío con una cepa patógena de *B. abortus*.

1337           En cuanto a la cepa mutante M1-*luc* no se han realizado ensayos en machos en el  
1338 modelo ratón ni en el modelo rumiante.

1339           En base a lo expuesto, la presente sección tuvo como objetivo determinar la capacidad  
1340 protectora y/o efectos nocivos en el área genital de la cepa M-1*luc* en toros desafiados con

1341 una cepa de *B. abortus* 2308.

1342

1343 **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS:**

1344 Este trabajo se realizó íntegramente en la Reserva Experimental N°5 de la EEA INTA  
1345 Balcarce.

1346 6.2.1 Selección de animales: Se seleccionaron 24 toros adultos Aberdeen Angus, Hereford o  
1347 sus cruzas, seronegativos a brucelosis. Los animales permanecieron en un solo lote sobre  
1348 pasturas consociadas perennes durante todo el trabajo.

1349 6.2.2. Vacunación: los animales fueron divididos al azar en tres grupos experimentales:

1350 Grupo 1: (n=8) vacunado con *B. abortus* M1-*luc*: por vía SC en el área axilar con 2  
1351 mL de una suspensión de  $3.0 \times 10^6$  UFC, 4 de estos toros recibieron un refuerzo  
1352 vacunal de similar concentración a los 60 días posteriores por la vía conjuntival  
1353 (Grupo 1b).

1354 Grupo 2: (n=6) vacunado con *B. abortus* RB51 comercial (Schering-Plough™) por vía  
1355 SC en el área axilar con 2 mL de una suspensión de  $1-3.4 \times 10^{10}$  UFC.

1356 Grupo 3: (n=8) control sin vacunar.

1357 Se realizó un sangrado previo y las pruebas de rutina para confirmar la negatividad a  
1358 brucelosis.

1359 6.2.3. Serología: Para extracción de los sueros se obtuvo sangre por punción yugular de todos  
1360 los animales en tubos de 10 mL a los 15 días PV y posteriormente cada 15 días hasta los 75  
1361 días PV. Con los sueros obtenidos se realizaron las pruebas serológicas indicadas en el  
1362 apartado 1.1.5. Para esta categoría de animales, y acorde por lo establecido por SENASA, el  
1363 punto de corte considerado fue de  $\geq 1:100$  para SAT y/o de  $\geq 1:25$  para 2-ME.

1364 6.2.4. Muestras de semen: Los días 15, 30, 45, 60 y 75 PV se procedió a la recolección de  
1365 semen o plasma seminal mediante masaje de vesículas seminales. Las muestras de fluidos  
1366 fueron cultivadas por duplicado en placas con ASK, incubadas a 37°C en aerobiosis y en

1367 atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub>, y observadas diariamente durante 7 días. Se realizaron frotis de  
1368 semen o plasma seminal, que fueron teñidos con la técnica de Giemsa para la observación de  
1369 la morfología espermática y la presencia de células inflamatorias.

1370 6.2.5. Inspección clínica: Los días 15, 30, 45, 60 y 75 PV se realizó la evaluación clínico-  
1371 andrológica de todos los animales.

1372 6.2.6. Desafío: Después de desarrollar en AT durante 48 hs a 37°C en una atmósfera con 5%  
1373 de CO<sub>2</sub>, una suspensión salina de la cepa 2308 fue preparada y ajustada a una concentración  
1374 de 3-4 x 10<sup>9</sup> UFC/mL, la cual fue confirmada luego por recuento en placa. A los 90 días PV  
1375 fueron desafiados por vía conjuntival todos los animales vacunados y 6 de los controles con  
1376 *B. abortus* 2308, instilando 100 µL (50µL/ojo) de una suspensión de 3-4 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Dos  
1377 toros del grupo 3 permanecieron como controles negativos sin desafiar (Grupo 3b).

1378 6.2.7. Serología, bacteriología y evaluación andrológica: Siguiendo la metodología antes  
1379 descripta se realizaron muestreos cada 15 días en todos los animales hasta el momento de la  
1380 faena, estimado en el día 180.

1381 6.2.8. Sacrificio: A los 180 días PD se procedió al sacrificio de todos los animales vacunados  
1382 y controles. Se tomaron muestras de glándulas sexuales accesorias, testículos, epidídimos,  
1383 linfonódulos escrotales, y linfonódulos cefálicos para el aislamiento de *B. abortus*. Las  
1384 muestras arribaron al laboratorio dentro de las 3 hs posteriores a su recolección, se cultivaron  
1385 en placas de ASC (Oxoid Ltd, Wad Road, Basingstoke, UK) adicionado con 5% de sangre  
1386 bovina desfibrinada estéril y sobre ASK con antibióticos. Todas las placas fueron incubadas a  
1387 37°C en atmósfera conteniendo 10% CO<sub>2</sub> las primeras y en microaerofilia las segundas y  
1388 examinadas diariamente durante 7 días. Los aislamientos fueron identificados por los  
1389 procedimientos de rutina (34).

1390 Las muestras tomadas para análisis histopatológico incluyeron: epidídimos (cuerpo,  
1391 cabeza y cola), testículo, vesículas seminales, próstata, ampollas del conducto deferente,  
1392 glándula bulbouretral, linfonódulo escrotal. Las muestras fueron fijadas en formol al 10%,  
1393 deshidratadas y embebidas en parafina. Posteriormente los tejidos fueron cortados a 4-5  $\mu\text{m}$  y  
1394 teñidos con hematoxilina-eosina. Se registraron los cambios histológicos y se clasificaron las  
1395 lesiones.

#### 1396 6.2.9. Análisis estadístico de los datos

1397 6.2.9.1. Resultados de las pruebas serológicas: se utilizó la metodología descrita en el  
1398 apartado 5.2.4.1.

1399 6.2.9.2. Análisis de lesiones: se utilizó el Test Exacto de Fisher para comparar la proporción  
1400 de alteraciones en la revisión clínica andrológica y en las lesiones microscópicas  
1401 encontradas en cada grupo de experimental.

1402

1403 **6.3. RESULTADOS**

1404 6.3.1. Posvacunación:

1405 Serología: Todos los animales fueron seronegativos a *B. abortus* al comenzar el  
1406 ensayo. La dosis utilizada para la vacunación estuvo dentro de los rangos esperados en el  
1407 Grupo 2, pero por debajo de la concentración deseada en el Grupo 1 (Tabla 1). Luego de la  
1408 vacunación los toros del grupo 1 presentaron títulos a las pruebas serológicas BPA, SAT y 2-  
1409 ME en el primer muestreo PV realizado a los 15 días. El pico de anticuerpos se presentó a los  
1410 35 días PV, resultando positivos a las pruebas de BPA y SAT/2-ME 4/4 y 2/4 animales de los  
1411 grupos 1a y 1b respectivamente. En la Figura 1 se observa la cinética de evolución de la  
1412 respuesta serológica anti LPS en todos los grupos medida mediante la prueba de SAT. Dicha  
1413 respuesta presentó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) cuando se comparó el grupo  
1414 vacunado con M1-*luc* (grupo 1) con el grupo control (grupo 3). Respecto del grupo  
1415 revacunado con M1-*luc* (grupo 1b) se presentó un pico de anticuerpos PV, el mismo fue de  
1416 menor intensidad y no significativo ( $p > 0.05$ ) al ser comparado con el grupo 3. En cuanto a la  
1417 respuesta anti LPS en la prueba de 2ME, a los 35 días PV el grupo 1 presentó un pico que  
1418 significativamente diferente con la respuesta observada en los grupos 2 y 3 ( $p > 0.05$ ) (Fig. 2).  
1419 La evolución de la cinética de anticuerpos que se presentó en el grupo 1b, no presentó  
1420 diferencias significativas con la observada en los grupos 2 y 3 ( $p > 0.05$ ).

1421 En cuanto a la prueba de FC solamente los dos animales del grupo 1a que presentaron  
1422 los títulos más altos en las pruebas anteriores resultaron sospechosos a esta prueba (ambos  
1423 con 20 UI ambos).

1424 Luego de la segunda dosis con M1-*luc* ninguno de los animales del grupo 1b  
1425 presentaron una elevación en el nivel de anticuerpos evidenciable por las pruebas de BPA,  
1426 SAT, 2ME o FC.

1427 Los toros de los grupos 2 y 3 no evidenciaron títulos serológicos a las pruebas clásicas  
1428 hasta el momento del desafío.

1429 La respuesta serológica anti BP26 PV se presentó muy variable, sin diferencias  
1430 significativas entre grupos ( $p>0.05$ ). A los tres meses PV 2/4, 1/4, 2/6 y 2/8 animales de los  
1431 grupos 1a, 1b, 2 y 3 respectivamente, presentaron  $PP \geq 10$ .

1432 A los 30 días PV una cepa de *B. abortus* fue aislada a partir de plasma seminal de uno  
1433 de los animales del grupo 2 (toro N° 4), confirmándose por bacteriología clásica y PCR que se  
1434 trataba de la cepa vacunal RB51. Del resto de los animales de todos los grupos no hubo  
1435 aislamientos de *B. abortus* PV.

1436

1437 **Tabla 1:** Dosis finales en UFC utilizadas para la vacunación de los toros.

Grupo	Dosis Esperada (en UFC)	Dosis Inoculada (en UFC)
1	$15-30 \times 10^9$	$3 \times 10^6$
2	$1-3.4 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$

1438

1439 No se observaron alteraciones en la revisión clínica andrológica PV en ninguno de  
1440 los grupos. Como así tampoco se observaron alteraciones en la morfología espermática ni  
1441 presencia de células inflamatorias en frotis de semen o plasma seminal.

1442

### 1443 6.3.2. Posdesafío

1444 La dosis de desafío estuvo dentro de los rangos esperados, siendo el total inoculado a  
1445 cada animal de  $3,6 \times 10^8$  UFC.

1446 6.3.2.1. Serología: todos los animales desafiados presentaron en algún momento posdesafío  
1447 serología positiva a las pruebas clásicas realizadas, salvo un animal del grupo 1b. A los 15  
1448 días PD la respuesta anti LPS a la prueba de SAT en los grupos 3 y 2 fue significativamente

1449 mayor ( $p < 0.001$ ) que la observada en los grupos 1 (a y b) y en el control sin desafiar (grupo  
1450 3b). Posteriormente, a los 26 días PD si bien los animales vacunados con M1-*luc* presentaron  
1451 una respuesta anti LPS en la prueba de SAT la misma fue de menor intensidad que la de los  
1452 grupos 2 y 3a, y la diferencia fue no significativa al compararla con el grupo 3b ( $p > 0.05$ ) (Fig.  
1453 1). En cuanto a la producción de anticuerpos anti LPS evidenciada mediante la prueba de  
1454 2ME, a los 15 días PD, del mismo modo que se observó en la prueba de SAT, la respuesta en  
1455 los grupos 3 y 2 fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) que la observada en los grupos 1 (a y  
1456 b) y en el control sin desafiar (grupo 3b). En tanto que a los 26 días PD, todos los grupos  
1457 presentaron respuesta anti LPS, siendo solamente la significativa la diferencia con el grupo  
1458 3b, en los grupos 1a y 3. A partir de los 45 días PD todos los grupos vacunados disminuyeron  
1459 los títulos a 2ME, no así el grupo control 3 (Fig. 2).

1460           Al culminar el ensayo 3/4 animales del grupo 1a fueron serológicamente positivos y  
1461 1/4 sospechosos a las pruebas clásicas BPA, SAT y 2ME. De los animales reaccionantes del  
1462 grupo 1b, 1/3 fue positivo y 2/3 negativos a las mismas pruebas. En tanto que en el grupo 2:  
1463 3/6 toros fueron positivos y 3/6 toros fueron negativos a las pruebas serológicas clásicas  
1464 realizadas, además en este grupo hubo dos reaccionantes positivos a la prueba de FC,  
1465 situación que no se presentó en el resto de los grupos vacunados y desafiados. Al culminar el  
1466 ensayo en el grupo control 3a: 6/6 toros fueron serológicamente positivos a las pruebas de  
1467 BPA, SAT y 2 ME, y 5/6 positivos también a la prueba de FC. Por otro lado, ninguno de los  
1468 controles no vacunados no desafiados (grupo 1b) presentó respuesta a la serológica en  
1469 ninguna de las pruebas clásicas realizadas durante el transcurso del trabajo.

1470           En cuanto a la respuesta anti BP26, todos los animales presentaron baja respuesta al  
1471 ELISAI PD no superando el punto de corte de la prueba, salvo el toro N°2 del grupo 2 que lo  
1472 hizo de manera transitoria y el toro N°9 perteneciente al grupo 3a que a partir de los 75 días

1473 PD presentó un  $DO_{450}$  que superó al del suero utilizado como control positivo (Tabla 2).  
1474 Coincidentemente, este último animal presentó los títulos más altos en las pruebas serológicas  
1475 clásicas.

1476 6.3.2.2. Evaluación andrológica: a partir del mes PD se detectaron alteraciones en la  
1477 revisión clínica genital. Desde este momento y hasta el sacrificio 4/4, 3/4, 4/6 y 3/6 toros de  
1478 los grupos 1a, 1b, 2 y 3a presentaron algún cambio en la clínica genital normal, siendo las  
1479 diferencias entre grupos no significativas ( $p \geq 0.05$ ). Las mismas, se presentaron  
1480 principalmente a nivel de epidídimos y vesículas seminales y se caracterizaron por aumento  
1481 de tamaño y, en el caso de las vesículas seminales, pérdida de lobulaciones. En dos animales  
1482 (un animal del grupo 1a y uno del grupo 1b) se presentaron alteraciones clínicas a nivel  
1483 testicular caracterizadas principalmente por un cambio en la tonicidad de los mismos, en el  
1484 resto de los animales no se registraron cambios en la circunferencia escrotal ni en la tonicidad  
1485 de los testículos a lo largo del ensayo.

1486 6.3.2.3. Aislamientos bacterianos: a los 45 días PD *B. abortus* 2308 fue aislada del fluido  
1487 seminal de un animal del grupo 2 (toro N° 5), del resto de los animales no se obtuvieron  
1488 cultivos positivos a partir de las muestras de semen. En cuanto a los cultivos realizados *pos*  
1489 *morten* a partir de las muestras obtenidas en el frigorífico, *B. abortus* 2308 fue aislada a partir  
1490 de linfonódulo escrotal del mismo animal del grupo 2, siendo el resto de las muestras  
1491 procesadas negativas.

1492 En el examen macroscópico *posmorten* se observaron alteraciones leves como la  
1493 presencia de adherencias entre la túnica vaginal a nivel testicular o de cola y cuerpos de  
1494 epidídimos y en un animal aumento del tamaño de las vesículas seminales con pérdida de  
1495 lobulaciones.

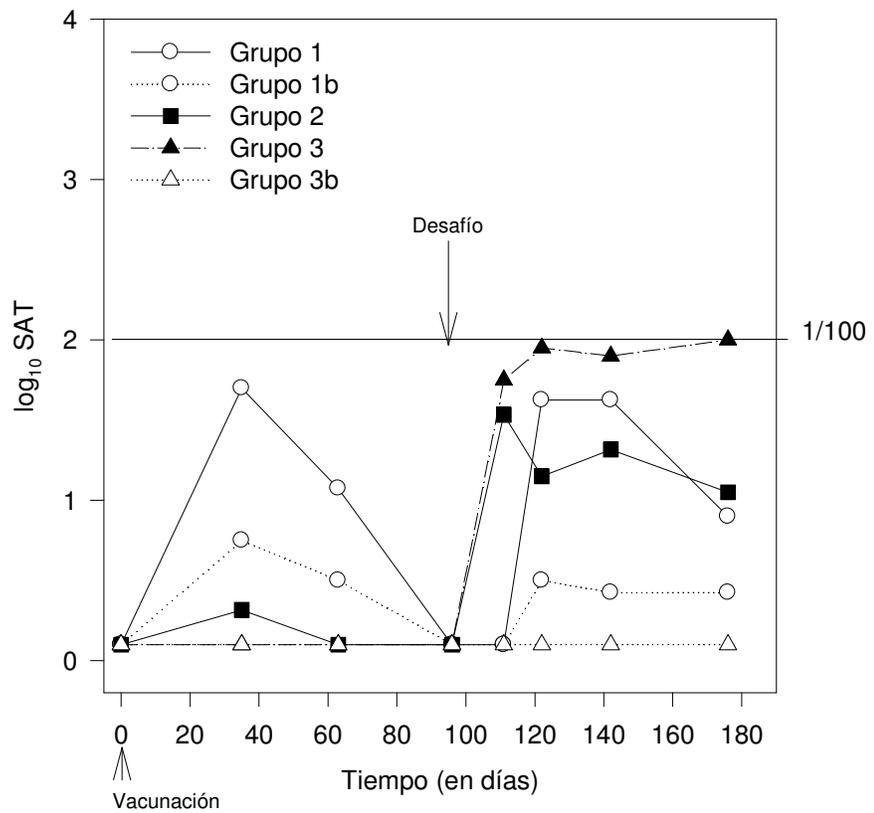
1496 6.3.2.4. Histopatología: En la Tabla 3 se resume la frecuencia de alteraciones microscópicas  
1497 en los animales de los diferentes grupos, no existiendo en este aspecto diferencias  
1498 significativas entre los diferentes grupos ( $p \geq 0.05$ ). Los epidídimos fueron los tejidos afectados  
1499 con mayor frecuencia, aunque en general las alteraciones encontradas fueron de grado leve,  
1500 salvo en 1 toro del grupo 1b y en 2 toros de los grupos 2 y 3 que presentaron lesiones de grado  
1501 moderado. Las epididimitis se presentaron bajo la forma de acumulaciones focales de  
1502 linfocitos y células plasmáticas ubicadas en el tejido conectivo interlobular (Fig. 3: A, B y C).  
1503 Las lesiones a nivel testicular se presentaron, en general, bajo la forma de orquitis intersticial  
1504 variando de grado leve a severa y con un componente celular de tipo linfoplasmocítico. En un  
1505 animal del grupo 3a se observaron además áreas de mineralización con abundantes restos  
1506 celulares, rodeadas por un infiltrado celular compuesto básicamente por células plasmáticas y  
1507 linfocitos y separadas del resto del parénquima por tejido conectivo denso (Fig. 3 D). Dos  
1508 toros del grupo 2 y uno del grupo 1b, presentaron alteraciones microscópicas en las vesículas  
1509 seminales. Siendo, las alteraciones de este tejido, severas solamente las observadas en el  
1510 grupo 2 que consistieron en focos inflamatorios intersticiales con acumulación de linfocitos,  
1511 células plasmáticas y neutrófilos, acompañados de fibroplasia, vacuolización epitelial y  
1512 presencia de secreción retenida en el lumen glandular (Fig. 3 E). En cuanto a las lesiones  
1513 presentes en las ampollas de los conductos deferentes fueron en general de grado leve, salvo  
1514 en 1 animal del grupo 1b, uno del grupo 2 y uno del grupo 3 en los cuales fueron moderadas y  
1515 se caracterizaron por la presencia de vacuolización epitelial y un infiltrado intersticial de tipo  
1516 linfoplasmocítico y algunas células gigantes. Salvo en el animal 5 perteneciente al grupo 2, no  
1517 se observaron alteraciones microscópicas a nivel del linfonódulos escrotal, en el que se  
1518 observaron granulomas con necrosis y mineralización central, con fibroplasia y un infiltrado

1519 celular compuesto por macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos. Los cambios  
1520 microscópicos observados a nivel de próstata fueron poco relevantes.

1521 Los animales controles no vacunados, no desafiados no presentaron alteraciones  
1522 patológicas relevantes a la microscopía.

1523

1524 **Figura 1:** Respuesta serológica postvacunación y posdesafío en toros de los grupos 1, 1b, 2, 3  
1525 y 3b a la prueba de Seroaglutinación Lenta en Tubo.



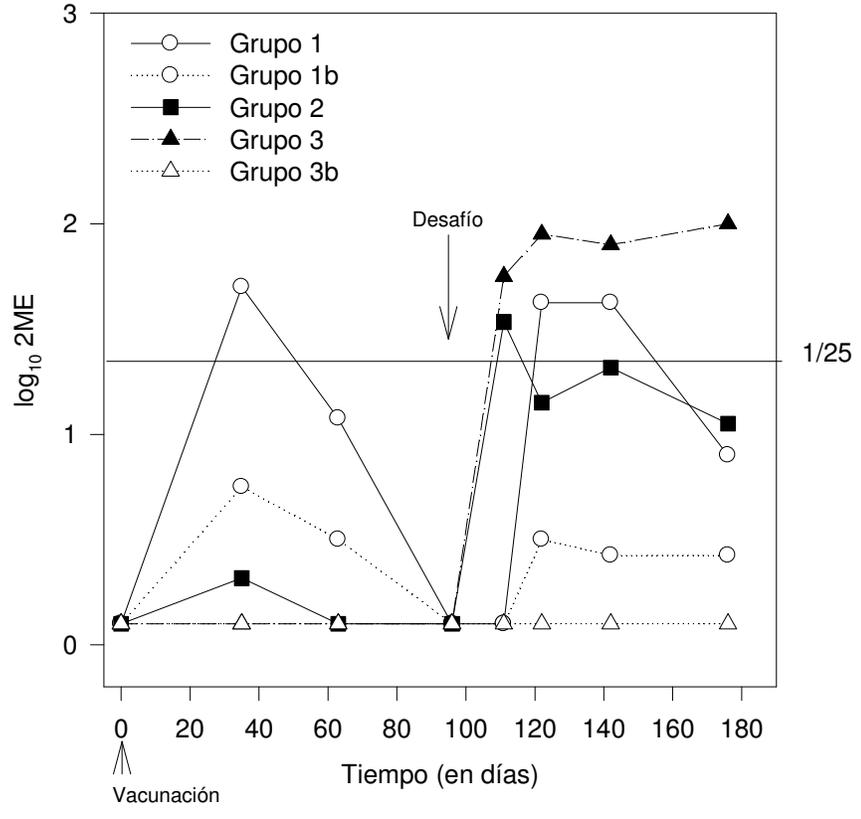
1526

1527

1528

1529

1530 **Figura 2:** Respuesta serológica postvacunación y posdesafío en toros de los grupos 1, 1b, 2, 3  
1531 y 3b a la prueba de 2 Mercaptoetanol.



1532

1533

1534

1535 **Tabla 2:** Respuesta serológica antiBP26 en toros podesafío.

Grupos	Animal N°	ELISAI anti BP26 posdesafío (expresado en PP)				
		Día 30	Día 45	Día 60	Día 75	Día 90
Grupo 1a	01	6.78	6.85	3.28	5.14	6.16
	02	4.69	8.70	4.40	4.73	4.67
	03	5.90	7.23	3.77	6.99	5.14
	04	3.71	6.20	3.52	3.97	3.70
Grupo 1b	05	3.57	5.55	3.38	4.52	4.50
	2065	3.95	3.90	2.51	3.36	3.56
	2067	5.29	5.86	3.42	3.15	3.35
	2068	3.76	4.79	4.29	4.11	4.59
Grupo 2	2	6.18	9.38	10.57	15.03	6.85
	3	3.73	5.94	3.14	4.42	2.91
	4	2.76	8.91	4.19	5.65	5.48
	5	4.88	6.82	4.57	5.92	5.79
	6	3.21	6.73	5.06	5.38	3.60
	7	3.18	4.36	3.63	4.42	2.64
Grupo 3a	8	3.73	5.71	3.42	5.21	4.93
	9	3.18	3.95	4.05	<b>143.12</b>	<b>111.06</b>
	11	3.18	4.83	3.35	4.90	5.03
	12	3.38	8.40	5.30	6.95	7.05
	13	4.92	9.52	3.63	7.19	4.62
	14	4.08	4.64	3.84	4.86	5.41
Grupo 3b	1	3.73	5.15	5.20	4.08	6.27
	10	2.86	4.09	3.59	NP	3.97

1536

1537

1538 **Tabla 3:** Lesiones histopatológicas halladas en órganos genitales luego del desafío con *B.*  
 1539 *abortus* 2308, en toros vacunados con M-1*luc* (1 y 2 dosis), RB51 y controles sin vacunar.

Grupo	Animal	Lado	Testículo	Epidídimo			Vesícula	Ampolla	Próstata	LFN <sup>d</sup>
				C <sup>a</sup>	Cu <sup>b</sup>	Co <sup>c</sup>				
1	01	D	-	+	-	-	-	+	-	-
		I	-	-	-	-	-	+	-	-
	02	D	-	-	-	+	-	+	+	-
		I	+	-	-	-	-	-	-	-
	03	D	++	-	-	-	-	-	+	-
		I	+	-	-	+	-	-	-	-
	04	D	-	-	-	-	-	-	-	-
		I	-	-	-	-	-	-	-	-
1b	2065	D	+++	-	+	++	+	++	-	-
		I	+	-	+	-	+	+	-	-
	2068	D	-	+	+	-	-	-	-	-
		I	-	-	-	-	-	-	-	-
	917	D	-	-	-	-	-	-	NR*	-
		I	+	-	-	-	-	-	-	-
	189	D	-	-	-	-	-	-	+	-
		I	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2	D	-	-	-	+	-	+	-	-
		I	DG	-	-	-	-	-	-	-
	3	D	-	DG	-	+	-	-	-	NR*
		I	DG	-	+	-	-	-	-	-
	4	D	DG	+++	+++	+++	+++	+	-	-
		I	-	++	++	++	-	+	-	-
	5	D	+++	-	-	-	+++	++	+	+++
		I	+	-	+	-	-	+	-	-
6	D	-	-	+	-	-	+	-	-	
	I	-	+	+	+	-	+	-	-	
7	D	-	++	+	-	-	-	-	-	
	I	-	-	-	+	-	-	-	-	
3	8	D	+	DG	-	-	-	RT**	NR*	-
		I	+	-	-	-	-	-	-	-
	9	D	-	+	-	-	-	-	-	-
		I	+	-	-	-	-	+	-	-
	11	D	DG	-	++	+	RT**	+	+	-
		I	-	++	+	FB***	RT**	++	-	-
	12	D	-	-	++	-	-	-	NR*	-
		I	++	-	-	-	-	+	-	-
13	D	+	-	-	-	-	-	-	-	
	I	++	-	-	-	-	-	-	-	

1540 **Tabla 3 (cont.):** Lesiones histopatológicas halladas en órganos genitales luego del desafío  
 1541 con *B. abortus* 2308, en toros vacunados con M-1*luc* (1 y 2 dosis), RB51 y controles sin  
 1542 vacunar.

1543

Grupo	Animal	Lado	Testículo	Epidídimo			Vesícula	Ampolla	Próstata	LFN <sup>d</sup>
				C <sup>a</sup>	Cu <sup>b</sup>	Co <sup>c</sup>				
3	14	D	++		+	-	+	+	-	-
		I	+++	-	-	-	-	-	-	-
3b	1	D	-	+	+	-	-	-	-	-
		I	+	-	+	-	-	-	-	-
	10	D	M**	-	-	-	-	-	-	-
		I	-	+	-	-	-	RT*	-	-

1544

1545 *a- epidídimo cabeza. b- epidídimo cuerpo, c- epidídimo cola, d- linfonódulo escrotal, Las*

1546 *lesiones se clasificaron en los siguientes grados: +=leve, ++=moderado y +++=severo, \*RT*

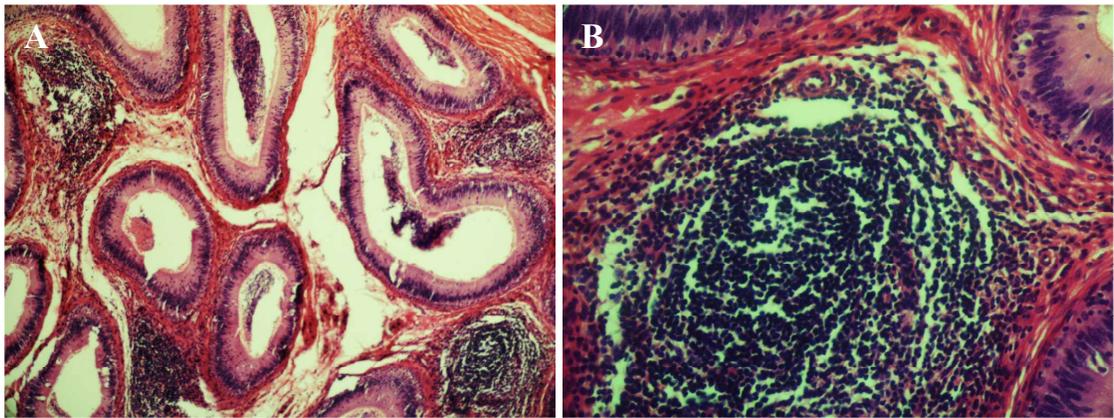
1547 *retención de secreción, \*\*M mineralización, \*\*\*FB fibrosis, DG cambios degenerativos. \*NR*

1548 *no procesado.*

1549

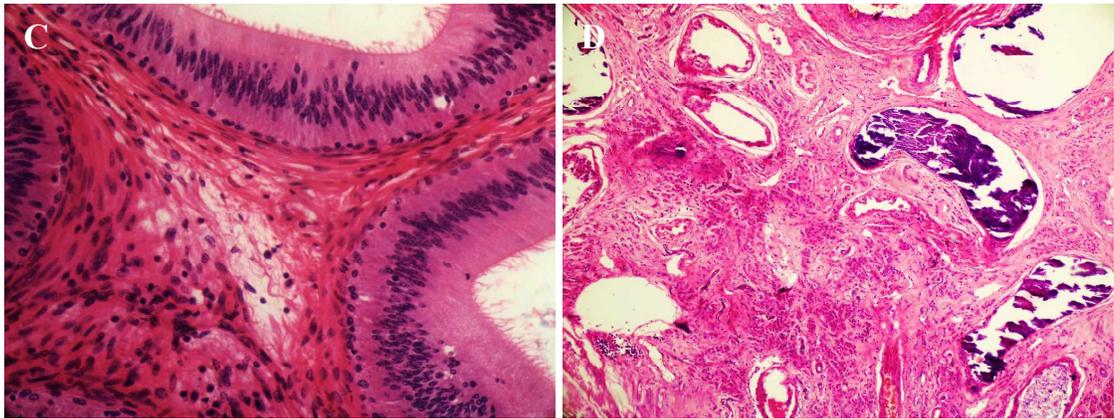
1550 **Figura 3:** Lesiones histológicas de los órganos del tracto reproductor de los toros.

1551

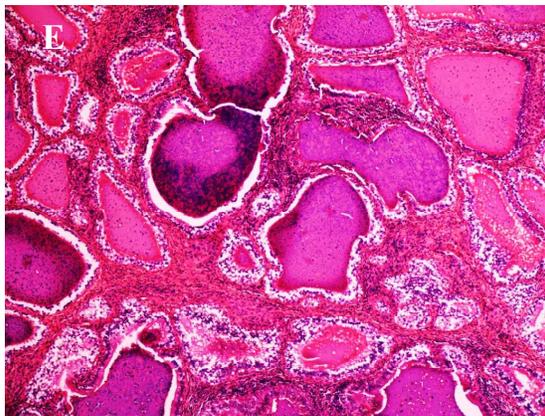


1552

1553



1554



1555

1556 (A) Toro 4 epididimitis intersticial severa no supurativa, H E 10x. (B) Toro 4 epidídimo,

1557 detalle del tipo celular observado, HE 40x. (C) Toro 7 epididimitis leve no supurativa detalle

1558 de los tipos celulares observados: linfocitos y células plasmáticas, HE 40x. (D) Toro 14:

- 1559 orquitis intersticial con fibrosis y mineralización intratubular severa, HE 10x. (C) Toro 5:
- 1560 seminovesiculitis intersticial no supurativa con fibroplasia moderada y vacuolización epitelial,
- 1561 HE 10x.
- 1562

1563 **6.4. DISCUSIÓN**

1564 Numerosos trabajos se han dedicado a tratar de establecer el grado de importancia que  
1565 tiene el toro en la difusión de la enfermedad. La mayoría de estos le aseguran un rol de escasa  
1566 importancia en la difusión de la enfermedad mediante servicio natural (24, 148). Sin embargo,  
1567 esta situación se modifica drásticamente cuando se implanta dentro del rodeo un sistema de  
1568 inseminación artificial ya que la bacteria puede ser excretada y transmitida a través del semen  
1569 como fue puesto en evidencia en este trabajo y con anterioridad por otros autores (234, 235).  
1570 Bajo esta situación particular contar con una vacuna contra brucelosis que pudiera ser  
1571 aplicada en machos sin producir reacciones adversas y con un nivel aceptable de protección  
1572 sería muy beneficioso.

1573 Los trabajos en los cuales se vacunaron machos con S19 mostraron una respuesta  
1574 serológica y alteraciones patológicas comparables a las que se presentan en los casos de  
1575 infección natural (31, 32, 33). En cuanto a la cepa RB51, si bien el fabricante no recomienda la  
1576 vacunación de machos, algunos trabajos sugieren su inocuidad en esta categoría al ser utilizada  
1577 con una dosis completa de 10 millones de UFC/mL (232). En cuanto a la cepa mutante M1-*luc*  
1578 su aplicación en machos se logró ensayar por primera vez en este trabajo.

1579 Para la vacunación de los animales con RB51 se utilizó una vacuna comercial y los  
1580 conteos realizados posteriormente indicaron que la dosis aplicada se encontró dentro del  
1581 rango esperado. Sin embargo, la dosis administradas de M1-*luc* tanto en la primera  
1582 vacunación como en la segunda (en el caso del grupo 1b) se encontró 3 logaritmos por debajo  
1583 de las deseadas. Esta circunstancia posiblemente afectó la cinética de anticuerpos anti-LPS y  
1584 la aparición de algunas alteraciones clínicas PV y dificultó la comparación entre grupos  
1585 vacunados.

1586           En cuanto a los animales vacunados con RB51, y como se esperaba, ninguno  
1587 desarrolló respuesta serológica en las pruebas que detectan anticuerpos anti-LPS. Por otro  
1588 lado, en nuestro trabajo *B. abortus* RB51 fue aislada a partir del fluido seminal de un animal a  
1589 los 30 días PV. Esta situación había sido descartada por algunos autores (232) y sugerida por  
1590 otros (231) aunque no había podido ser evidenciada. El hecho de que la bacteria sea eliminada  
1591 a través de semen podría tener importancia en cuanto a la exposición de personas que trabajan  
1592 en los centros de inseminación artificial. A pesar de que no se han registrado hasta el  
1593 momento casos en humanos que trabajen en estos centros, no ha sido definitivamente probado  
1594 que la vacuna sea inocua para el hombre y varias infecciones accidentales han sido reportadas  
1595 (236).

1596           Tanto la patología genital como la respuesta inmune de la brucelosis en toros han sido  
1597 estudiadas bajo condiciones naturales y experimentales (148, 150, 237). En el presente trabajo  
1598 los títulos serológicos PD observados en los toros de todos los grupos fueron mucho más  
1599 débiles que los registrados en vacas con una dosis de desafío similar (ver capítulo 1). Esta  
1600 situación concuerda con la descrita previamente por otros autores que han sostenido que los  
1601 títulos posinfección en toros tienden a ser débiles o a desaparecer rápidamente, aislándose  
1602 *Brucella* de machos serológicamente negativos (148, 238, 239).

1603           Los hallazgos patológicos en este trabajo concuerdan con los observados por varios  
1604 autores, los cuales citan la seminovesiculitis, ampulitis, epididimitis y orquitis como los más  
1605 frecuentes (148, 239). Por otro lado, y coincidiendo también con la bibliografía no se  
1606 observaron higromas, bursitis o arteritis en los animales de este ensayo (240).

1607           La falta de correspondencia entre los hallazgos clínicos y los histopatológicos podría  
1608 deberse al tiempo transcurrido entre el desafío y el sacrificio de los animales, en ese periodo  
1609 algunas lesiones podrían haber resuelto. Por otro lado, la presencia de PMNN en las muestras

1610 de plasma seminal refuerza el hallazgo de las alteraciones clínicas a nivel genital en estos  
1611 animales.

1612         En nuestro trabajo los cambios histopatológicos a nivel genital no se correlacionaron  
1613 con los cultivos bacteriológicos. Coincidiendo con las observaciones realizadas por Izadjoo *et*  
1614 *al.* (241) que estudiaron la utilización de un modelo macho para brucelosis desafiando ratones  
1615 con *B. melitensis*, y señalada también por Rhyan *et al.* (239), quienes realizaron cultivos de  
1616 genitales y linfonódulos de toros bisontes infectados naturalmente. Estos resultados  
1617 discordantes entre la presencia de lesiones histopatológicas y cultivos negativos, podría  
1618 deberse a la localización de las brucelas en unos pocos sitios en los cuales se distribuye de  
1619 manera focal. Sin embargo, algunos autores han postulado que los machos podrían ser menos  
1620 susceptibles a la infección que las hembras sexualmente maduras (242) y es posible que la  
1621 reacción inflamatoria a nivel genital lleve a eliminación de la bacteria.

1622         Si bien los resultados obtenidos no nos permiten concluir respecto de protección  
1623 otorgada por las distintas vacunas en toros adultos, ya que a pesar de estar la cepa utilizada  
1624 para el desafío a la concentración deseada no se logró infectar a la mayor parte de los  
1625 animales controles sin vacunar. En el presente trabajo se pudo comprobar la eliminación de la  
1626 cepa vacunal RB51 a través de semen con las implicancias desconocidas aún que esta  
1627 situación podría tener en la salud pública. Por otro lado, no se detectaron toros que excretaran  
1628 la cepa vacunal a través de semen ni alteraciones a la inspección clínica en los toros de los  
1629 grupos vacunados con M1-*luc* (tanto en los vacunados en una ocasión como en los  
1630 revacunados), situación que nos alienta a seguir evaluando la performance de esta vacuna en  
1631 machos. Consideramos que nuevos ensayos, utilizando la vacuna M1-*luc* a mayores  
1632 concentraciones serán necesarios para determinar si el uso de esta vacuna mutante de *B.*  
1633 *abortus* en toros adultos es seguro.

1634

1635

1636

1637

1638

1639

### **ENSAYO 3**

1640

**EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA REVACUNACIÓN CON UNA CEPA**

**MUTANTE DE *BRUCELLA ABORTUS* EN VAQUILLONAS Y EN VACAS**

**ADULTAS PREVIAMENTE VACUNADAS CUANDO TERNERAS CON *BRUCELLA***

***ABORTUS* S19.**

1645

1646

1647

1648

1649

1650

1651

1652

1653

1654

## 1655 7.1. INTRODUCCIÓN

1656 La vacunación con S19 como única medida puede resultar incompleta para el control  
1657 de rodeos de alta prevalencia, los cuales pueden transformarse en rodeos problemas que  
1658 difundan la enfermedad (143). Por otro lado, el uso de la dosis completa ( $15-30 \times 10^9$  UFC)  
1659 en animales adultos no es recomendada, debido a que estos permanecen positivos a las  
1660 pruebas serológicas clásicas; este inconveniente puede ser minimizado utilizando una dosis  
1661 reducida.

1662 En diferentes trabajos en los que se evaluó la revacunación con dosis reducidas de  
1663 S19, utilizando diversas concentraciones y vías de aplicación, se ha logrado elevar el nivel de  
1664 protección en hembras adultas (35, 73, 244, 245). La reglamentación nacional vigente en  
1665 Argentina contempla esta posibilidad bajo condiciones particulares y siempre con la  
1666 supervisión del SENASA (Res. 115 de 1999, SENASA). Sin embargo, la revacunación  
1667 presenta también ciertas dificultades de carácter diagnóstico, ya que una segunda vacunación  
1668 implica también un aumento de los títulos de anticuerpos, lo que provoca una disminución en  
1669 la especificidad de las pruebas serológicas de rutina, al ser incapaces de distinguir entre  
1670 animales infectados y vacunados; repercutiendo en un aumento del periodo de restricción para  
1671 realizar el diagnóstico. En este sentido, al ser la vacuna M1-*luc* elaborada con una cepa  
1672 mutante a la cual se le puede anexar un sistema de diagnóstico específico, la revacunación con  
1673 una dosis reducida en hembras aportaría los mismos beneficios que los de la S19 y tendría la  
1674 ventaja de poder discriminar títulos vacunales de los de infección.

1675 El objetivo planteado para este capítulo fue estudiar la cinética de anticuerpos pos-  
1676 revacunación con una dosis reducida de M1-*luc* aplicada por dos vías diferentes (subcutánea  
1677 y conjuntival) en hembras bovinas (vacas y vaquillonas) vacunadas previamente cuando  
1678 terneras con una dosis estándar de S19.

1679

1680 **7.2. MATERIALES Y METODOS**

1681 Con el fin de evaluar la respuesta en hembras según su categoría el ensayo fue dividido  
1682 en dos secciones.

1683

1684 **7.2.1. ENSAYO 1: EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA REVACUNACIÓN DE**  
1685 **VAQUILLONAS PRESERVICIO**

1686 7.2.1.1. Selección de animales: se seleccionaron 52 hembras Aberdeen Angus, de 2 a 4 meses  
1687 de edad, provenientes de rodeos seronegativos, no vacunadas contra brucelosis y  
1688 serológicamente negativas a la enfermedad. Los animales recibieron el plan sanitario  
1689 tradicional de Reservas ganaderas del INTA Balcarce. Las terneras permanecieron en pasturas  
1690 consociadas perennes. Todos los animales fueron manejados en un solo lote durante el  
1691 transcurso del ensayo.

1692 7.2.1.2. Primovacunación: todas las terneras se vacunaron entre los 3-5 meses de edad con *B.*  
1693 *abortus* cepa 19, 2 mL vía SC en el área axilar. Se utilizó una vacuna comercial (Lab. San  
1694 Jorge Bagó, Argentina) con la dosis recomendada por SENASA.

1695 7.2.1.3. Revacunación: a los 10-12 meses de edad fueron revacunadas según el siguiente  
1696 diseño:

1697 - Grupo 1a: M1-*luc* 2 mL vía SC de una suspensión de  $2-4 \times 10^9$  UFC (n=11).

1698 - Grupo 1b: M1-*luc* 100  $\mu$ L vía conjuntival (50  $\mu$ L/ojo) de una suspensión de  $5-10 \times$   
1699  $10^9$  UFC (n=11).

1700 - Grupo 2a: S19 2 mL vía SC de una suspensión de  $2-4 \times 10^9$  UFC (n=10).

1701 - Grupo 2b: S19 100 $\mu$ L vía conjuntival (50  $\mu$ L/ojo) de una suspensión de  $5-10 \times 10^9$   
1702 UFC (n=10).

1703 - Grupo 3: Controles sin revacunar (n=10).

1704 7.2.1.4. Preparación de cepas vacunales:

1705 Para la revacunación de los grupos 2 (a y b) se utilizó una vacuna comercial de *B. abortus*  
1706 S19 (Lab. San Jorge Bagó, Argentina). La cepa liofilizada S19 fue resuspendida de acuerdo a  
1707 los procedimientos recomendados por el SENASA y diluida en solución salina estéril (0,85%  
1708 NaCl) a las concentraciones buscadas.

1709 La cepa *B. abortus* M1-*luc* se dejó crecer a 37°C durante 48 hs en placas de AT (Difco,  
1710 Detroit, MI, USA), luego se recolectó y se resuspendió en solución salina estéril (0,85%  
1711 NaCl) a la concentración buscada.

1712 Antes e inmediatamente después de la vacunación, cada frasco fue evaluado en nuestro  
1713 laboratorio respecto de su pureza y número de UFC por conteo en placas.

1714 7.2.1.5. Serología: para la extracción de los sueros se obtuvo sangre por punción yugular en  
1715 tubos de 10 mL de todos los animales a los 15 días posrevacunación (PRV) y posteriormente  
1716 cada 15 días PRV hasta los 144 días PRV. Con los sueros se realizaron las pruebas indicadas  
1717 en el apartado 1.1.4.

1718

1719 **7.2.2. ENSAYO 2: EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA REVACUNACIÓN DE**  
1720 **VACAS ADULTAS:**

1721 7.2.2.1. Selección de animales: se seleccionaron 128 hembras adultas Aberdeen Angus,  
1722 Hereford y sus cruza, provenientes de rodeos seronegativos, vacunadas contra brucelosis con  
1723 *B. abortus* S19 entre los 3 y 6 meses de edad, serológicamente negativas a la enfermedad. Los  
1724 animales recibieron el plan sanitario tradicional de Reservas ganaderas del INTA Balcarce.  
1725 Todos los animales permanecieron en pasturas consociadas perennes y fueron manejados en  
1726 un solo lote dentro del esquema de cría de la reserva ganadera N° 6 de INTA.

1727 7.2.2.2. Revacunación: los animales fueron revacunados según el siguiente diseño:

- 1728 - Grupo 1a: M1-*luc* 2 mL vía SC de una suspensión de  $2-4 \times 10^9$  UFC (n= 25).  
1729 - Grupo 1b: M1-*luc* 100  $\mu$ L vía conjuntival (50  $\mu$ L/ojo) de una suspensión de  $5-10 \times$   
1730  $10^9$  UFC (n= 25).  
1731 - Grupo 2a: S19 2 mL vía SC de una suspensión de  $2-4 \times 10^9$  UFC (n= 25).  
1732 - Grupo 2b: S19 100 $\mu$ L vía conjuntival (50  $\mu$ L/ojo) de una suspensión de  $5-10 \times 10^9$   
1733 UFC (n= 25).  
1734 - Grupo 3: Controles sin revacunar (n= 28).

1735 7.2.2.3. Serología: para la extracción de los sueros se obtuvo sangre por punción yugular de  
1736 todos los animales a los 15 días PRV, posteriormente cada 15 días PRV hasta los 120 días  
1737 PRV y un último muestreo realizado a los 130 días PRV. Con los sueros obtenidos se  
1738 realizaron las pruebas indicadas en el apartado 5.2.1.5.

1739

### 1740 **7.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

1741 7.2.3.1. Resultados de las pruebas serológicas: se utilizó la metodología descrita en el  
1742 apartado 5.2.4.1.

1743

1744 **7.3. RESULTADOS:**1745 **7.3.1 ENSAYO 1: EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA REVACUNACIÓN DE**  
1746 **VAQUILLONAS PRESERVICIO**

1747 Todas las terneras fueron seronegativas a brucelosis al comenzar el ensayo. Posterior a  
1748 la vacunación con *B. abortus* S19 todos los animales tuvieron reacción serológica positiva a  
1749 las pruebas BPA, SAT y 2-ME. En el momento de la revacunación, entre los 10-12 meses de  
1750 edad, un animal del Grupo 2b (N° 12) presentó títulos residuales positivos a las pruebas de  
1751 BPA, SAT y 2-ME y fue negativa a FPA. En el resto de los grupos, si bien algunos animales  
1752 fueron positivos a la prueba de BPA, ninguno lo fue a las pruebas SAT y 2-ME, o FPA.

1753 La dosis inoculada se encontró dentro del rango planificado para el grupo 2a y fue  
1754 levemente inferior para los grupos 1a, 1b y 2b. Sin embargo, en todos los grupos la dosis  
1755 estuvo cercana a  $10^9$  UFC. No se observaron variaciones entre los conteos bacterianos  
1756 realizados antes e inmediatamente después de la vacunación, ni crecimiento de contaminantes  
1757 bacterianos. En la Tabla 1 se observan las dosis finales utilizadas para la revacunación.

1758

1759 **Tabla 1:** Dosis finales en UFC utilizadas para la revacunación de vaquillonas.

Grupo	Dosis Esperada (en UFC)	Dosis Inoculada (en UFC)
1a	$2-4 \times 10^9$	$7,8 \times 10^8$
1b	$5-10 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
2a	$2-4 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$
2b	$5-10 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$

1760

1761            Luego de ser revacunados los animales presentaron reacción positiva a la prueba de  
1762 BPA, la proporción de animales positivos fue del 100% a los 14 días PRV en todos los grupos  
1763 y permaneció en este nivel hasta los 73, 42 y 53 días PRV en los grupos 1a, 1b y 2a  
1764 respectivamente. En el grupo 2b la proporción de animales positivos a BPA bajó al 90% a los  
1765 27 días y permaneció en este nivel hasta los 42 días para posteriormente continuar bajando.

1766            La cinética de anticuerpos anti LPS generada por RV con M1-*luc* fue similar a la de  
1767 S19 para ambas vías evaluadas. En la Figura 1 se observa cinética de evolución de la  
1768 respuesta serológica anti LPS en todos los grupos, PRV medida mediante la prueba de SAT.  
1769 La respuesta de anticuerpos medida mediante la prueba de SAT presentó una diferencia  
1770 significativa ( $p<0.01$ ) cuando se compararon todos grupos vacunados con el grupo control. Si  
1771 bien se observó una respuesta anti LPS a la prueba de SAT de menor intensidad en los grupos  
1772 vacunados por vía conjuntival (1b y 2b) respecto de los vacunados por vía subcutánea, la  
1773 misma fue no significativa ( $p>0.05$ ) hasta el día 60 PRV. En cuanto a la evolución de  
1774 anticuerpos anti LPS evaluada mediante la prueba de 2ME (Figura 2), la misma presentó una  
1775 diferencia significativa ( $p<0.01$ ) cuando se compararon todos grupos vacunados con el grupo  
1776 control. La diferencia fue también significativa cuando se compararon las respuestas a la  
1777 prueba de 2ME de los animales RV vía conjuntival vs. vía subcutánea ( $p<0.001$ ), siendo la  
1778 respuesta de mayor intensidad en estos últimos. No se observaron diferencias significativas en  
1779 la prueba de 2ME al comparar grupos vacunados con diferentes cepas pero mediante la misma  
1780 vía ( $p>0.05$ ).

1781            La media de los títulos de los animales de los grupos 1a, 1b, 2a y 2b fueron negativos  
1782 a SAT a los 45, 30, 60 y 15 días PRV y a los 75, 45, 60 y 30 días PRV para 2ME,  
1783 respectivamente (Fig. 1 y 2).

1784 La respuesta inmune humoral PRV medida por las pruebas SAT/2-ME y FC fue  
1785 similar a la de BPA aunque declinó de manera más temprana en los grupos 1a y 2a. En tanto,  
1786 en los dos grupos RV por vía conjuntival (grupos 1b y 2b) la proporción de animales positivos  
1787 a SAT/2-ME y FC fue menor respecto de los positivos a BPA. A diferencia de lo observado  
1788 en los grupos RV subcutáneamente, en los grupos RV conjuntivamente la proporción de  
1789 animales positivos a las pruebas de SAT/2-ME se diferenció de los resultados de la prueba de  
1790 FC (Fig. 3).

1791 La proporción de animales positivos a la prueba de FPA en el primer mes PRV fue  
1792 menor que al resto de las pruebas en todos los grupos evaluados. La respuesta de anticuerpos  
1793 medida por FPA fue tardía respecto de las otras pruebas en los grupos 1a y 2b, en tanto en el  
1794 grupo 1b se mantuvo en una proporción que no superó en ningún momento el 10% de  
1795 reactores positivos y en el grupo 2a acompañó la cinética del resto de las pruebas evaluadas.

1796 A partir del día 118 PRV en todos los grupos se observó una proporción de animales  
1797 positivos a la prueba de BPA, sin embargo ninguno de ellos positivos al resto de las pruebas.

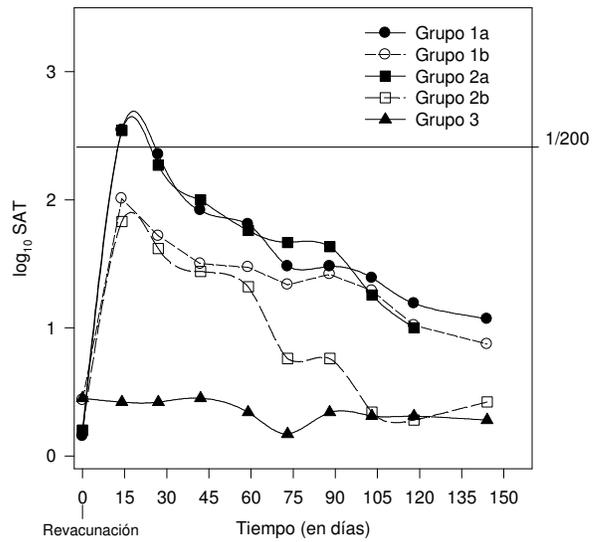
1798 El grupo 3 permaneció negativo a SAT, 2-ME, FC y FPA durante todo el ensayo.

1799 En cuanto a la respuesta serológica anti BP26 no se observaron diferencias  
1800 significativas entre grupos ( $p > 0.05$ ). El PP promedio se mantuvo por debajo del punto de  
1801 corte ( $PP \geq 10$ ) en todos los grupos a lo largo del ensayo, salvo en el muestreo realizado el día  
1802 27 PRV en los grupos 1a y 2b (Fig. 4) y al culminar el ensayo en el grupo 3. En dicho  
1803 muestreo 3 animales del grupo 1a y 2 animales del grupo 2b, presentaron títulos anti BP26 de  
1804 entre 11,6 y 29 de PP y de esta manera elevaron el promedio en dichos grupos. Los títulos  
1805 positivos al ELISAI anti BP26 fueron transitorios en la mayoría de los casos y no guardaron  
1806 relación con los resultados obtenidos en el resto de las pruebas. La elevación en el PP  
1807 promedio del grupo 3 al culminar el ensayo se debió al elevado PP que presentó el animal 23

1808 de este grupo (51,9); este animal fue el único de todos los grupos que presentó niveles de  
 1809 anticuerpos anti BP26 por encima del punto de corte durante el transcurso de todo el ensayo.

1810

1811 **Figura 1:** Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en vaquillonas de los  
 1812 grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de Seroaglutinación Lenta en Tubo (media).



1813

1814

1815

1816

1817

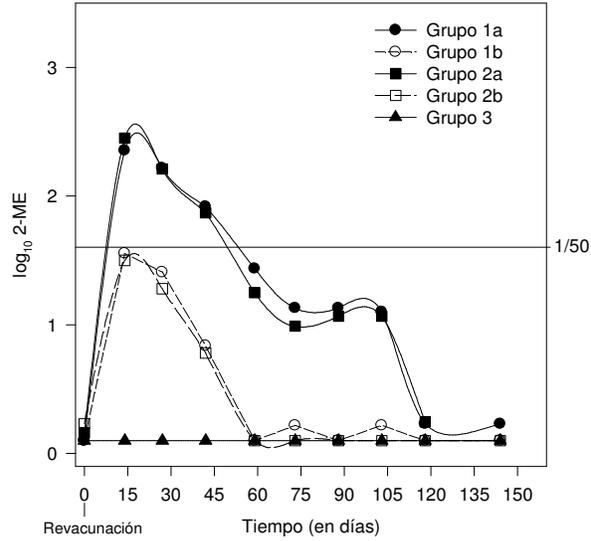
1818

1819

1820

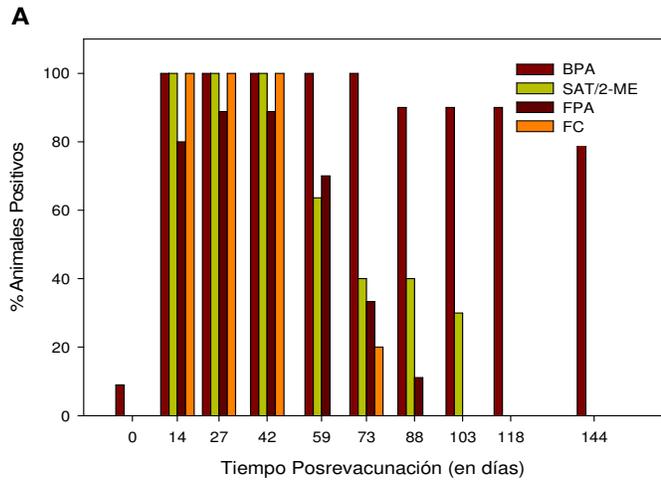
1821

1822 **Figura 2:** Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en vaquillonas de los  
1823 grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de 2-Mercaptoetanol (media).



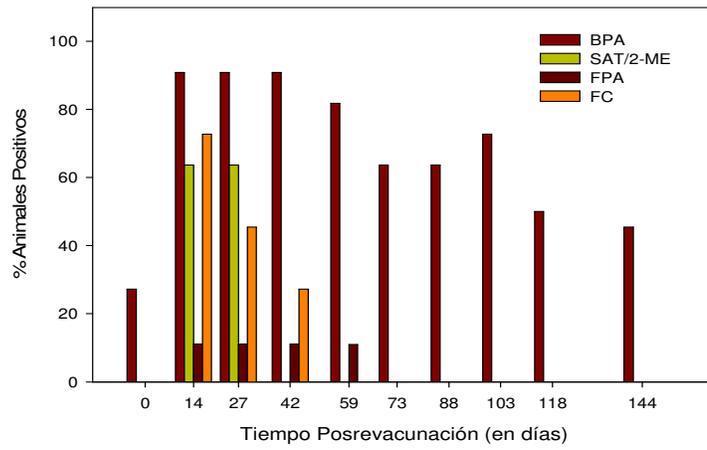
1824

1825 **Figura 3:** Porcentaje de seroreactores positivos a las pruebas de BPA, SAT/2-ME, FPA y FC  
1826 en vaquillonas vacunadas con *B. abortus* S19 y revacunadas con S19 o M1-*luc* por diferentes  
1827 vías. A- Grupo 1a; B- Grupo 1b; C- Grupo 2a y D- Grupo 2b.



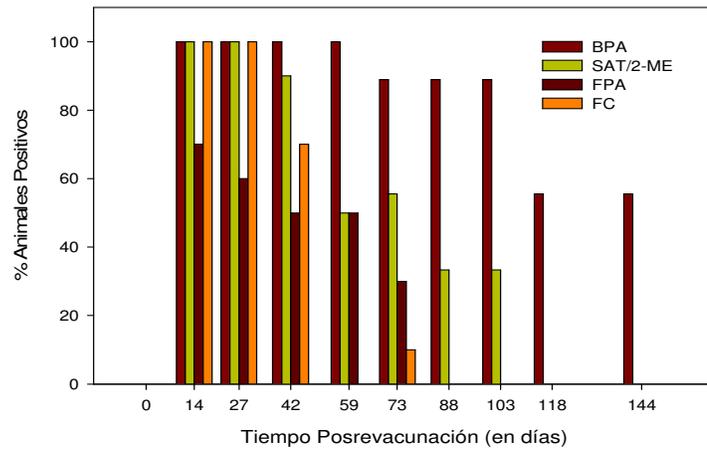
1828

**B**



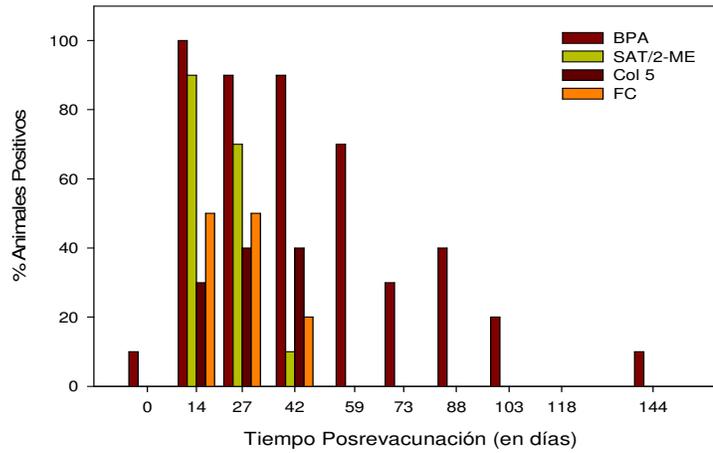
1829

**C**



1830

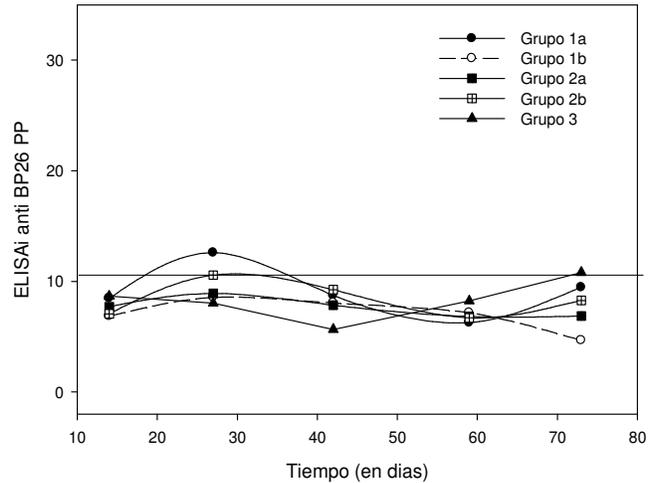
**D**



1831

1832 **Figura 4:** Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en las vaquillonas de los  
 1833 grupos 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de ELISAI Bp26 en los diferentes grupos (media).

1834



1835

1836

### 1837 7.3.2. ENSAYO 2: EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA REVACUNACIÓN DE 1838 VACAS ADULTAS:

1839 Al momento de la RV entre un 5 y un 20% de los animales de cada grupo fueron  
 1840 positivos a BPA, aunque negativos al resto de las pruebas.

1841 La dosis inoculada se encontró dentro del rango planificado para los grupos 1a y 2a, y  
 1842 superior en el caso del grupo 1b y 2b. Las dosis inoculadas en estos dos últimos grupos se  
 1843 encontraron dentro del rango recomendado para la dosis estándar, aunque la vía de aplicación  
 1844 y el volumen final fue diferente. No se observaron variaciones entre los conteos bacterianos  
 1845 realizados antes e inmediatamente después de la vacunación, no se observó crecimiento de  
 1846 contaminantes. En la tabla 2 se observan las dosis finales utilizadas para la revacunación.

1847

1848

1849 Tabla 2: Dosis finales en UFC utilizadas para la revacunación de vacas.

Grupo	Dosis Esperada (en UFC)	Dosis Inoculada (en UFC)
1a	2-4 x 10 <sup>9</sup>	3,1 x 10 <sup>9</sup>
1b	5-10 x 10 <sup>9</sup>	15,8 x 10 <sup>9</sup>
2a	2-4 x 10 <sup>9</sup>	3,2 x 10 <sup>9</sup>
2b	5-10 x 10 <sup>9</sup>	16 x 10 <sup>9</sup>

1850

1851           Luego de ser revacunados los animales presentaron reacción positiva la prueba de  
1852 BPA, la proporción de animales positivos fue del 100% a los 20 días PRV en todos los grupos  
1853 y permaneció en este nivel hasta culminar el ensayo a los 132 días en los grupos 1a y 2a y  
1854 hasta el día 48 PRV en el grupo 2b. En el grupo 1b la proporción de animales positivos a BPA  
1855 bajó al 95% a los 36 días para continuar disminuyendo en los muestreos posteriores.

1856           La respuesta inmune humoral PRV medida por las pruebas SAT/2-ME fue similar a la  
1857 de BPA hasta los 69 día en el grupo 1a y hasta los 48 días en grupo 2a, posteriormente el  
1858 porcentaje de animales positivos fue declinando. En cuanto a la respuesta inmune medida por  
1859 la prueba de FC el 100% de los animales de los grupos 1a y 2a presentaron reacción positiva  
1860 en el primer muestreo PRV (día 20). Luego la proporción de positivos disminuyó levemente  
1861 (entre 96 y 95%) en ambos grupos hasta el día 48 y partir del día 69 PRV se observó un  
1862 descenso más marcado no superando el 48% de seroreactores positivos en ambos grupos. Por  
1863 otro lado, en los dos grupos RV por vía conjuntival (grupos 1b y 2b) la proporción de  
1864 animales positivos a SAT/2-ME y FC fue menor respecto de los positivos a BPA. En la  
1865 Figura 5 se observa cinética de evolución de la respuesta serológica anti LPS en todos los  
1866 grupos, PRV medida mediante la prueba de SAT. La respuesta de anticuerpos medida

1867 mediante la prueba de SAT presentó una diferencia significativa ( $p<0.01$ ) cuando se  
1868 compararon todos grupos vacunados con el grupo control. Así también la diferencia fue  
1869 significativa cuando fue comparada la respuesta a la prueba de SAT de los animales RV vía  
1870 conjuntival vs. vía subcutánea ( $p<0.001$ ), siendo la respuesta de mayor intensidad en estos  
1871 últimos. No se observaron diferencias significativas en la prueba de SAT en los grupos  
1872 vacunados subcutáneamente ( $p>0.05$ ). Sin embargo, en los grupos vacunados vía conjuntival  
1873 se observó una respuesta levemente mayor, aunque significativa ( $p<0.05$ ), en el grupo 2b vs.  
1874 el 1b, en los muestreos de los días 43, 55 y 75. Los títulos de los animales medidos por esta  
1875 prueba en los grupos 1a y 2a se negativizaron a los 75 días PRV (Fig. 5), mientras que en los  
1876 animales de los grupos 1b y 2b el título promedio no superó en ningún momento la dilución  
1877 1/200 de la prueba. En cuanto a la prueba de 2-ME el promedio de los títulos de los animales  
1878 del grupo 1a se mantuvo positivo al culminar el ensayo a los 105 días PRV (Fig. 6). La  
1879 respuesta de anticuerpos medida mediante la prueba de 2ME presentó una diferencia  
1880 significativa ( $p<0.01$ ) cuando se compararon todos grupos vacunados con el grupo control. La  
1881 diferencia fue significativa cuando fue compararon las respuestas a la prueba de 2ME de los  
1882 animales RV vía conjuntival vs. vía subcutánea ( $p<0.001$ ), siendo la respuesta de mayor  
1883 intensidad en estos últimos. No se observaron diferencias significativas en la prueba de 2ME  
1884 al comparar grupos vacunados con diferentes cepas pero mediante la misma vía ( $p>0.05$ ). La  
1885 curva promedio de los títulos de 2-ME se negativizó el día 105, 45 y 45 PRV en los grupos  
1886 1b, 2a y 2b respectivamente.

1887       La proporción de animales positivos a la prueba de FPA fue menor que al resto de las  
1888 pruebas serológicas en todos los grupos evaluados. La respuesta de anticuerpos medida por  
1889 FPA fue tardía respecto de las otras pruebas en los grupos 1a y 2a, mientras que en los grupos

1890 1b y 2b la aparición de seroreactores (aunque en menor proporción) acompañó lo ocurrido en  
1891 el resto de las pruebas evaluadas.

1892 Al culminar el ensayo a los 132 días PRV todos los animales de los grupos RV  
1893 subcutáneamente y una alta proporción de los RV conjuntamente fueron positivos a BPA,  
1894 siendo variable la cantidad de positivos al resto de las pruebas en todos los grupos RV salvo  
1895 en el 1b donde no hubo seroreactores positivos a otras pruebas (Fig.7).

1896 El grupo 3 permaneció negativo a SAT, 2-ME, FC y FPA durante todo el ensayo.

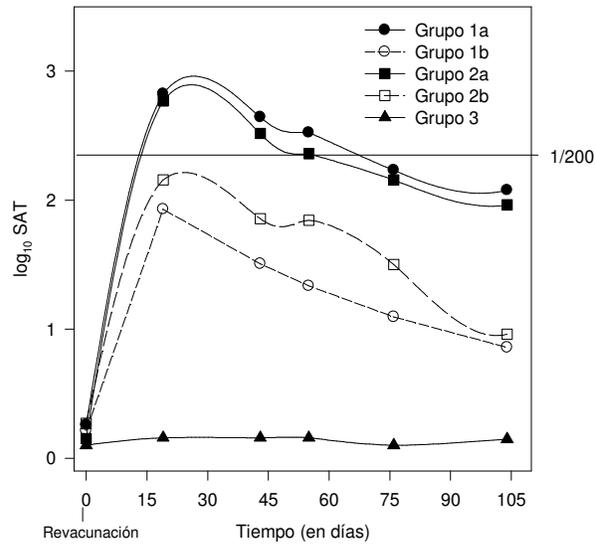
1897 La cinética de anticuerpos anti LPS generada por RV con M1-*luc* fue similar a la de  
1898 S19 para ambas vías evaluadas.

1899 Respecto de la respuesta serológica anti BP26 no se observaron diferencias  
1900 significativas entre grupos ( $p>0.05$ ), la respuesta fue de baja intensidad, no superando el PP  
1901 promedio de ninguno de los grupos el punto de corte estipulado (Fig. 8). Sin embargo, 1/25,  
1902 2/25, 3/25, 1/25 y 1/28 vacas de los grupos 1<sup>a</sup>, 1b, 2<sup>a</sup>, 2b y 3 respectivamente, presentaron  
1903 respuesta serológica a la proteína BP26 al momento de iniciar el trabajo, la misma se mantuvo  
1904 constante en los muestreos PRV.

1905

1906

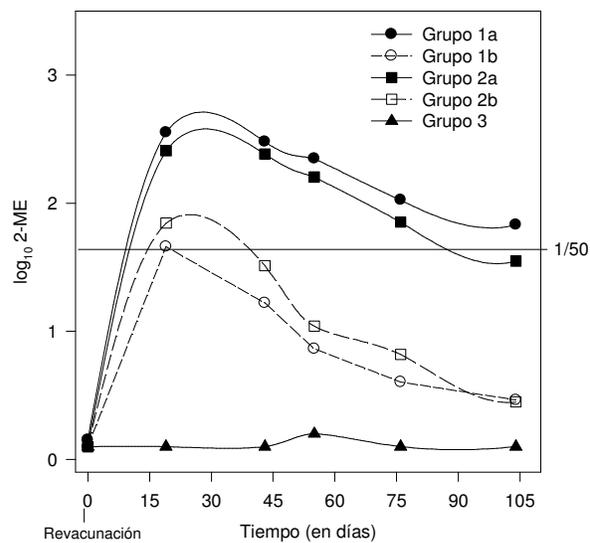
1907 **Figura 5:** Respuesta serológica postrevacunación dosis reducida en vacas de los grupos 1a,  
 1908 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de Seroaglutinación Lenta en Tubo (media).



1909

1910

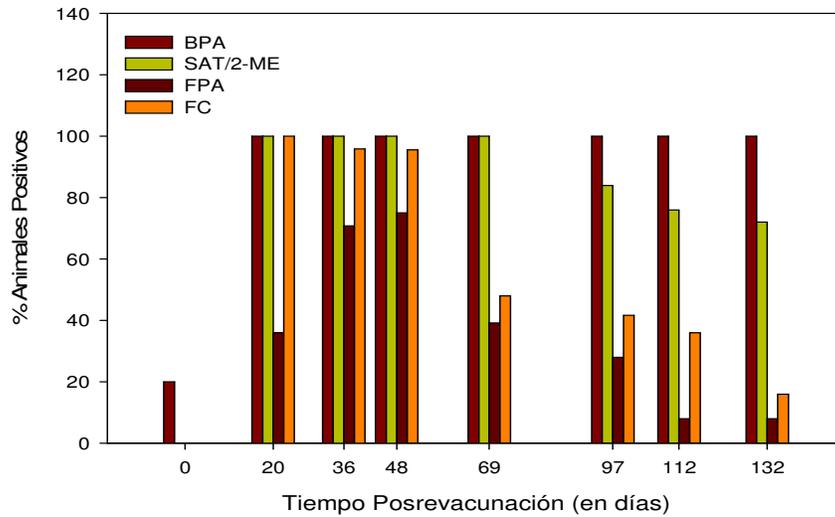
1911 **Figura 6:** Respuesta serológica postrevacunación dosis reducida en vacas de los grupos 1a,  
 1912 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de 2-Mercaptoetanol (media).



1913

1914 **Figura 7:** Porcentaje de seroreactores positivos a las pruebas de BPA, SAT/2-ME, FPA y FC  
 1915 en vacas vacunadas con *B. abortus* S19 y revacunadas con S19 o M1-*luc* por diferentes vías.  
 1916 A- Grupo 1a; B- Grupo 1b; C- Grupo 2a y D- Grupo 2b.  
 1917

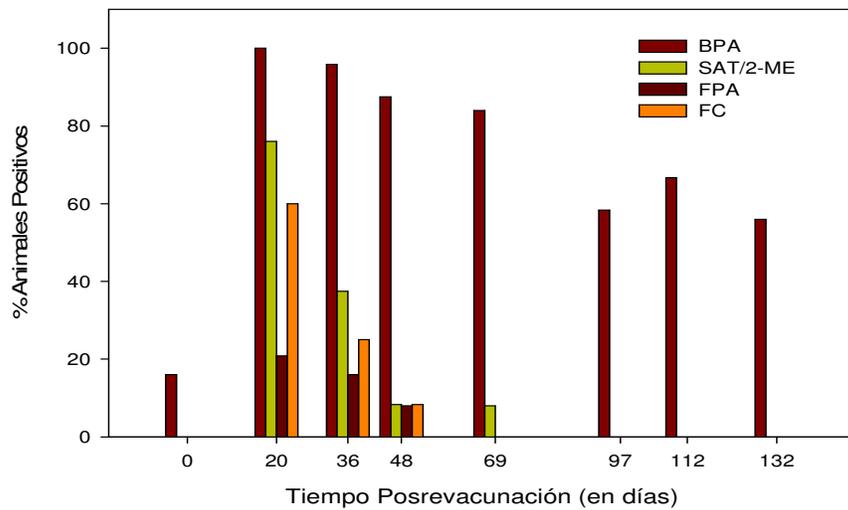
**A**



1918

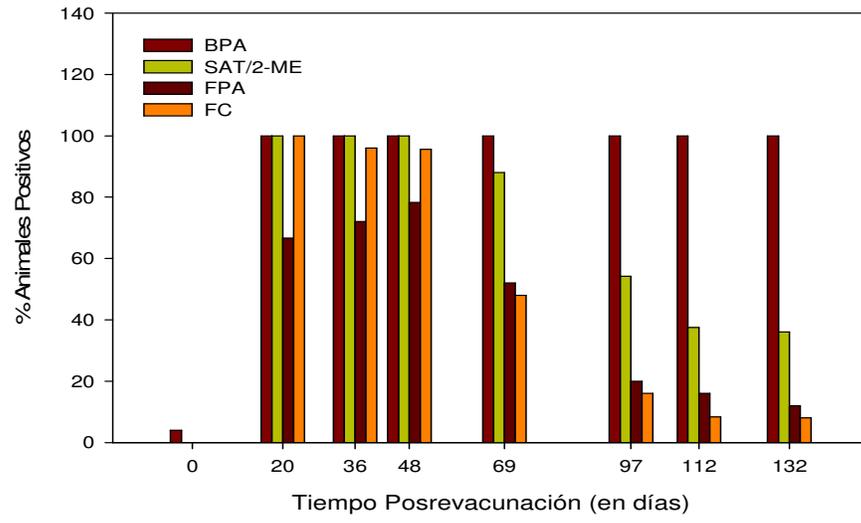
1919

**B**



1920

**C**

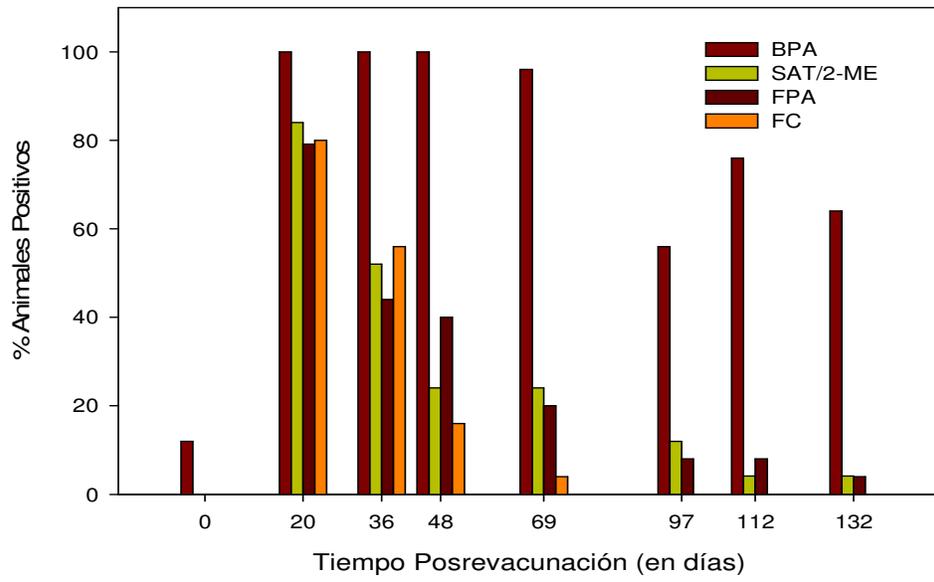


1921

1922

1923

**D**



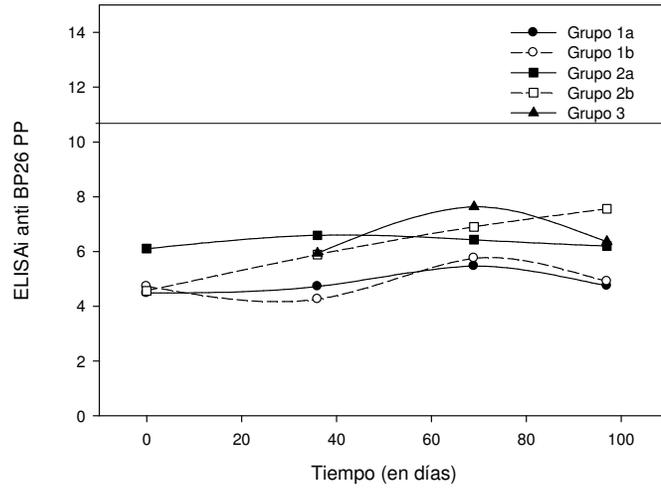
1924

1925

1926

1927

1928 **Figura 8:** Respuesta serológica post-revacunación dosis reducida en las vacas de los grupos  
1929 1a, 1b, 2a, 2b y 3 a la prueba de ELISAI Bp26 en los diferentes grupos (media).  
1930



1931

1932

1933 **7.4. DISCUSIÓN**

1934           En el presente ensayo se caracterizó la respuesta inmune anti LPS y anti BP26, post-  
1935 revacunación con una dosis reducida de M1-*luc* aplicada por dos vías diferentes, tanto en  
1936 vacas como en vaquillonas. Los animales utilizados para esta sección fueron vacunados de  
1937 terneros con la dosis estándar de S19 ( $15-30 \times 10^9$  UFC). Al momento de la revacunación  
1938 (transcurridos entre 5 y 7 meses para el caso de las vaquillonas y más de 2 años en el caso de  
1939 las vacas) presentaron algunos animales reacciones positivas residuales a la prueba de BPA  
1940 (principalmente en el grupo de las vaquillonas) pero negativas al resto de las pruebas  
1941 serológicas clásicas. Por lo tanto, y en base a la interpretación conjunta de las pruebas, en el  
1942 momento de la revacunación todos los animales eran serológicamente negativos a brucelosis.

1943           La cinética de anticuerpos observada en las pruebas clásicas (BPA, SAT y 2-ME) fue  
1944 similar en los animales revacunados con S19 o con M1-*luc*, a iguales vías y categoría de  
1945 animales consideradas, coincidiendo con las observaciones realizadas en la sección anterior  
1946 cuando las dosis completas de estas dos cepas bacterianas fueron utilizadas en terneras.

1947           En nuestro trabajo se observaron reactores positivos a la prueba de BPA utilizada  
1948 como tamiz al culminar ambos ensayos (a los 144 días PRV en las vaquillonas y 132 días  
1949 PRV en las vacas) en diferentes proporciones según el grupo experimental. Dicha situación es  
1950 discordante con la observada por Hendricks *et al.* (246) quienes revacunaron adultos con dos  
1951 dosis reducidas  $0.3 \times 10^9$  y  $1 \times 10^9$  y a los tres meses PRV todos los animales testeados fueron  
1952 negativos para la prueba tamiz de tarjeta. Aunque dichos autores no encontraron diferencias  
1953 significativas entre las dos dosis utilizadas, las dosis aquí evaluadas fueron superiores y eso  
1954 podría explicar la permanencia de los títulos residuales en la prueba tamiz. En cuanto al resto  
1955 de las pruebas serológicas anti LPS, la menor permanencia de títulos residuales se dio  
1956 cuando se RV animales jóvenes (por ambas vías) y adultos por vía conjuntival, coincidiendo

1957 con las observaciones realizadas por Ferrari *et al.* (247). Sin embargo, al RV adultos por vía  
1958 subcutánea los títulos serológicos anti LPS fueron más persistentes, encontrando al finalizar el  
1959 ensayo un 70% y 35% de animales de los grupos vacunados con M1-*luc* y S19,  
1960 respectivamente, positivos a las pruebas de SAT y 2-ME. En cuanto a las pruebas de FPA y  
1961 FC, si bien el porcentaje de seroreactores fue mucho menor (no superó el 20% en ninguno de  
1962 los dos grupos) se encontraron animales con títulos residuales. Nuestros hallazgos coinciden  
1963 con los de Coelho Jardim *et al.* (248) utilizaron la cepa S19 en una dosis reducida de  $6 \times 10^8$   
1964 UFC para revacunar hembras adultas encontrando seroreactores positivos con todas las  
1965 pruebas serológicas utilizadas (BPA, ELISAI, SAT, 2 ME y FC) a los tres meses PRV. Por  
1966 otro lado, Odeon *et al.* (39) reportaron que de 203 vacas adultas revacunadas con S19 por vía  
1967 SC con la misma dosis utilizada en este trabajo ( $3.1 \times 10^9$  UFC) permanecieron positivas al  
1968 año PRV el 12.3% y 12.8% a SAT y 2-ME, respectivamente.

1969        Los resultados de FC observados en las vaquillonas a pesar de haber utilizado una  
1970 dosis de revacunación más elevada coinciden con los de Alton and Corner (244) quienes  
1971 evaluaron en vacas adultas una dosis de S19 de  $2,25 \times 10^8$  UFC y a los 3 meses PRV los  
1972 animales no presentaron títulos a la prueba de FC. Sin embargo, como fue expuesto  
1973 anteriormente esta situación no se dio en el grupo de los animales adultos donde algunos  
1974 permanecían positivos al culminar el ensayo a los 132 días PRV. Títulos residuales a la  
1975 prueba de FC fueron observados también (aunque en mayor proporción) por Aparicio Bahena  
1976 *et al.* (249) quienes a los 270 días PRV con una dosis reducida de S19 de la misma  
1977 concentración que la aquí utilizada, encontraron 17/45 (38%) animales positivos. Estos  
1978 hallazgos, resaltan el hecho de que el uso de una dosis reducida en la revacunación no es  
1979 suficiente herramienta para eliminar el problema de las reacciones persistentes ocasionales.

1980            Respecto de la diferencia entre las vías de inoculación utilizada, los animales  
1981 vacunados por vía conjuntival tuvieron una permanencia de títulos menor que los revacunados  
1982 por vía subcutánea. Los resultados que aquí se presentan son concordantes con los obtenidos  
1983 por varios autores que al utilizar la cepa S19 por vía conjuntival para la revacunación de  
1984 animales previamente vacunados por vía subcutánea o administrando dos dosis conjuntivales,  
1985 obtuvieron una baja respuesta serológica y buena protección ya sea en animales de laboratorio  
1986 (250), vaquillonas (35, 251) o vacas adultas (252). En los pequeños rumiantes luego de la  
1987 vacunación con Rev1 la cepa vacunal se disemina rápidamente cuando es administrada por  
1988 vía subcutánea y la infección es generalizada en la mayoría de los animales a las dos semanas  
1989 posvacunación, sin embargo al ser administrada de manera conjuntival la infección se limita a  
1990 los linfonodos de la cabeza desencadenando una respuesta inmune humoral de menor  
1991 intensidad y duración (253). En el presente trabajo la utilización de la vía conjuntival, si bien  
1992 desencadenó una persistencia de títulos menor que la subcutánea en las pruebas serológicas  
1993 anti LPS en la mayoría de los animales de ambas categorías, ante una misma dosis vacunal los  
1994 animales reaccionaron de manera más heterogénea que cuando se utiliza la vía subcutánea e  
1995 incluso algunos animales no levantaron títulos luego de revacunados, estas observaciones han  
1996 sido realizadas también por Fensterbank and Plommet (35).

1997            En cuanto a la respuesta serológica anti BP26, la misma fue muy variable en las  
1998 vaquillonas sin guardar una relación con la vía de inoculación ni con la cepa vacunal evaluada  
1999 y sin diferencias con el grupo control no revacunado. La media de la respuesta anti BP26 en  
2000 todos los grupos de la categoría de vaquillonas se presentó muy cerca o superó el punto de  
2001 corte establecido en un PP=10. Por otro lado, al ser medida en vacas, la reacción anti BP26  
2002 fue de menor intensidad (el promedio de los animales no superó un PP=8) y los animales que  
2003 se presentaron con reacciones positivas a la prueba de ELISA anti BP26 los hicieron durante

2004 todo el ensayo de manera uniforme. En trabajos previos se ha descrito que si bien el gen  
2005 *bp26* está presente en todas las cepas de *Brucella*, los sueros de bovinos vacunados con S19 y  
2006 con serología positiva para LPS no presentan anticuerpos contra la proteína BP26 (40). De  
2007 acuerdo con estas observaciones, en ninguna de las categorías aquí evaluadas se observaron  
2008 diferencias entre los grupos revacunados (tanto con M-1*luc* como con S19) y controles sin  
2009 revacunar. Posteriormente en la discusión general de la tesis se tratará este punto de manera  
2010 más exhaustiva.

2011 Si bien el objetivo del presente trabajo no fue evaluar la protección conferida por la  
2012 revacunación en vacas y vaquillonas, trabajos previos han demostrado que la utilización de la  
2013 revacunación con DR de S19 en rodeos infectados ah permitido en rodeos infectados  
2014 disminuir la incidencia de brucelosis en un 90% o más después de un año, aumentando la  
2015 resistencia a los abortos, con escasos títulos residuales y baja infección vacunal,  
2016 independientemente de la vía y concentración de la DR empleada (245, 254). Varios autores  
2017 han establecido que la dosis protectora de S19 se encuentra entre  $10^{10}$  y  $10^7$  UFC (255, 256).  
2018 Crawford *et al.* (163) determinaron que el riesgo relativo de desarrollar brucelosis en animales  
2019 adultos expuestos a *B. abortus* 2308 decrece cuando la dosis de S19 se incrementa. Así  
2020 estimaron que vacunando vaquillonas por vía subcutánea el riesgo relativo se redujo de 1 para  
2021 los controles no vacunados a 0.38, 0.15 y 0.06 para los vacunados con una dosis de  $10^8$ ,  $10^9$  o  
2022  $10^{10}$  de S19, respectivamente. Considerando los resultados coincidentes en cuanto a  
2023 protección entre las dos vacunas al ser utilizadas en terneras (en el ensayo 1), podríamos  
2024 especular que en el caso de la revacunación con dosis reducida en animales adultos la  
2025 protección sería también de similar intensidad entre ambas vacunas.

2026 La utilización de la revacunación con dosis reducida en animales adultos podría ser  
2027 útil en alguna de las siguientes circunstancias: a) rodeos con más de 200 animales

2028 crónicamente infectados; b) rodeos con infección aguda, con tormenta de abortos, con un alto  
2029 potencial de exposición en el inicio del brote; c) rodeos no infectados, pero con alto riesgo de  
2030 infección (248). Sin embargo, a pesar de los efectos beneficiosos del uso de estos métodos de  
2031 revacunación, títulos de anticuerpos residuales son inducidos y la necesidad de contar con una  
2032 vacuna o un método de diagnóstico que nos permita discriminarlos de los de infección es de  
2033 gran utilidad.

2034       En nuestro país, donde el uso de la cepa RB51 no está permitido, contar con una  
2035 herramienta que nos permita aumentar el nivel inmunitario en animales adultos sería de suma  
2036 importancia. En el presente trabajo, ambas cepas vacunales se comportaron de igual manera al  
2037 ser aplicadas como dosis reducida por diferentes vías en hembras bovinas de diferentes  
2038 categorías. Sin embargo, la particularidad de la M1-*luc* que hace posible su utilización  
2039 adosada a un sistema de diagnóstico específico permitiría diferenciar los títulos vacunales  
2040 residuales de vacunación de los de infección. Así, la utilización de la cepa M1-*luc* se presenta  
2041 como una herramienta útil para la revacunación de adultos en rodeos problema en los cuales  
2042 sea imperioso aumentar la resistencia a la enfermedad. No obstante, nuevos trabajos son  
2043 necesarios para evaluar la protección conferida por la revacunación con dosis reducida por las  
2044 diferentes vías y así poder concluir sobre la estrategia de revacunación más adecuada.

2045

2046 **8. DISCUSION GENERAL**

2047

2048 La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica que ocasiona graves pérdidas  
2049 económicas y humanas, su erradicación depende de una serie de acciones conjuntas, entre las  
2050 más importantes se encuentran: la identificación de los animales, el control de los  
2051 movimientos de ganado, una elevada cobertura de vacunación y el monitoreo del estatus de  
2052 los rodeos por serología y la posterior eliminación de los animales infectados.

2053 En Argentina, uno de los pilares del Plan Nacional de Control y Erradicación de la  
2054 Brucelosis Bovina promovido por el SENASA, es la vacunación de todas las terneras de entre  
2055 3 y 8 meses de edad con la vacuna elaborada con la cepa S19. La vacunas elaboradas con  
2056 *Brucella abortus* S19 para los bovinos y *B. melitensis* Rev1 para ovejas y cabras, son las  
2057 mejores vacunas disponibles, sin embargo podrían inducir abortos cuando se usan en animales  
2058 preñados y son virulentas para el hombre. Además, y de la misma manera que las cepas de  
2059 campo, estas cepas vacunales poseen en su superficie LPS liso cuya región inmunodominante  
2060 (el antígeno O) induce anticuerpos difíciles de distinguir de los producidos durante la  
2061 infección (158). Esta situación complica el diagnóstico serológico ya que las pruebas usadas  
2062 comúnmente detectan anticuerpos contra el polisacárido O.

2063 Uno de los objetivos principales en las investigaciones sobre brucelosis animal es el  
2064 desarrollo de nuevas vacunas las cuales, además de otorgar una inmunidad efectiva y duradera  
2065 en el huésped, deberían permitir diferenciar fácilmente a los animales vacunados de los  
2066 infectados. Con el fin de superar las desventajas de la S19 fue desarrollada la vacuna con cepa  
2067 viva atenuada *Brucella abortus* RB51, cepa rugosa que carece de antígeno O presente en  
2068 todas las especies lisas de este género y por lo tanto no induce la formación de anticuerpos  
2069 contra este antígeno (169). En Argentina, el empleo de la cepa RB51 se autorizó en 1998 para

2070 aplicarse únicamente en bovinos hembras mayores de 10 meses de edad a criterio del  
2071 establecimiento, siendo obligatoria la continuidad de la vacunación con S19 (SENASA,  
2072 Resolución 69/98). Posteriormente, en el año 2002 su uso fue derogado, no estando  
2073 actualmente permitido en nuestro país (SENASA, Resolución 1048/2002).

2074         Con el fin de desarrollar una vacuna que supliera las falencias de la S19, se iniciaron  
2075 los estudios con la mutante M1-*luc* como una alternativa al problema planteado. En los  
2076 primeros trabajos realizados se observó que las mutantes se comportan igual que la cepa S19  
2077 en cuanto a tiempo de crecimiento en medios de cultivos, morfología y a la virulencia y  
2078 persistencia en bazos de ratones (17, 41). El modelo ratón es usado frecuentemente como un  
2079 paso preliminar en los análisis de inmunogenicidad y protección de vacunas contra la  
2080 brucelosis, debido al alto costo y al tiempo prolongado que significa realizar ensayos en el  
2081 hospedador natural (257). Sin embargo, los ratones son relativamente resistentes a la  
2082 brucelosis y a muchos estímulos no específicos, como el estrés y la respuesta inflamatoria que  
2083 pueden inducir algún grado de aumento en la resistencia o la susceptibilidad en estos  
2084 animales.

2085         Por esta razón, una vez superados los ensayos en ratones con resultados promisorios,  
2086 se decidió evaluar la performance de la vacuna en su huésped definitivo. En este trabajo de  
2087 tesis se investiga la respuesta inmune y la protección conferida por la mutante de la cepa S19  
2088 *Brucella abortus* M1-*luc* en bovinos. Con el fin de estudiar el comportamiento inmunogénico  
2089 y establecer los posibles usos de dicha mutante, se planteó investigar su eficiencia en  
2090 diferentes categorías de animales y bajo diferentes esquemas de vacunación.

2091         Inicialmente se evaluó la respuesta inmune y protección otorgada por la M1-*luc*  
2092 utilizada en un plan de vacunación de terneras similar al utilizado en S19, desafiando luego  
2093 los animales a los 6 meses de preñez con una cepa de *B. abortus* de reconocida patogenicidad.

2094 Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que la cepa M1-*luc* desencadena una  
2095 respuesta humoral a las pruebas serológicas clásicas de las mismas características que las de  
2096 su parenteral S19. Luego del desafío no hubo diferencias en cuanto a la tasa de abortos e  
2097 infección entre ambos grupos vacunados, aunque se observó una tendencia no significativa, a  
2098 la mayor protección en los animales vacunados con la cepa mutante. Una tendencia similar  
2099 fue observada cuando se desafiaron con *B. melitensis* H38 ovejás preñadas vacunadas con  
2100 CGV26 (una mutante de *B. melitensis* Rev.1 que no expresa BP26) y se compararon los  
2101 resultados con los del grupo vacunado con Rev.1 (230).

2102 Como se esperaba, la falta de expresión de la BP26 no afectó la capacidad de proteger  
2103 de la cepa S19, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente con la mutante de S19  
2104 M1 (S19 *bp26::kan*) en ratones BALB/c (47) y con la mutante CGV26 en ovejás desafiadas  
2105 con *B. melitensis* o *B. ovis* (258). Estos resultados sugirieron que la proteína BP26 no es  
2106 esencial en la inducción de la protección, aunque los resultados obtenidos al vacunar con  
2107 ADN que codifica para BP26 han demostrado inducir protección en ratones desafiados con *B.*  
2108 *melitensis* 16M (259).

2109 Posteriormente se evaluó la respuesta inmune y protección otorgada por la cepa M1-  
2110 *luc* en toros adultos, en comparación con la otorgada por cepa RB51. Trabajos previos indican  
2111 que la cepa vacunal de *B. abortus* S19 al ser utilizada en machos desencadena una respuesta  
2112 inmune y alteraciones patológicas similares a las producidas por las cepas patógenas (31, 32,  
2113 33). Por esta razón se decidió comparar la respuesta de la M1-*luc* con la de RB51 cuyos  
2114 antecedentes la proponían como una cepa inocua para su utilización en esta categoría de  
2115 animales (174). Si bien en nuestro ensayo no se logró concluir acerca de la protección otorgada  
2116 por las cepas vacunales, se comprobó la eliminación de la cepa vacunal RB51 a través de semen,

2117 situación que si bien había sido sugerida por algunos autores no había sido comprobada hasta el  
2118 momento (231).

2119 Por último, se investigó la respuesta inmune de la M1-*luc* al ser utilizada para la  
2120 revacunación de hembras bovinas, de diferentes categorías y por diferentes vías, vacunadas  
2121 previamente con S19 según el plan oficial de vacunación. Se comprobó en este ensayo que la  
2122 cepa M1-*luc* se comporta de manera similar a su parenteral S19 en cuanto a respuesta inmune  
2123 anti LPS cuando es utilizada para revacunar tanto vacas como vaquillonas ya sea por vía  
2124 conjuntival o subcutánea.

2125 En general, en los ensayos 1 y 3 la respuesta inmune humoral anti LPS en bovinos  
2126 vacunados o revacunados con M1-*luc* resultó similar, tanto los títulos como la cinética de  
2127 evolución de anticuerpos, confirmando que la estructura del antígeno O no se ve afectada en  
2128 la cepa mutante.

2129 En cuanto al uso de la proteína BP26 como antígeno de diagnóstico, en trabajos  
2130 realizados previamente se determinó que la proteína periplásmica BP26 es inmunogénica  
2131 durante la infección de distintas especies animales con *B. abortus* y *B. melitensis* (40, 70, 74,  
2132 197). Las diferencias en la antigenicidad pueden ser una desventaja a la hora de seleccionar  
2133 una proteína antigénica para el diagnóstico de infecciones causadas por varias especies del  
2134 mismo género. Se ha demostrado que el polimorfismo del ADN en genes que codifican para  
2135 otras proteínas inmunogénicas de *Brucella* conduce a diferencias en la antigenicidad de las  
2136 proteínas (69, 260). Si bien en algún momento se identificaron diferencias entre el ADN de  
2137 *bp26* de *B. abortus* S19 y de *B. melitensis* 16M (40, 69, 74). Posteriormente, Seco-Mediavilla  
2138 *et al.* (261) encontraron la misma secuencia de nucleótido para *bp26* en las cepas de  
2139 referencia de *B. melitensis* y *B. abortus*, y sólo una substitución de un nucleótido en *B. suis* y  
2140 el otro en *B. ovis*. Tampoco se encontraron diferencias para el gen *bp26* en *B. abortus*, *B.*

2141 *abortus* S19 y *B. abortus* RB51. Según los resultados presentados por estos autores, BP26 es  
2142 una proteína sumamente conservada en el género *Brucella*. Por ello, la proteína BP26  
2143 recombinante de una especie de *Brucella* podría ser usada para el diagnóstico serológico de  
2144 infecciones causadas por todas las especies *Brucella*, siempre que el huésped animal sea  
2145 capaz de inducir una respuesta inmune contra este antígeno.

2146 Además, la posibilidad de emplear una BP26 recombinante para el diagnóstico de  
2147 brucelosis en lugar de la proteína extraída de *Brucella sp.*, presentaría varias ventajas, ya que  
2148 estaría disponible sin otros antígenos de *Brucella sp.* que interfiriesen en la prueba  
2149 diagnóstica, la extracción de la proteína sería más rápida y eficiente; y por último, y no menos  
2150 importante, se evitaría la manipulación de brucellas patógenas.

2151 En el presente trabajo se analizaron los sueros mediante un inmunoensayo (ELISAi  
2152 BP26) desarrollado previamente (197). En el primer ensayo aquí presentado, el punto de corte  
2153 del ELISAi BP26 fue determinado de manera de optimizar la sensibilidad y especificidad del  
2154 test y los resultados fueron expresados en PP con el fin de referir todos los resultados al suero  
2155 control positivo de placa. Para la determinación del punto de corte se seleccionaron los sueros  
2156 obtenidos a los 4 meses posdesafío, ya que previamente ha sido reportado que la producción  
2157 de anticuerpos contra la proteína BP26 es inducida después de un periodo de tiempo  
2158 relativamente largo luego de la infección y, por ende, la respuesta serológica anti-BP26  
2159 debería ir incrementando con el progreso de la infección (258).

2160 Como se comentó anteriormente, en trabajos previos se ha descrito que si bien el gen  
2161 *bp26* se encuentra presente en todas las especies de *Brucella*, los sueros de los bovinos  
2162 vacunados con S19 que presentan títulos anti LPS no presentan anticuerpos contra esta  
2163 proteína mientras que los sueros de los animales infectados naturalmente si lo hacen (40).

2164           En el presente trabajo los resultados posvacunación del ELISAI BP26 en general  
2165 fueron aceptables, siendo la mayoría de los animales evaluados negativos a dicha prueba en  
2166 los diferentes momentos posvacunación, excepto en el ensayo 3 donde la media de las  
2167 vaquillonas revacunadas tanto con la mutante como con la S19 presentaron valores de PP muy  
2168 cercanos o por encima del punto de corte al comenzar el trabajo. En cuanto a los toros  
2169 vacunados con RB51, tampoco presentaron títulos a ELISAI BP26.

2170           Los resultados obtenidos y los antecedentes sugieren que la BP26 sería una proteína  
2171 útil para el diagnóstico serológico en bovinos, sin embargo para confirmarlo sería necesario  
2172 que los sueros de los animales infectados con cepas virulentas de *B. abortus* presenten títulos  
2173 de anticuerpos contra dicha proteína. Al respecto, cuando se evaluaron los sueros de los  
2174 animales infectados experimentalmente en el presente trabajo, los resultados del ELISAI  
2175 BP26 fueron variables sobre todo en la evaluación realizada sobre hembras infectadas,  
2176 presentando una sensibilidad baja (45,4%) y una especificidad del 84,6%, existiendo una baja  
2177 concordancia con el grado de infección de los animales. En nuestro trabajo no pudimos  
2178 alcanzar los adecuados niveles de sensibilidad citados por otros autores que trabajaron con  
2179 sueros de animales infectados de manera natural (40). Una baja respuesta serológica a BP26  
2180 fue también observada en carneros, luego del desafío con *B. ovis* (cepa que expresa esta  
2181 proteína) solamente el 60% de los controles no vacunados desarrollaron respuesta positiva al  
2182 ELISAI aunque el desafío resultó en el 100% de infección (258).

2183           Diferencias en la respuesta inmune anti BP26 entre animales infectados natural o  
2184 experimentalmente ha sido citada por otros autores. Cloeckert *et al.* (70) evaluaron la  
2185 respuesta a anticuerpos anti BP26 en ovejas infectadas naturalmente y experimentalmente  
2186 con *B. melitensis* y en animales vacunados con *B. melitensis* Rev1. Si bien estos autores  
2187 reportan una sensibilidad del 100% en los animales infectados naturalmente con aislamiento

2188 de *B. melitensis* y serología positiva, indican que en las ovejas infectadas experimentalmente  
2189 con *B. melitensis* H38, la respuesta de anticuerpos a BP26 fue retrasada y mucho más débil  
2190 que la respuesta al antígeno O del LPS que fue de similar magnitud en animales ambos  
2191 grupos. Del mismo modo, en los animales vacunados con *B. melitensis* Rev.1 la respuesta de  
2192 anticuerpos a BP26 fue débil y heterogénea, con algunas ovejas que mostraron reactividad de  
2193 anticuerpos en el I-ELISA mientras que otras no lo hacían. En el mismo trabajo, algunos  
2194 sueros de ovejas libres de *Brucella* presentaron reacciones falsas positivas. Otros autores  
2195 infectando ovejas experimentalmente con *B. melitensis*, obtuvieron una pobre sensibilidad del  
2196 ELISAi BP26 en los controles no vacunados (60%), aunque la especificidad fue del 100%  
2197 (230).

2198 La respuesta serológica a otras proteínas recombinantes (Omp10, Omp16, Omp19,  
2199 Omp25, Omp36, p15, p17 y p39) ha sido evaluada en sueros de animales infectados en forma  
2200 natural o experimental. Las mejores respuestas a estas proteínas fueron observadas en los  
2201 sueros de animales de donde la brucelosis es endémica y habían sido infectados naturalmente.  
2202 Por otro lado, los sueros de los animales infectados experimentalmente presentaron una  
2203 respuesta antiproteica menor (64). Estas conclusiones corroboran nuestros resultados y los  
2204 obtenidos por otros investigadores (70, 230).

2205 Por lo tanto, está claro que el ELISAi BP26 debería mejorarse con el fin de aumentar  
2206 su sensibilidad y especificidad. Al respecto, Seco-Mediavilla *et al.* (261), consideraron que los  
2207 resultados falsos positivos podrían ser disminuidos o eliminados si en lugar de trabajar con la  
2208 proteína entera se seleccionaran fragmentos inmunodominantes de la proteína para la prueba  
2209 de ELISA. Dichos investigadores, identificaron epitopes inmunodominantes de BP26 de *B.*  
2210 *melitensis* y determinaron que utilizando un fragmento de la dicha proteína se elimina la  
2211 reactividad en sueros de ovejas negativas manteniendo la reactividad de los sueros de

2212 animales positivos. Por otro lado, trabajos previos han demostrado que una combinación de  
2213 proteínas inmunodominantes de *Brucella* sería necesaria para detectar mayor cantidad de  
2214 animales infectados (262, 263, 264; 265). La suma de ambas estrategias podría ser un camino  
2215 a seguir con el fin de mejorar la performance de dicha prueba. Si este objetivo fuese logrado,  
2216 el ELISA con la proteína BP26 (y eventualmente otras proteínas más) como antígeno podría  
2217 ser utilizado en brucelosis bovina como una prueba complementaria a las basadas en la  
2218 detección de S-LPS. De esta manera, asociada a una adecuada estrategia diagnóstica, el uso de  
2219 la cepa mutante M1-*luc* podría ayudar a reducir los problemas de interferencia serológica  
2220 ocasionados por la vacunación con S19.

2221 El desarrollo de nuevas vacunas de brucelosis que superen las desventajas de las  
2222 actuales es un tema de interés mundial. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de  
2223 Tesis demuestran que la M1-*luc* otorga un adecuado nivel de protección en vacas y su  
2224 comportamiento inmunogénico es similar al de la S19 en las pruebas serológicas anti LPS.  
2225 Consideramos que futuros trabajos deberían estar orientados a mejorar el desempeño de una  
2226 prueba diagnóstica que nos permita diferenciar entre animales vacunados e infectados.  
2227 Finalmente, destacamos como aporte de la presente Tesis el hecho de haber evaluado por  
2228 primera vez el rendimiento de la vacuna *B. abortus* M1-*luc* en su huésped definitivo.

2229

2230 **9. REFERENCIAS**

2231

2232 1. IICA. Informe Anual 2008. IICA Bs. As. 2009.

2233 2. Samartino LE. Brucellosis in Argentina. Vet Microbiol 2002; 90:71-80.

2234 3. MAA Bs. As. Entes de Lucha Antiaftosa, INTA Balcarce, Fundación COREPRO.

2235 1999.

2236 4. Campero CM, Odriozola E, Odeon AC, Casaro AP. The causes of abortion and death

2237 occurring in calves during their first week of life in the south east of Buenos Aires

2238 province, Argentina. VII International Symposium of Veterinary Laboratory

2239 Diagnosticians. Buenos Aires, 8-11 Nov. 1994, p.:104,

2240 5. Campero CM, Odeon AC, Chayer R, Cipolla AL, Moreira A, Marcone J, Caracino M,

2241 Alejo D, Kaiser G, Fernandez Sainz I. Abortos y pérdidas neonatales en bovinos del

2242 sudeste de la provincia de Buenos Aires. Rev Arg Prod Anim 1995; 15: 751-753.

2243 6. Campero CM, Moore DP, Odeon AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine

2244 abortion in Argentina. Vet Res Com 2003; 27:359-369.

2245 7. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. Sexto Informe. Organización

2246 Mundial de la Salud. Ginebra. 1986; p: 46-48, 60-62.

2247 8. Corner LA. Three aspects of bovine brucellosis: epidemiology, the role of bulls and

2248 vaccines. New South Wales Vet Proc 1983; 19: 47-48.

2249 9. Lambert G, Manthei CA, Deyoe BL. Studies on *Brucella abortus* infection in bulls.

2250 Am J Vet Res 1963; 24: 1152-1157.

- 2251 10. Kumar R, Quader SA, Aruchalam TN. Incidence of brucellosis in bulls and bullocks  
2252 in Tamil Nadu. Cheiron Tamil Nadu J Vet Sc. Anim Huns 1974; 3: 124-127.
- 2253 11. Mukerji, A. Bull as a spreader of contagious abortion with special reference to the  
2254 methods of diagnosis of brucellosis in bull. Indian Vet J 1960; 37: 436-439.
- 2255 12. Cedro VCF, Cisale HO, Forti de Menaldo LR, Alvarez NO. Brucelosis en toros.  
2256 Títulos aglutinantes y diagnóstico bacteriológico. Rev Invest Agrop INTA, Buenos  
2257 Aires, Serie 4. Patología Animal 1967, 4: 1-8.
- 2258 13. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. Vet  
2259 Microbiol 2010; 140: 392-398.
- 2260 14. Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde, RA. Identification and characterization  
2261 of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: Role of the lipopolysaccharide in  
2262 virulence and intracellular multiplication. Infec Immun 2000; 68: 5716-5723.
- 2263 15. Lapaque N, Moriyón I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a  
2264 virulence factor. Current Opinion Microbiol 2005; 8: 60-66.
- 2265 16. World Health Organization. The development of new/improved Brucellosis vaccines:  
2266 Report of WHO meeting. Geneva, Zwitzerland, 11-12 December 1997.
- 2267 17. Boschiroli L, Cravero S, Arese A, Rossetti OL. Construcción y caracterización de una  
2268 mutante de *Brucella abortus* por inactivación de un gen que codifica una proteína de  
2269 26 kDa. Arch Med Vet 1995; XXVII: 103-111.
- 2270 18. Oñate A, Folch H. Proteínas totales de *Brucella abortus* cepa 19 y sus contaminantes.  
2271 Arch Med Vet 1989; XXI: 103-108.

- 2272 19. SENASA. Programa Nacional de Control y/o Erradicación de la Brucelosis Bovina.  
2273 República Argentina, Secretaría de Agricultura y Ganadería. Resolución N°73. 1982.
- 2274 20. Acha PN, Szyfres B. Bacteriosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles al  
2275 hombre y los animales. Segunda edición. OPS. E.U.A. 1986; p: 14-36.
- 2276 21. Alton GG. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. Aust Vet J  
2277 1978; 54:551-557.
- 2278 22. Di Lorenzo C. Brucelosis bovina: vacunación con cepa 19. II parte. Rev Med Vet  
2279 1986; 67:95-98.
- 2280 23. Torioni de Echaide S, Aguirre DH, Späth EJA. Respuesta serológica a la vacunación  
2281 con *Brucella abortus* cepa 19 en bovinos *Bos taurus* (Hereford y Criolla) y *Bos*  
2282 *indicus* (Nelore). Rev Med Vet 1988; 69:28-33.
- 2283 24. Bringley Morgan WJ, Mackinnon DJ. Brucellosis. In: Fertility and Infertility in  
2284 domestic animals. Edited by J. A. Laing. London. 1979; pp: 186-189.
- 2285 25. Herr S, Roux D, Pieterse M. The reproducibility of results in bovine brucellosis  
2286 serology and their correlation with isolation of *Brucella abortus*. Onderstepoort J Vet  
2287 Res 1982, 49:79-83.
- 2288 26. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol 2002; 90: 447-459.
- 2289 27. Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA, Jeffrey M, Bradley R. Arthropathy associated with  
2290 *Brucella abortus* strain 19 vaccination in cattle. I. Examination of field cases. Br Vet J  
2291 1989; 145: 337.
- 2292 28. Duffield BJ, Streeten TA, Spinks GA. Isolation of *Brucella abortus* from

- 2293           supramammary lymph nodes of cattle from infected herds vaccinated with low dose  
2294           strain 19. Aust Vet J 1984; 61: 411-412.
- 2295   29.   Nicoletti P. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and  
2296           prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. JAVMA 1981; 178: 143-  
2297           145.
- 2298   30.   Thomas EL, Bracewell CD, Corbel MJ. Characterization of *Brucella abortus* strain 19  
2299           cultures isolated from vaccinated cattle. Vet Rec 1981; 108: 90-93.
- 2300   31.   Campero CM, Ladds PW, Hoffmann D, Duffield B, Watson D, Fordyce G.  
2301           Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of  
2302           bulls. Vet Immunol Immunopathol 1990; 24: 235-246.
- 2303   32.   Danks AG. *Brucella abortus* strain 19 and orchitis in a bull. Cornell Vet 1943; 33:  
2304           381-382.
- 2305   33.   Lambert G, Deyoe BL, Painter GM. Further studies on the persistence of *Brucella*  
2306           *abortus* strain 19 in bulls. Proc 69th Ann Meet U.S. Livestock Sanitary Association  
2307           1965; 125-130.
- 2308   34.   Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM Techniques for the brucellosis  
2309           laboratory. First Edition. INRA. Paris. 1988.
- 2310   35.   Fensterbank R, Plommet M. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of  
2311           strain 19 administered by the conjunctival route. IV. Comparison between two  
2312           methods of vaccination. Ann Rech Vet 1979; 10: 131-139.
- 2313   36.   Barton CE, Lomme JR. Reduce-dose whole herd vaccination against brucellosis: a review

- 2314 of recent experience. JAVMA 1980; 177: 1218-1220.
- 2315 37. Nicoletti P, Jones LM, Berman DT. Adult vaccination with standard and reduced  
2316 doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in dairy herd infected with brucellosis.  
2317 JAVMA 1978; 173: 1445-1449.
- 2318 38. Beckett FW, Mac Diarmid SC. Persistent serological titres following reduce dose  
2319 *Brucella abortus* strain 19 vaccination. Br Vet J 1987; 143: 477-478.
- 2320 39. Odeón AC, Campero CM, Moreira AR, Salamanco AG, Madrid AR, Zamora AS.  
2321 Revacunación con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19 en vacas de cría de la  
2322 región pampeana de la República Argentina. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1987; 6: 1051-  
2323 1062.
- 2324 40. Rossetti OL, Arese AI, Boschioli ML, Cravero SL. Cloning of *Brucella abortus* gene  
2325 and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for  
2326 diagnosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 165-169.
- 2327 41. Boschioli ML, Cravero SL, Arese AI, Campos E, Rossetti OL. Protection against  
2328 infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant. Infec Inmun 1997; 65:  
2329 798-800.
- 2330 42. Godfroid J, Cloeckert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-  
2331 Bastuji B, Letesson JJ. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery  
2332 of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging  
2333 zoonosis. Vet Res 2005; 36: 313-326.
- 2334 43. Nicoletti P. A short history of brucellosis. Vet Microbiol 2002; 90: 5-9.

- 2335 44. Rodríguez Valera Y, Ramírez Sánchez W, Antúnez Sánchez G, Pérez Benet F,  
2336 Ramírez Pérez Y, Igarza Pulles A. Brucelosis bovina, aspectos históricos y  
2337 epidemiológicos. Rev Electrónica de Veterinaria RedVet 2005;  
2338 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905.html>
- 2339 45. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella*  
2340 *abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the  
2341 alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. J Bacteriol 1990; 172: 3569–3576.
- 2342 46. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as  
2343 shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol 1985; 35: 292-295.
- 2344 47. Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T. Use of 16S rRNA  
2345 gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. J Clin  
2346 Microbiol 2004; 42: 3649-3654.
- 2347 48. Corbel MJ. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the  
2348 taxonomy of *Brucella*. Report of the meeting, 5 September Manchester 1986,  
2349 England. Int J Syst Bacteriol 1986; 38:450-452.
- 2350 49. Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F,  
2351 Kampfer P, Neubauer H, Cloeckeaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM,  
2352 Falsen E, Bahn P Gollner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nockler K. *Brucella*  
2353 *microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol  
2354 Microbiol 2008; 58: 375-382.
- 2355 50. Cloeckeaert A, Vizcaíno N, Paquet J-Y, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane  
2356 proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. Vet Microbiol 2002; 90: 229-247.

- 2357 51. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyon I. *Brucella* evolution and taxonomy. Vet Microbiol  
2358 2002; 90: 209-227.
- 2359 52. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. *Brucella ceti* sp. nov.  
2360 and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as  
2361 their preferred host. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 2688-2693.
- 2362 53. Robinson A, Melling J. Envelope structure and the development of new vaccines. J  
2363 Appl Bacteriol 1993; 74: 43S-51S.
- 2364 54. Moriyón I, Lopez-Goñi I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella*  
2365 *abortus* and *Brucella melitensis*. Internatl Microbiol 1998; 1: 19-26.
- 2366 55. Gomez Cardoso P, Costa Macedo G, Azevedo V, Costa Oliveira S. *Brucella spp*  
2367 noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system.  
2368 Microbial Cell Factories 2006; 5:13 doi:10.1186/475-2859-5-13.
- 2369 56. Moreno E, Pitt MW, Jones LM, Schurig GG, Berman DT. Purification and  
2370 characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. J  
2371 Bacteriol 1979; 138: 361-369.
- 2372 57. Dubray G. Protective antigens in brucellosis. Ann Inst Pasteur Microbiol 1987; 138:  
2373 84 – 87.
- 2374 58. Verstrete DR, Creasy MT, Caveney NT, Balwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer  
2375 membrane proteins of *Brucella abortus*: Isolation and characterization. Infect Immun  
2376 1982; 35: 979-989.
- 2377 59. Cloeckaert A, Jacques I, Limet JN, Dubray G. Immunogenic properties of *Brucella*

- 2378 *melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice. J Med Microbiol 1995; 42: 200-208
- 2379 60. Vizcaíno N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckert A. DNA polymorphism  
2380 at the *omp31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*,  
2381 and other species-specific markers. Vet. Microbiol 1997; 143: 2913-2921.
- 2382 61. Santos JM, Verstreat DR, Perera VI, Winter AJ. Outer membrane proteins from  
2383 rough strains of four *Brucella* species. Infect Immun 1984; 46: 188-194.
- 2384 62. Goldbaum FA, Rubbi CP, Wallach JC, Miguel SE, Baldi PC, Fossati CA.  
2385 Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring  
2386 antiprotein humoral immune responses. J Bacteriol 1992; 175: 4930-4935.
- 2387 63. Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, Fossati CA. Characterization of an 18-kilodalton  
2388 *Brucella* cytoplasmatic protein which appears to be a serological marker of active  
2389 infection of both human and bovine brucellosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 2141-  
2390 2145.
- 2391 64. Letesson JJ, Tibor A, Van Eynde G, Wansard V, Weynants V, Denoel P, Saman E.  
2392 Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight  
2393 purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent  
2394 assay. Clin Diag Lab Immun 1997; 4: 556-564.
- 2395 65. Zygmunt MS, Martin JC, Dubray G. Analysis of immune response: comparison of  
2396 immunoblots after isoelectrofocusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel  
2397 electrophoresis using cytoplasmatic protein extract from *Brucella*. FEMS Microbiol  
2398 Lett 1990; 70: 263-268.

- 2399 66. Bricker BJ, Tabatabai LB, Judge BA, Deyoe BL, Mayfield JE. Cloning, expression,  
2400 and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.* 1990; 58:  
2401 2935-2939.
- 2402 67. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Grépinet O. Nucleotide sequence  
2403 and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein  
2404 of *Brucella ovis*: evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species,  
2405 due to a deletion in the gene. *Infect Immun* 1996; 64: 2047–2055.
- 2406 68. De Fays K, Tibor A, Lambert C, Vinals C, Denoel P, De Bolle X, Wounters J,  
2407 Letesson JJ, Depiereux E. Structure and function prediction of the *Brucella abortus*  
2408 P39 protein by comparative modeling with marginal sequence similarities. *Protein*  
2409 *Eng* 1999; 12: 217-223.
- 2410 69. Cloeckaert A, Salih-Alj Debbah H, Vizcaíno N, Saman E, Dubray G, Zygmunt MS.  
2411 Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* *bp26* gene  
2412 coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 140:  
2413 139–144.
- 2414 70. Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaino N, Zygmunt MS. Use of recombinant BP26  
2415 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin Diagn*  
2416 *Lab Immunol* 2001; 8: 772-775.
- 2417 71. Debbah HS, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. Identification of sero-reactive  
2418 *Brucella melitensis* cytosoluble proteins which discriminate between antibodies  
2419 elicited by infection and Rev.1 vaccination in sheep. *Vet Microbiol* 1995; 44: 37–48.
- 2420 72. Debbah HS, Cloeckaert A, Bezard G, Dubray G, Zygmunt MS Enzyme-linked

- 2421 immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kDa protein for  
2422 serological differentiation between *Brucella melitensis*-infected and *B. melitensis*  
2423 Rev.1-vaccinated sheep. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3: 305–308.
- 2424 73. Debbarh HS, Zygmunt MS, Dubray G, Cloeckert A. Competitive enzyme-linked  
2425 immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26  
2426 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev.1 vaccinated  
2427 sheep. Vet Microbiol 1996; 53: 325–37.
- 2428 74. Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD, Snellings NJ, Rubin FA, Van de Verg LL, Hoover  
2429 D, Warren RL. Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding  
2430 Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human  
2431 brucellosis. Infect Immun 1996; 64: 2490–2499.
- 2432 75. Oliveira SC, Harms JS, Banai M, Splitter GA. Recombinant *Brucella abortus* proteins  
2433 that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4<sup>+</sup> T cells from  
2434 *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs.  
2435 Cell Immun 1996; 172: 262-268.
- 2436 76. Roop RM, Fletcher TW, Sriraganathan SM, Boyle SM, Schurig GG. Identification of  
2437 an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. Infect  
2438 Immun 1994; 62: 1000-1007.
- 2439 77. Vemulapalli R, Duncan AJ, Boyle SM, Toth TE, G Schurig. Cloning and sequencing  
2440 of *yajC* and *secD* homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune  
2441 responses to YajC in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. Infect Immun  
2442 1998, 66: 5684-5691.

- 2443 78. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, Godfroid J, Walravens K,  
2444 Letesson JJ. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by  
2445 vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG  
2446 oligodeoxynucleotides as adjuvant. Infect Immun 2001; 69: 4816-4822.
- 2447 79. Rosinha GM, Myioshi A, Azevedo V, Splitter GA, Oliveira SC. Molecular and  
2448 immunological characterization of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-  
2449 phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial  
2450 protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA  
2451 vaccine formulation. J Med Microbiol 2002; 51: 661-671.
- 2452 80. Oliveira SC, Zhu Y, Splitter GA. Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gamma-  
2453 irradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4+ T  
2454 cells. Immunology 1994; 83: 659-664.
- 2455 81. Cassataro J, Velikovskiy CA, Giambartolomei GH, Estein SM, Bowden RA, Bruno L,  
2456 Spitz M, Fossati CA. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant  
2457 ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. Vaccine 2002; 20:  
2458 1660-1669.
- 2459 82. Finlay B, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Mol Biol  
2460 Rev 1997; 61:136-169.
- 2461 83. Moreno E., Moriyon I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for  
2462 virulence. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 1 – 3.
- 2463 84. Baldwin CL, Winter AJ. Macrophages and *Brucella*. Immunol Semin 1994; 60:363-  
2464 380.

- 2465 85. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and intracellular growth of *Brucella*  
2466 *abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infect Immun 1990; 58:2320-2328.
- 2467 86. Ko J, Splitter G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current  
2468 understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.  
2469 Clin Microbiol Rev 2003; 16: 65-78.
- 2470 87. Sangari FJ, Aguero J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity an update. Microbiol  
2471 1996; 12: 207-218.
- 2472 88. Pei J, Turse JE, Wu Q, Ficht TA. *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage  
2473 oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the  
2474 macrophage. Infect Immun 2006; 74: 2667-2675.
- 2475 89. Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential role of  
2476 the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus* containing vacuole. Cell  
2477 Microbiol 2001; 3: 159-168.
- 2478 90. Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, De  
2479 Bolle X, Tibor A, Gorvel JP, Letesson JJ. Identification of *Brucella* spp. genes  
2480 involved in intracellular trafficking. Cell Microbiol 2001; 3: 487-497.
- 2481 91. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G,  
2482 Allardet-Servent A, Cazevieille C, Lavigne JP, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan  
2483 D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. Vet Microbiol 2002; 90: 341-348.
- 2484 92. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R,  
2485 Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP. Cyclic beta-1, 2-glucan is a *Brucella* virulence

- 2486 factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 2005; 6: 618-625.
- 2487 93. Neta ABC, Mol JPS, Xavier MN, Paixao TA, Lage AP, Santos RL. Pathogenesis of  
2488 bovine brucellosis. *Vet J* 2009; doi:10.1016/j.tvjl.2009.04.010.
- 2489 94. Ackermann MR, Cheville NF, Deyeoe BL. Bovine ileal dome lymphoepithelial cell:  
2490 endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol* 1988; 25: 28–35.
- 2491 95. Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. Mechanism of binding of *Brucella abortus* to  
2492 mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis.  
2493 *Vet Immun Immunop* 1994, 41: 295–306.
- 2494 96. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular  
2495 replication. *Vet Microbiol* 2002; 90: 281–297.
- 2496 97. Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Gorvel JP Invasion and intracellular trafficking of  
2497 *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect* 2000, 2: 829–835.
- 2498 98. Pizarro-Cerdá J, Meresse S, Parton RG, Van Der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi  
2499 I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and  
2500 replicates in the endoplasmic reticulum on nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*  
2501 1998; 66: 5711-5724.
- 2502 99. Porte F, Liautard JP, Kohler S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella*  
2503 *suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 1999;  
2504 67: 4041–4047.
- 2505 100. Anderson TD, Meador VP, Cheville NF. Pathogenesis of placentitis in the goat  
2506 inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet Pathol* 1986; 23:

- 2507 227–239.
- 2508 101. Samartino LE, Truax RE, Enright FM. Invasion and replication of *Brucella abortus* in  
2509 three trophoblastic cell lines. J Vet Med 1994, 41: 229-231.
- 2510 102. Corbeil LB, Blau K, Inzana TJ, Nielsen KH, Jacobson RH, Corbeil RR, Winter AJ.  
2511 Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. Infect Immun 1988, 56:3251–3261.
- 2512 103. Hoffmann EM, Houle JJ. Contradictory roles for antibody and complement in the  
2513 interaction of *Brucella abortus* with its host. Crit Rev Microbiol 1995; 21:153–163.
- 2514 104. Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Riranganathan N, Boyle SM,  
2515 Schurig GG, Hadfield TL, Hoover DL. Deletion of *wboA* enhances activation of the  
2516 lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Infect  
2517 Immun 2001, 69: 4407–4416.
- 2518 105. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding  
2519 H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. Microbes Infect 2001; 3: 43-48.
- 2520 106. Baldwin C, Roop II RM. *Brucella* infections and immunity. In: Opportunistic  
2521 intracellular bacteria and immunity. Ed. L.J. Paradise. Plenum Press, N.Y. 1999; pp:  
2522 266-271.
- 2523 107. Enright FM. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic  
2524 animals. In: Animal Brucellosis. Nielsen and Duncan Ed. CRC Press. Florida, U.S.A.  
2525 1990; Chapter12: 301-330.
- 2526 108. Eze MO, Yuan L, Crawford RM, Parnavitana CM, Hadfield TL, Bhattacharjee AK,  
2527 Warren RL, Hoover DL. Effects of opsonization and gamma interferon on growth of

- 2528            *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages *in vivo*. Infect Immun  
2529            2000, 68: 257-263.
- 2530    109.    Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocytederived  
2531            macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella*  
2532            *abortus*. Vet Immun Immunop 1992; 34: 291–305.
- 2533    110.    Barthel R, Feng J, Piedrahita JA, McMurray DN, Templeton JW, Adams LG. Stable  
2534            transfection of the bovine Nramp1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on  
2535            *Brucella abortus* survival. Infect Immun 2001; 69, 3110–3119.
- 2536    111.    Martínez R, Dunner S, Barrera G, Cañon J. Novel variants within the coding regions  
2537            of the Slc11A1 gene identified in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. J Anim Breed  
2538            Genet 2008; 125: 57–62.
- 2539    112.    Paixão TA, Poester FP, Carvalho Neta AV, Borges AM, Lage AP, Santos RL.  
2540            NRAMP1 3'UTR polymorphisms are not associated with natural resistance to  
2541            *Brucella abortus* in cattle. Infect Immun 2007; 75: 2493–2499.
- 2542    113.    Canning PC, Deyoe BL, Roth JA. Opsonin dependent stimulation of bovine neutrophil  
2543            oxidative metabolism by *Brucella abortus*. Am J Vet Res 1988, 49: 160-162.
- 2544    114.    Araya LN, Elzer PE, Rowe G, Enright FM, Winter AJ. Temporal development of  
2545            protective cell-mediated and humoral immunity in Balb/c mice infected with *Brucella*  
2546            *abortus*. J Immunol 1989; 143: 3330-3337.
- 2547    115.    Plommet M, Plommet AM. Immune serum mediated effects on brucellosis evolution  
2548            in mice. Infect Immun 1983; 41: 97-105.

- 2549 116. Araya LN, Winter AJ. Comparative protection of mice against virulent and attenuated  
2550 strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. Infect  
2551 Immun 1990; 58: 254-256.
- 2552 117. Bowden RA, Cloeckert A, Zygmunt MS, Dubray G. Outermembrane protein- and  
2553 rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against  
2554 *Brucella ovis*. J Med Microbiol 1995, 43: 344-347.
- 2555 118. Bowden RA, Cloeckert A, Zygmunt MS, Dubray G. Evaluation of immunogenicity  
2556 and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outermembrane protein  
2557 of *Brucella melitensis* (Omp25) expressed in *Escherichia coli*. J Med Microbiol 1998;  
2558 47:39-48.
- 2559 119. Winter AJ, Duncan JR, Santisteban CG, Douglas JT, Adams LG. Capacity of  
2560 passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus*  
2561 infection in mice. Infect Immun 1989, 57: 3438-3444.
- 2562 120. Elzer PH, Jacobson RH, Jones SM, Nielsen KH, Douglas JT, Winter AJ. Antibody-  
2563 mediated protection against *Brucella abortus* in BALB/c mice at successive periods  
2564 after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19.  
2565 Immunol 1994; 82: 651-658.
- 2566 121. Casadevall A. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. Trends  
2567 Microbiol 1998; 6: 102-107.
- 2568 122. Foster RA, Ladds PW, Husband AJ, Hoffman D. Immunoglobulins and  
2569 immunoglobulin-containing cells in the reproductive tract of rams infected with  
2570 *Brucella ovis*. Aust Vet 1988; 65: 37-40.

- 2571 123. Jiménez de Bagués MP, Elzer PH, Blasco JM, Marín CM, Gamazo C, Winter AJ.  
2572 Protective immunity to *Brucella ovis* in Balb/c mice following recovery from primary  
2573 infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect Immun* 1994; 62: 632-638.
- 2574 124. Oliveira SC, Soeurt N, Splitter GA. Molecular and cellular interactions between  
2575 *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 2002; 90: 417-  
2576 424.
- 2577 125. Wyckoff III JH. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*  
2578 2002; 90: 395-415.
- 2579 126. Ottonnes F, Liautard J, Gross A, Rabenoelina F, Liautard JP, Favero J. Activation of  
2580 human Vc9Vd2 T-cells by a *Brucella suis* non-peptidic fraction impairs bacterial  
2581 intracellular multiplication in monocytic infected cells. *Immunol* 2000; 100: 252-258.
- 2582 127. Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*.  
2583 *Infect Immun* 1993; 61: 124-134.
- 2584 128. Zhan Y, Yang JL, Cheers C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella*  
2585 *abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect Immun* 1993; 61: 2841-  
2586 2847.
- 2587 129. Oliveira SC, Splitter GA. CD8<sup>+</sup> type 1 CD44<sup>hi</sup> CD45Rb<sup>lo</sup> T lymphocytes control  
2588 intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility  
2589 complex class I and class II deficient mice. *Eur J Immunol* 1995; 25, 2551-2557.
- 2590 130. Nicoletti P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv Vet Sci Comp Med* 1980;  
2591 24: 69-95.

- 2592 131. Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-  
2593 locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiol 2003; 3:  
2594 15.
- 2595 132. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and  
2596 animals in Latin America from 1968 to 2006. Epidemiol Infect 2008, 136: 496–503.
- 2597 133. Poester FP, Gonçalves VS, Lage AP. Brucellosis in Brazil. Vet Microbiol 2002; 90:  
2598 55–62.
- 2599 134. Renukaradhya GJ, Isloor S, Rajasekhar M. Epidemiology, zoonotic aspects,  
2600 vaccination and control/eradication of brucellosis in India. Vet Microbiol 2002; 90:  
2601 183–195.
- 2602 135. Ewalt DR, Payeur JB, Rhyan JC, Geer PL. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected  
2603 cattle: a bacteriological, serological, and histological study. J Vet Diagn Invest 1997;  
2604 9: 417–420.
- 2605 136. Kahler SC. *Brucella melitensis* infection discovered in cattle for first time, goats also  
2606 infected. JAVMA 2000; 216: 648.
- 2607 137. Rogers RJ, Cook DR, Kettlerer PJ, Baldock FC, Blachall PJ, Stewart SW. An  
2608 Evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. Aust Vet J  
2609 1989; 66: 77–80.
- 2610 138. Acha NP, Szyfres B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and  
2611 Animals, third ed., vol. 1. Pan American Health Organization (PAHO), Washington,  
2612 DC. 2003.

- 2613 139. Wilesmith JW. The persistence of *Brucella abortus* in calves: a retrospective study of  
2614 heavily infected herds. *Vet Rec* 1978; 103: 149–153.
- 2615 140. Hamdy ME, Amin AS. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle,  
2616 sheep, goats and camels by PCR. *Vet J* 2002; 163: 299-305.
- 2617 141. Meador VP, Deyoe BL. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine  
2618 placenta. *Vet Pathol* 1989; 26: 513-515.
- 2619 142. Xavier MN, Paixao TA, Poester FP, Lage AP, Santos RL. Pathology,  
2620 immunohistochemistry, and bacteriology of tissues and milk cows and fetuses  
2621 experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Path* 2009; 140: 149-157.
- 2622 143. Morgan WJ. Brucellosis in animals: diagnosis and control. *Proc R Soc Med* 1969; 62:  
2623 1050-1052.
- 2624 144. López A, Hitos F, Perez A, Navarro-Fierro RR. Lung lesions in bovine fetuses aborted  
2625 by *Brucella abortus*. *Can J Comp Med* 1984, 48: 275–277.
- 2626 145. Enright FM, Walker JV, Jeffers G, Deyoe BL. Cellular and humoral responses of  
2627 *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. *Am J. Vet Res* 1984, 45: 424–430.
- 2628 146. Hong CB, Donahue JM, Giles RCJR, Poonacha KB, Tuttle PA, Cheville NF. *Brucella*  
2629 *abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet Path* 1991; 28: 492–496.
- 2630 147. McCaughey WJ, Purcell DA. Brucellosis in bull. *Vet Rec* 1973; 93: 336–337.
- 2631 148. Plant JW, Claxton PD, Jakovljevic D, De Saram W. *Brucella abortus* infection in the  
2632 bull. *Aust Vet J* 1976; 52: 17-20.

- 2633 149. Rankin JEF. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. Vet  
2634 Rec 1965; 77: 132–135.
- 2635 150. Trichard CJ, Herr S, Bastianello SS, Roux D. Unilateral orchitis in a bull caused by  
2636 *Brucella abortus* biotype 1. J S Afr Vet Assoc 1982; 53: 60–62.
- 2637 151. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map  
2638 of human brucellosis. Lancet Infect Dis 2006; 6: 91-99.
- 2639 152. Taleski V, Zerva L, Kantardjiev T, Cvetnic Z, Erski-Biljic M, Nikolovski B,  
2640 Bosnjakovski J, Katalinic-Jankovic V, Panteliadou A, Stojkoski S, Kirandziski T. An  
2641 overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of  
2642 Central and Southeast Europe. Vet Microbiol 2002; 90:147-155.
- 2643 153. Brew SD, Perrett LL, Stack JA, Macmillan AP, Staunton NJ. Human exposure to  
2644 *Brucella* recovered from a sea mammal. Vet Rec 1999; 144: 483.
- 2645 154. McDonald WL, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P, Taylor  
2646 T, Swingle J, Dawson CE, Whatmore AM, Stubberfield E, Perrett LL, Simmons G.  
2647 Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation  
2648 from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. J Clin Microbiol 2006; 44:  
2649 4363–4370.
- 2650 155. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM,  
2651 McDonald WC. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a  
2652 marine mammal *Brucella* spp. Emerg Infect Dis 2003; 9: 485-488.
- 2653 156. Olsen SC, Stoffregen WS. Essential role of vaccines in brucellosis control and

- 2654 eradication programs for livestock. *Expert Rev Vaccines* 2005; 4: 915-928.
- 2655 157. Nicoletti P, Milward FW. Protection by oral administration of *Brucella abortus* strain  
2656 19 against an oral challenge exposure with a pathogenic strain of *Brucella*. *Am J Vet*  
2657 *Res* 1983; 44: 1641-1643.
- 2658 158. Nicoletti P. Vaccination. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.), *Animal Brucellosis*.  
2659 CRC Press, Boca Raton, FL, 1990; pp. 283–289.
- 2660 159. Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19  
2661 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994;  
2662 121:337-342.
- 2663 160. Sangari FJ, Grilló MJ, Jimenez de Bagués MP, González-Carrero MI, García-Lobo  
2664 JM, Blasco JM, Agüero J. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella*  
2665 *abortus* B19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice. *Vaccine*  
2666 1998; 16:1640-1645.
- 2667 161. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and  
2668 future. *Vet Microbiol* 2002; 90: 479-496.
- 2669 162. Beckett FW, Mc Diarmid SC. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19  
2670 vaccination in accredited dairy herds. *Br Vet J* 1985; 141: 507.
- 2671 163. Crawford PR, Adams LG, Richardson BE. Effect of dose of *Brucella abortus* strain 19  
2672 in yearling heifers on the relative risk of developing brucellosis from challenge  
2673 exposure with strain 2308. *Am J Vet* 1990; 51: 1837-1840.
- 2674 164. Crawford PR, Adams LG, Ficht TA Williams JD. Effect of stage of gestation and

- 2675 breed on bovine responses to vaccination with *Brucella abortus* strain 19. JAVMA  
2676 1991; 199: 887-891.
- 2677 165. Herr S, Te Brugge LA. Profiles of serological reactions following adult cow  
2678 inoculation with standard dose *Brucella abortus* strain 19 vaccine. J S Afr Vet Assoc  
2679 1985; 56: 93-96.
- 2680 166. Nielsen K, Duncan JR. Antibody isotype response in adult cattle vaccinated with  
2681 *Brucella abortus* S19. Vet Immunol Immunopathol 1988; 19:205-14.
- 2682 167. Nielsen K, Gall D, Jolley M, Leishman G, Balsevicius S, Smith P, Nicoletti P,  
2683 Thomas F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody  
2684 to *Brucella abortus*. J Immunol Methods 1996; 195: 161-168.
- 2685 168. Nielsen K, Gall D, Kelly W, Vigliocco A, Henning D, Garcia M. Immunoassay  
2686 development. Application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis.  
2687 Agriculture and Agri-Food Canada. 1996; pp.: 246.
- 2688 169. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Sriranganathan N. Biological properties of  
2689 RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet Microbiol 1991; 28:171-188.
- 2690 170. Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig G.  
2691 Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-  
2692 antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype  
2693 and attenuation. Infect Immun 2000; 68: 3927–3932.
- 2694 171. Ragan VE. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis  
2695 eradication program in the United States. Vet Microbiol 2002; 90: 11–18.

- 2696 172. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends.  
2697 Vet Microbiol 2002; 90: 19–30.
- 2698 173. Baumgarten D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. Vet  
2699 Microbiol 2002; 90: 63–69.
- 2700 174. Vargas FJ. Brucellosis in Venezuela. Vet Microbiol 2002; 90: 39–44.
- 2701 175. Moreno E. Brucellosis in Central America. Vet Microbiol 2002; 90: 31–38.
- 2702 176. Olsen SC, Bricker BJ, Palmer MV, Jensen AE, Cheville NF. Responses of cattle to  
2703 two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. Res  
2704 Vet Sci 1999; 66: 101–105.
- 2705 177. Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus*  
2706 strain RB51 vaccine in pregnant cattle. Am J Vet Res 1997; 58: 472–477.
- 2707 178. Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM. Immune responses  
2708 and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with  
2709 mutant strain of *Brucella abortus*. Am J Vet Res 1993; 54:1591-1597.
- 2710 179. Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, Palmer MV, Florance AM. Effects  
2711 of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle  
2712 against brucellosis. Am J Vet Res 1996; 57: 1153–1156.
- 2713 180. Stevens MG, Hennager SG, Olsen SC, Cheville NF. Serologic responses in diagnostic  
2714 tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. J Clin  
2715 Microbiol 1994; 32: 1065–1066.

- 2716 181. Stevens MG, Olsen SC. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle  
2717 vaccinated with *B. abortus* RB51. Infect Immun 1996; 64: 1030–1034.
- 2718 182. Olsen SC, Evans D, Hennager SG, Cheville NF, Stevens MG. Serologic responses of  
2719 *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with  
2720 strain RB51. J Vet Diagn Invest 1996; 8: 451–454.
- 2721 183. Uzal FA, Samartino LE, Schurig GG, Carrasco A, Nielsen KH, Cabrera RF, Taddeo  
2722 HR. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant  
2723 cattle. Vet Res Commun 2000; 24: 143–151.
- 2724 184. Cheville NF, Jensen AE, Halling SM, Tatum FM, Mortiff DC, Hennager SG, Frerichs  
2725 WM, Schurig GG. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic  
2726 responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*.  
2727 Am J Vet Res 1992; 53:1881-1888.
- 2728 185. Tibor A, Jacques I, Guilloteau L, Verger JM, Grayon M, Wasard V, Letteson JJ.  
2729 Effect of P39 gene deletion in live *Brucella* vaccine strains on residual virulence and  
2730 protective activity en mice. Infect Immun 1998; 66:100-107.
- 2731 186. Cloeckert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco JM, Verger JM.  
2732 Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single  
2733 and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of  
2734 diagnostic significance in ovine brucellosis. Vaccine 2004; 22: 2827 – 2835.
- 2735 187. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. Annu Rev Immunol  
2736 1997; 15:617–648.

- 2737 188. Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types  
2738 and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J*  
2739 *Immunol* 1997; 158: 2278–2284.
- 2740 189. Pertmer TM, Eisenbraun MD, McCabe D, Prayaga SK, Fuller DH, Haynes JR. Gene  
2741 gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T  
2742 lymphocyte response following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA.  
2743 *Vaccine* 1995; 13:1427–1430.
- 2744 190. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, Godfroid J, Walravens K,  
2745 Letesson JJ. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine  
2746 encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect Immun* 2001; 69: 6264–6270.
- 2747 191. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Zwerdling A, De La Barrera  
2748 S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH, Goldbaum FA. A DNA vaccine  
2749 coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B.*  
2750 *ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination.  
2751 *Vaccine* 2007; 25: 5958–5967.
- 2752 192. Oñate A, Céspedes S, Cabrera A, Rivers R, González A, Muñoz C, Folch H, Andrews  
2753 E. A DNA vaccine encoding Cu–Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus*  
2754 induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 2003, 71: 4857–4861.
- 2755 193. Velikowsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden  
2756 RA, Bruno L, Fossati CA, Spitz M. A DNA vaccine encoding luminase synthase from  
2757 *Brucella abortus* induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 2002;  
2758 70: 2507–2511.

- 2759 194. Babiuk LA, Pontarollo R, Babiuk S, Loher B, Van Drunen Little-Van Den Hurk S.  
2760 Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine* 2003; 21:  
2761 649-658.
- 2762 195. Dhama K, Mahendran M, Gupta PK, Rai A. Review article: DNA vaccines and their  
2763 applications in veterinary practice: current perspectives. *Vet Res Commun* 2008; 32:  
2764 341-356.
- 2765 196. Sáez D, Guzmán I, Andrews E, Cabrera A, Oñate A. Evaluation of *Brucella abortus*  
2766 DNA and RNA vaccines expressing Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) gene in  
2767 cattle. *Vet Microbiol* 2008, 129:396-403.
- 2768 197. Arese AI, Cravero SL, Boschiolo ML, Campos E, Samartino L, Rossetti OL. Use of a  
2769 recombinant protein from *Brucella abortus* for the diagnosis of brucellosis in different  
2770 animal species. *Rev Arg Microbiol* 1999; 31:36-39.
- 2771 198. Elzer PH, Enright FM, Colby L, Hagius SD, Walker JV, Fatemi MB, Kopec JD, Beal  
2772 BCJr, Schurig GG. Protection against infection and abortion induced by virulent  
2773 challenge exposure after oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51.  
2774 *Am J Vet Res* 1998, 59, 1575-1578.
- 2775 199. Terzolo HR, Paolicchi FA, Moreira AR, Homse A. Skirrow agar for simultaneous  
2776 isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *Vet Rec* 1991; 129: 531-532.
- 2777 200. Angus R, Barton C. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use  
2778 in the presumptive test for brucellosis. *Dev Biol Stand* 1984; 56:349-356.
- 2779 201. Alonso B, Bagnat E, Manetti J, Nicola A. Manual de procedimientos técnicos de

- 2780 diagnóstico de Brucelosis bovina. Versión 2.0. Servicio Nacional de Sanidad Animal  
2781 y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 1998; pp.: 70.
- 2782 202. Alton G, Jones L, Pietz D. Serological methods. In: Laboratory techniques in  
2783 brucellosis. Chapter 2. FAO and WHO, Geneva. 1975; pp. 64-124.
- 2784 203. SENASA. Manual de Diagnóstico Serológico de la Brucelosis Bovina. Laboratorio de  
2785 Referencia de la OIE para Brucelosis. Coordinación General de Laboratorio Animal.  
2786 Dirección de Laboratorio y Control Técnico. 2009.
- 2787 204. Torioni de Echaide S, Vanzini V. Diagnóstico de brucelosis bovina: La prueba de  
2788 fijación del complemento. Curso de diagnóstico de la brucelosis bovina mediante las  
2789 pruebas de ELISA indirecto, ELISA de competición y Fijación del Complemento. 12-  
2790 14 de abril., EEA INTA Balcarce, Bs.As., Argentina. 2000.
- 2791 205. OIE. Bovine brucellosis. In: Manual of standards for diagnostic test. List B disease,  
2792 Chapter 2.3.1. Office International des epizooties. 2006;  
2793 [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00052.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00052.htm)
- 2794 206. Larson LL. Examination of the reproductive system of the bull. In: Current Therapy in  
2795 Theriogenology 2. Ed Morrow D. A. Philadelphia, W. B. Saunders Co. 1986; pp. 101-  
2796 116.
- 2797 207. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood.  
2798 J Hyg 1938; 38: 732-749.
- 2799 208. Hubbert WT. Chairman. Committee on bovine reproductive nomenclature.  
2800 Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. Cornell Veterinarian

- 2801 1972; 62: 216-237.
- 2802 209. Campero CM. Etiopatogénesis del aborto bovino. XXVII Jornadas Uruguayas de  
2803 Buiatría, Paysandú, Uruguay, 17, 18 y 19 de junio 1999 pp14-23.
- 2804 210. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of avidin biotin peroxidase complex (ABC) in  
2805 immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody  
2806 (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981; 29, 577-580.
- 2807 211. Morrell E, Poso MA, Campero CM. Poster presentation: Empleo de la técnica de  
2808 avidina biotina peroxidasa en el diagnóstico del aborto bovino. 12 th International  
2809 Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians,  
2810 Montevideo, Uruguay. November 16-19 2005; Poster N° 47.
- 2811 212. Altman DG, Machin D, Bryant TN, Gardner MJ. Statistics with confidence. 2nd ed.  
2812 BMJ Books. 2000.
- 2813 213. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Veterinary epidemiologic research. Prince Edward  
2814 Island, Canada: AVC Inc. Charlotttetown. 2003.
- 2815 214. Poester FP, Gonçalves VSP, Paixão TA, Santos SC, Olsen RL, Schurig GG, Lage AP.  
2816 Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. Vaccine  
2817 2006; 24: 5327-34.
- 2818 215. Aguirre NP, Vanzini VR, Torioni de Echaide S, Valentini BS, De Lucca G, Aufranc  
2819 C, Canal A, Vigliocco A, Nielsen K. Antibody dynamics in Holstein Friesian heifers  
2820 vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological test. J  
2821 Immunoassay Immnuchemistry 2002; 23: 471-478.

- 2822 216. Morgan WJB. Some recent advances in the diagnosis of brucellosis. *Inst Vet J* 1971;  
2823 25: 214-219.
- 2824 217. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-Goñi I, Mainar-Jaime  
2825 RC, Moreno E, Blasco JM. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and  
2826 genetic basis and present status. *Vet Res* 2004; 35:1–38.
- 2827 218. Meador VP, Warner DP, Deyoe BL. Distribution of *Brucella abortus* organisms in  
2828 calves after conjunctival exposure. *Am J Vet Res* 1988; 49: 2015–2017.
- 2829 219. Crawford PR, Adams LG, Williams JD. Relationship of fetal age at conjunctival  
2830 exposure of pregnant heifers and *Brucella abortus* isolation. *Am J Vet Res* 1987; 48:  
2831 755-757.
- 2832 220. Forbes LB, Tessaro SV. Infection of cattle with *Brucella abortus* biovar 1 isolated  
2833 from a bison in Wood Buffalo National Park. *Can Vet J* 1996, 37: 415-419.
- 2834 221. Sözmen M, Erginsoy SD, Genc O, Beytut E, Özcan K. Immunohistochemical and  
2835 microbiological detection of *Brucella abortus* in aborted bovine fetuses. *Acta Vet*  
2836 *Brno* 2004; 73: 465–472.
- 2837 222. Pérez J, Quezada M, López J, Casquet O, Sierra MA, Martín de las Mulas J.  
2838 Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted  
2839 bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J Vet Diagn Invest*  
2840 1998, 10: 17-21.
- 2841 223. Yazicioglu O, Haziroglu R. Pathological and immunoperoxidase studies of the  
2842 placental lesions of ovine brucellosis. *Israel J Vet Med* 2000;

- 2843 [http://www.isrvma.org/article/55\\_3\\_5.htm](http://www.isrvma.org/article/55_3_5.htm)
- 2844 224. Meador VP, Tabatabai LB, Hagemoser WA, Deyoe BL. Identification of *Brucella*  
2845 *abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an  
2846 avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. Am J Vet  
2847 Res 1986; 47: 2147-2150.
- 2848 225. Ficht TA. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. Vet  
2849 Microbiol 2003; 92: 213-223.
- 2850 226. Meador VP, Hagemoser WA, Deyoe BL. Histologic findings in *Brucella abortus*-  
2851 infected pregnant goats. Am J Vet Res 1988; 49: 274-280.
- 2852 227. Gibson CD, Zemjanis R. Immune response of the bovine fetus to several antigens. Am  
2853 J Vet Res 1973; 34: 1277-1280.
- 2854 228. Schultz RD. Developmental aspects of the fetal bovine immune response: a review.  
2855 Cornell Vet 1973; 63: 507-535.
- 2856 229. Guilloteau LA, Laroucau K, Olivier M, Grilló MJ, Marin CM, Verger JM, Blasco JM.  
2857 Residual virulence and immunogenicity of CGV26 and CGV2631 *Brucella melitensis*  
2858 Rev.1 deletion mutant strains in sheep after subcutaneous or conjunctival vaccination.  
2859 Vaccine 2006; 24: 3461–3468.
- 2860 230. Jacques I, Verger JM, Laroucau K, Grayon M, Vizcaíno N, Peix A, Cortade F,  
2861 Carreras F, Guilloteau LA. Immunological responses and protective efficacy against  
2862 *Brucella melitensis* induced by *bp26* and *omp31* *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutants  
2863 in sheep. Vaccine 2007; 25: 794–805.

- 2864 231. Edmonds MD, Schurig GG, Samartino LE, Hoyt PG, Walker JV, Hagius SD, Elzer  
2865 PH. Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and  
2866 pregnant heifers. Am J Vet Res 1999; 60: 722-725.
- 2867 232. Vargas F, Rivera S, De Pool G, Vale-Echeto O, Montiel M, Schurig G. Histopatología  
2868 y bacteriología de testículos, epidídimos y linfonódulos en toros vacunados con cepa  
2869 RB51 de *Brucella abortus*. Rev. Científica, FCV-Luz. 2001; 11: 423-430.
- 2870 233. Rivera S, Vargas F, D'Pool G, Vale Echeto O, Montiel M, Schurig G. Respuesta  
2871 inmune de toros vacunados con cepa RB51 de *Brucella abortus*. Rev. Científica,  
2872 FCV-Luz. 2003; 13: 112-121.
- 2873 234. Wentink GH, Frankena JC, Bosch JC, Vanderhoek JED, Van Der Berg TH.  
2874 Prevention of disease transmission by semen in cattle. Livest Prod Sci 2000; 62: 207-  
2875 220.
- 2876 235. Givens MD, Marley MSD. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via  
2877 semen. Theriogenology 2008; 70: 504-507.
- 2878 236. Ashford DA, Di Pietra J, Lingappa J, Woods C, Noll H, Neville B, Weyant R, Bragg  
2879 SL, Spiegel RA, Tappero J, Perkins BA. Adverse events in humans associated with  
2880 accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. Vaccine 2004; 22:  
2881 3435 – 3439.
- 2882 237. Hill BD. The cultural and pathological examination of bulls serologically positive for  
2883 brucellosis. Aust Vet J 1983; 60: 7-9.
- 2884 238. Kanani A. Serological, cultural and molecular detection of *Brucella* infection in

- 2885 breeding bulls. (Tesis). College of Veterinary Science and Husbandry, Anand  
2886 Agrultural University, India. 2007.
- 2887 239. Rhyan JC, Holland SD, Gidlewski T, Saari DA, Jensen AE, Ewalt DR, Hennager SG,  
2888 Olsen SC, Cheville NF. Seminal vesiculitis and orchitis caused by *Brucella abortus*  
2889 biovar 1 in young bison bulls from South Dakota. J Vet Diagn Invest 1997; 9: 368–  
2890 374.
- 2891 240. Campero CM. Brucelosis en toros: una revisión. Rev Med Vet 1993; 74: 8-14.
- 2892 241. Izadjoo MJ, Mense MG, Bhattacharjee AK, Hadfield TL, Crawford RM, Hoover DL.  
2893 A Study on the use of male animal models for developing a live vaccine for  
2894 Brucellosis. Transbound Emerg Dis 2008; 55: 145–151.
- 2895 242. Hadley FB, Lothe H. The bull as a disseminator of contagious abortion. J Am Vet Med  
2896 Assoc 1916; 50: 143-156.
- 2897 243. Cordes DD, Carter ME. Persistence of *Brucella abortus* infection in six herds of cattle  
2898 under brucellosis eradication. N Z Vet J 1979; 27: 255-259.
- 2899 244. Alton, GG, Corner LA. Vaccination of heifers with a reduced dose of *Brucella abortus*  
2900 vaccine before first mating. Aust Vet J 1981, 57: 548-550.
- 2901 245. Alton GG, Corner LA, Plackett P. Vaccination of pregnant cows with low doses of  
2902 *Brucella abortus* S19. Aust Vet J 1981; 56: 369-372.
- 2903 246. Hendricks JB, Lomme J, Odenweller R. Reduced dose strain 19 vaccination of adult  
2904 cattle in brucellosis negative herds. Proc. U.S. Anim. Hlth. Ass., Las Vegas, 1983;  
2905 pp: 16-21.

- 2906 247. Ferrari CIL. Aplicação do uso de uma dose reduzida da vacina produzida com a  
2907 amostra B19 de *Brucella abortus* em rebanho bovino naturalmente infectado.  
2908 Dissertação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual  
2909 Paulista, Botucatu, 2001; pp: 79.
- 2910 248. Coelho JG, Pires PP, Mathias LA, Ribeiro OC, Graf Kuchembuck MR. Diagnóstico  
2911 sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da  
2912 cepa 19 de *Brucella abortus*. Pesq Vet Bras 2006; 26: 177-182.
- 2913 249. Aparicio Bahena A, Díaz Aparicio E, Hernández Andrade L, Pérez González R,  
2914 Alfonseca Silva E, Suárez Güemes F. Evaluación serológica y bacteriológica de un  
2915 hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa  
2916 19. Téc Pecu Méx 2003; 41: 129-140.
- 2917 250. Plommet M, Plommet AM. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of  
2918 strain 19 administered by conjunctival route. I. Protection demonstrated in guinea  
2919 pigs. Ann Rech Vet 1975; 6: 345-356.
- 2920 251. Plommet M, Fensterbank R. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of  
2921 strain 19 administered by conjunctival route. III. Serological response and immunity  
2922 in the pregnant cow. Ann Rech Vet 1976; 7: 9-23.
- 2923 252. Nicoletti P, Jones LM, Berman DT. Comparison of the subcutaneous and conjunctival  
2924 route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. J Am Vet  
2925 Med Ass 1978; 173: 1450-1456.
- 2926 253. Delgado S, Fernández M, Cármenes P. Influence of age and stage of gestation on  
2927 serological response to subcutaneous or conjunctival *Brucella melitensis* strain Rev. 1

- 2928           vaccination in ewes. *Small Rumin Res* 1996; 19: 63-68.
- 2929   254.   Nicoletti P. Vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19 administered by  
2930           differing routes and doses. *Vaccine* 1984; 2: 133-135.
- 2931   255.   Deyoe BL, Dorsey TA, Meredith KB, Garrett LG. Effect of reduced dosages of  
2932           *Brucella abortus* strain 19 in cattle vaccinated as yearling. *Proc. U.S. Anim Health*  
2933           *Assoc* 1979; 83: 92-104.
- 2934   256.   Confer AW, Hall SM, Faulkner CB, Espe BH, Deyoe BL, Morton RJ, Smith RA.  
2935           Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated  
2936           with reduced doses of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Microbiol* 1985; 10: 561-575.
- 2937   257.   Plommet M. Brucellosis and immunity: humoral and cellular components in mice.  
2938           *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138: 105-109.
- 2939   258.   Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, De Miguel MJ, Laroucau K, Jacques I, Blasco JM.  
2940           Efficacy of *bp26* and *bp26/omp31 B. melitensis* Rev.1 deletion mutants against  
2941           *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 2009; 27: 187-191.
- 2942   259.   Yang X, Hudson M, Walters N, Bargatze RF, Pascual DW. Selection of protective  
2943           epitopes for *Brucella melitensis* by DNA vaccination. *Infect Immun* 2005; 73: 7297-  
2944           7303.
- 2945   260.   Vizcaíno N, Kittelberger R, Cloeckert A, Marín CM, Fernández-Lago L. Minor  
2946           nucleotide substitutions in the *omp31* gene of *Brucella ovis* result in antigenic  
2947           differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of  
2948           the other *Brucella* species. *Infect Immun* 2001; 69: 7020–7028.

- 2949 261. Seco-Mediavilla P, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Marín CM, Zygmunt MS,  
2950 Fernández-Lago L, Vizcaíno N. Epitope Mapping of the *Brucella melitensis* BP26  
2951 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. Clin Diagn Lab  
2952 Immunol 2003; 10: 647-651.
- 2953 262. Cloeckaert A, Kerkhofs P, Limet JN. Antibody response to *Brucella* outer membrane  
2954 proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked  
2955 immunosorbent assay using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1992; 30: 3168–  
2956 3174.
- 2957 263. Hemmen F, Weynants V, Scarcez T, Letesson J, Saman E. Cloning and sequence  
2958 analysis of a newly identified *Brucella abortus* gene and serological evaluation of the  
2959 17-kilodalton antigen that it encodes. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2: 263–267.
- 2960 264. Limet JN, Cloeckaert A, Dezard G, Van Broeck J, Dubray G. Antibody response to  
2961 the 89 kDa outer membrane protein of *Brucella* in bovine brucellosis. J Med  
2962 Microbiol 1993; 39: 403–407.
- 2963 265. Tabatabai LB, Hennager SG. Cattle serologically positive for *Brucella abortus* have  
2964 antibodies to *B. abortus* Cu–Zn superoxide dismutase. Clin Diagn Lab Immunol 1994;  
2965 1: 506–510.