

# **Persistencia de anticuerpos séricos en 3 biotipos: Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú vacunados con B. abortus cepa 19 y RB51.**

Draghi, M.G.<sup>1</sup>, Samartino, L.E.<sup>2</sup>, Echaide, S. T.<sup>3</sup>, de, Conde S.<sup>2</sup>, Aguirre, N.<sup>3</sup> Piazza, E.,<sup>2</sup>  
Biotti, G.M.<sup>1</sup>, Schust, M.<sup>2</sup>, Ramírez, J.C.<sup>1</sup>, Ramírez, L.M.<sup>1</sup>, Sosa, C.G.<sup>1</sup> Pereira, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sanidad Animal EEA Mercedes, Corrientes, Argentina [mgdraghi@correo.inta.gov.ar](mailto:mgdraghi@correo.inta.gov.ar)

<sup>2</sup> Instituto de Patobiología, CICV y A Castelar Argentina

<sup>3</sup> EEA Rafaela, Santa Fe

**Auspiciado :Proyecto Nacional de Brucelosis  
del Área Estratégica de Sanidad Animal de INTA**

**Serie Técnica N° 46**

**Enero 2010**

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUARIA  
MERCEDES, CORRIENTES**

## Introducción

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto contagiosa producida por *Brucella abortus*, una bacteria intracelular facultativa que afecta a los animales y se transmite al hombre por vía cutánea o a través de membranas mucosas. En bovinos, la enfermedad se caracteriza por producir abortos, retención de placenta, orquitis, epididimitis, infertilidad y graves daños económicos debido a las pérdidas de terneros y disminución en la producción láctea (8).

En Argentina la brucelosis bovina es una enfermedad de control obligatorio (SENASA, Res. 115/99 y 150/02). El control de la brucelosis se basa en la vacunación de las terneras entre 3 y 8 meses de edad, con *B. abortus* cepa 19 y el análisis serológico periódico y segregación de los positivos con destino a Frigorífico. La prueba recomendada como tamiz es la de Antígeno Bufferado en Placa (BPA), empleándose como confirmatorias Seroaglutinación en tubos (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2Me), Fijación de Complemento (FC) y en los últimos años Enzimo inmunoensayo competitivo (cELISA) y la prueba de polarización fluorescente (FPA) (Resolución 438/2006).

Si bien se han realizado numerosos ensayos, no existe uniformidad de criterio en cuanto a la persistencia de los anticuerpos post-vacunación (PV) para los diferentes biotipos

bovinos. Trabajos de distintos investigadores realizados en *Bos taurus*, sostienen que cuando los animales son vacunados entre los 3 y 8 meses de edad, las inmunoglobulinas G persisten hasta los 8 meses y la detección de anticuerpos por más tiempo se debería a una infección natural (5,8).

Samartino y col (1986) vacunaron 155 terneras Hereford y/o Flekvieh de 5 a 8 meses de edad con una vacuna de *B. abortus* cepa 19 comercial y evaluaron la respuesta de anticuerpos mediante las pruebas de Rosa de Bengala, 2Me y FC. Entre los 5 y 6 días PV el 100% de los animales presentó IgM y el 78% IgG y se detectaron positivos mediante 2Me hasta los 8 meses después de aplicada la vacuna (30).

Los mismos autores (1999) vacunaron con cepa 19, 145 terneras Aberdeen Angus de 6 a 9 meses de edad serológicamente negativas a brucelosis antes, en forma simultánea o después de aplicar la vacuna antiaftosa. Todas las terneras resultaron positivas a BPA, SAT, 2Me y FC independientemente del momento de su aplicación alcanzando títulos entre 1/50 y 1/400 al 2Me a las 3 semanas de vacunadas (34).

Aguirre y col. (2002) evaluaron la respuesta inmune humoral en 52 terneras Holando Argentino, de un establecimiento libre de brucelosis luego de la vacunación con B. abortus cepa 19 mediante 7 pruebas serológicas (BPA, RAP: Rapid Automated Presumptive Test, SAT, 2Me, FC, enzimo inmunoensayo indirecto (IELISA), CELISA y FPA. A excepción de FPA las pruebas serológicas resultaron positivas en el 100% de las terneras vacunadas. FPA detectó el 68,5% de ellas y junto a CELISA fueron las que mostraron mayor precocidad para tornarse negativas, con más del 65% de las terneras negativas a los 2 meses PV. Sin embargo todas las pruebas serológicas fueron negativas en el 100% de las terneras a los 6 meses PV (4).

Echaide y col. (1988) demostraron que el 40% de las terneras Bos indicus vacunadas se mantenía positiva a FC 12 meses después de la vacunación, con una persistencia de anticuerpos significativamente mayor que en Bos taurus. El comportamiento de estos anticuerpos en bovinos de diferentes biotipos difundidos ampliamente en el norte del país, no ha sido determinado (13).

En el norte de Argentina el uso de Bos indicus y sus cruza está ampliamente difundido ya que las características de rusticidad lo hacen apto para la cría en zonas marginales. La persistencia de anticuerpos posvacunación complicaría el diagnóstico.

Los problemas de persistencia de anticuerpos después de la vacunación con cepa 19 son mayores en las pruebas de

aglutinación que con la FC. A su vez los problemas son mayores cuando los animales son vacunados como adultos aunque los títulos de FC disminuyen a los 6 meses posvacunación (18).

Durante la década del 80, se desarrolló en Virginia Tech-USA, una vacuna viva a partir de la cepa virulenta 2308 de Brucella abortus (37). Esta vacuna denominada RB51, es una cepa de Br. abortus rugosa, rifampicina resistente. La RB51 tiene un LPS sin la cadena O, por lo tanto no genera anticuerpos detectables por los métodos convencionales (36). Los distintos estudios realizados permitieron comprobar tanto en animales de laboratorio como en bovinos que la RB51 era estable, capaz de inducir una protección similar a la conferida por la cepa 19, y no generaba interferencia con los métodos de diagnóstico convencionales, aún en el caso de que los animales recibieran más de una dosis.

En Argentina, en el año 1998 se autorizó provisoriamente su uso en hembras mayores de 10 meses de edad, bajo condiciones controladas (Resolución 69/98). Posteriormente fue prohibido su uso en nuestro país (Resolución 1048/2002)

Para la detección de los anticuerpos generados por la cepa de B. abortus RB51, Adone et.al. desarrollaron una prueba de fijación del complemento con la cepa rugosa completa (1, 2, 3).

Conde y col (2002) sugirieron que lo más promisorio era la prueba de FPA con antígeno

## Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue establecer la persistencia de anticuerpos contra B. abortus cepa 19 y RB51 en tres biotipos bovinos mediante pruebas serológicas

convencionales y de nueva generación y determinar la persistencia de las cepas vacunales a través de la identificación del ADN en muestras de sangre.

## Materiales y Métodos

Se evaluaron 3 tratamientos (biotipos) utilizando un diseño en bloques al azar.

Se seleccionaron al azar 90 terneras de 5 meses de edad, distribuidos según los biotipos:

Hereford (n=30), 3/8 Hereford (n=30) y 5/8 Cebú (n=30). Todos fueron identificados con caravanas numeradas en ambas orejas y permanecieron en un predio de campo natural durante el transcurso de la experiencia.

Se dividieron en 3 grupos:

Grupo 1 (G1), 30 terneras (10 de cada biotipo) vacunadas con 2 ml de B. abortus cepa 19 conteniendo 15 a 30 x 10<sup>9</sup> células viables.

Grupo 2 (G2) 30 terneras con el mismo tratamiento del G1 y revacunación a los 18 meses de edad con 2 ml de B. abortus RB51 conteniendo entre 10 y 34 x 10<sup>10</sup> células viables.

Grupo 3 (G3), 30 terneras vacunadas con 2 ml de B. abortus Rb51.

Se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular los días 0 (previo a la vacunación) 7, 15, 21, 30, 45, 60, días post-

vacunación (PV) y a partir de ese momento una vez al mes hasta los 12 meses. Los sueros fueron centrifugados y almacenados congelados a -20° C hasta su análisis.

Para determinar la persistencia de los anticuerpos PV se utilizaron siete pruebas serológicas. Antígeno bufferado en placa (BPA): descrita por Angus y Barton (1984) fue realizada según las modificaciones de la Oficina Internacional de epizootias (28). Los resultados se expresaron como positivos o negativos.

Seroaglutinación en tubos (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2Me) fueron realizadas en paralelo según Alton y col. (5). La interpretación de los resultados se hizo siguiendo el criterio del SENASA. Sueros con títulos  $\geq 1:200$  para SAT y  $\geq 1:25$  para 2 Me fueron considerados positivos. Estos estudios fueron realizados antes de que se cambiara el valor de corte para 2Me.

Fijación del complemento (FC): Se realizó según Alton et al. (5). Los resultados se expresaron en unidades internacionales (UI) y se consideraron positivos animales con títulos  $\geq 41$  UI (15).

Enzimoimmunoensayo indirecto (iELISA) y competitivo (cELISA) y la prueba de polarización (FPA). Estas tres técnicas fueron realizadas siguiendo la metodología descrita por Nielsen y col. (1998,1999) Los resultados se expresaron en porcentaje de positividad (PP) para IELISA, porcentaje de inhibición (%I) para cELISA y en unidades milipolares (UmP) para FPA (24,25, 26).

Para IELISA el valor de corte fue 53%, para CELISA 40% y para FPA 104 UmP. Para FPA, con antígeno rugoso el punto de corte fue de 90 UmP.

Para BPA, SAT-2Me y FC se emplearon antígenos comerciales. Los de iELISA, cELISA y FPA fueron suministrados por el Dr. Klaus Nielsen del Animal Disease Research Institute, Nepean, Ontario, Canadá.

Para la identificación del ADN se obtuvieron muestras de sangre en 10% de EDTA como anticoagulante en los días 0, 150 y 360 días PV. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su procesamiento. La extracción de ADN se realizó siguiendo la técnica de Leal Klevezas et.al. (1995) con algunas modificaciones (19,20).

Se utilizó la reacción en cadena de la polimeras (PCR) para amplificar una secuencia de 498 pb de un elemento genético IS711 inserto en el genoma de *Brucella* spp, mediante los oligonucleótidos 416R 5'-TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- 3' y 412F5'- GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC- 3' específicos para B.

abortus. (Bricker y col. (1995) (9). Se amplificó además otra secuencia del gen eri de B. abortus que permite diferenciar B. abortus cepa 19 (297pb) de la cepa silvestre y RB51 (1000pb), mediante los oligonucleótidos eri1 5'GCG CCG CGAAGA ACT TAT CAA 3' y oligo2 CCC AGA AGC GAGACGAAACG 3.

Para la identificación específica de la cepa RB51 se amplificó una secuencia de 364 pb mediante los primers 416R descrito previamente y el 428 For 5'CCC CGG AAG ATATGC TTC GAT CC 3'.

Para cada muestra se utilizó 10X de buffer Tris ClH, 0.2M de DNTP's, 2.5 U de taq polimerasa, 0.5  $\mu$ M de cada primer, 3 $\mu$ M  $MgCl_2$ , 0.2-0.8  $\mu$ g de ADN, en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para cada prueba se incluyeron controles de ADN de B. abortus, de bovino normal y de reactivos.

Se empleó un termociclador Perkin Elmer que fue programado a  $94^{\circ}$  C por 5 minutos; 40 ciclos a  $94^{\circ}$ C, 50seg;  $58^{\circ}$ , 50 seg;  $72^{\circ}$ , 50"; extensión final a  $72^{\circ}$ C, 4 min y mantenimiento a  $4^{\circ}$ C. Los productos se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Los productos de PCR se diluyeron en buffer de corrida (0.25% de bromofhenol, 0.25% xylene cyanol y 30% de glycerol en agua destilada.

El análisis estadístico empleado fue análisis de varianza y test de comparación de medias de Duncan según el paquete

## Resultados

Los resultados de los animales del grupo 1 vacunados con *Brucella abortus* cepa 19 se presentan en la tabla 1 indicando para cada

prueba primer día de aparición de anticuerpos y el último. Para su mayor comprensión se grafican en las figuras 1 y 2.

Tabla 1. Persistencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* cepa 19 en los biotipos bovinos Hereford (H), 3/8 Hereford (3/8 H) y 5/8 Cebú (5/8 C) vacunados a los 5 meses de edad, analizada por diferentes pruebas serológicas utilizadas como Tamiz o confirmatorias.

Pruebas Serológicas*	1er día de detección de anticuerpos y Proporción de positivos (%)			Persistencia de los anticuerpos (días)		
	H	3/8 H	5/8 C	H	3/8 H	5/8 C
<b>Tamiz</b>						
BPA	7 - (100%)	7 - (100%)	7 - (100%)	180	210	240
IELISA	14 - (10%)	21 - (20%)	14 - (20%)	120	210	210
<b>Confirmatorias</b>						
SAT-2Me	7 - (90%)	7 - (100%)	7 - (100%)	90	60	150
FC	7 - (80%)	7 - (60%)	7 - (60%)	60	90	90
CELISA	7 - (70%)	7 - (80%)	7 - (50%)	60	60	60
FPA	7 - (10%)	14 - (40%)	7 - (20%)	60	60	60

Antígeno bufferado en placa (BPA), Seroaglutinación en tubos (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2Me), Fijación del complemento (FC), Enzimoimmunoensayo indirecto (iELISA) y competitivo (cELISA) y la prueba de polarización (FPA).

**Persistencia de anticuerpos séricos en 3 biotipos: Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú vacunados con B. abortus cepa 19 y**

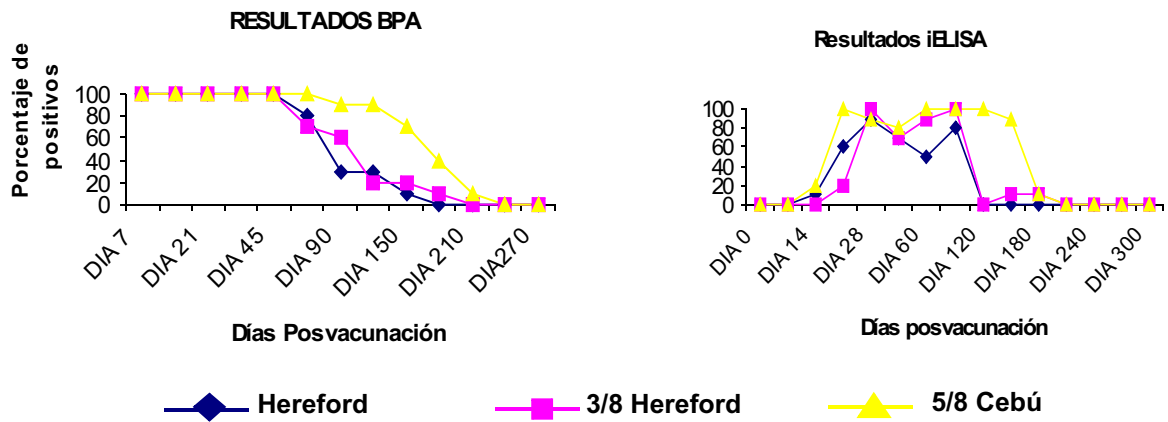


Figura 1. Dinámica de los anticuerpos contra *Brucella abortus* cepa 19 en los biotipos bovinos Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú, vacunados a los 5 meses de edad, mediante pruebas serológicas usadas como tamiz. BPA: Antígeno bufferado en placa (1a), I-ELISA (1b).

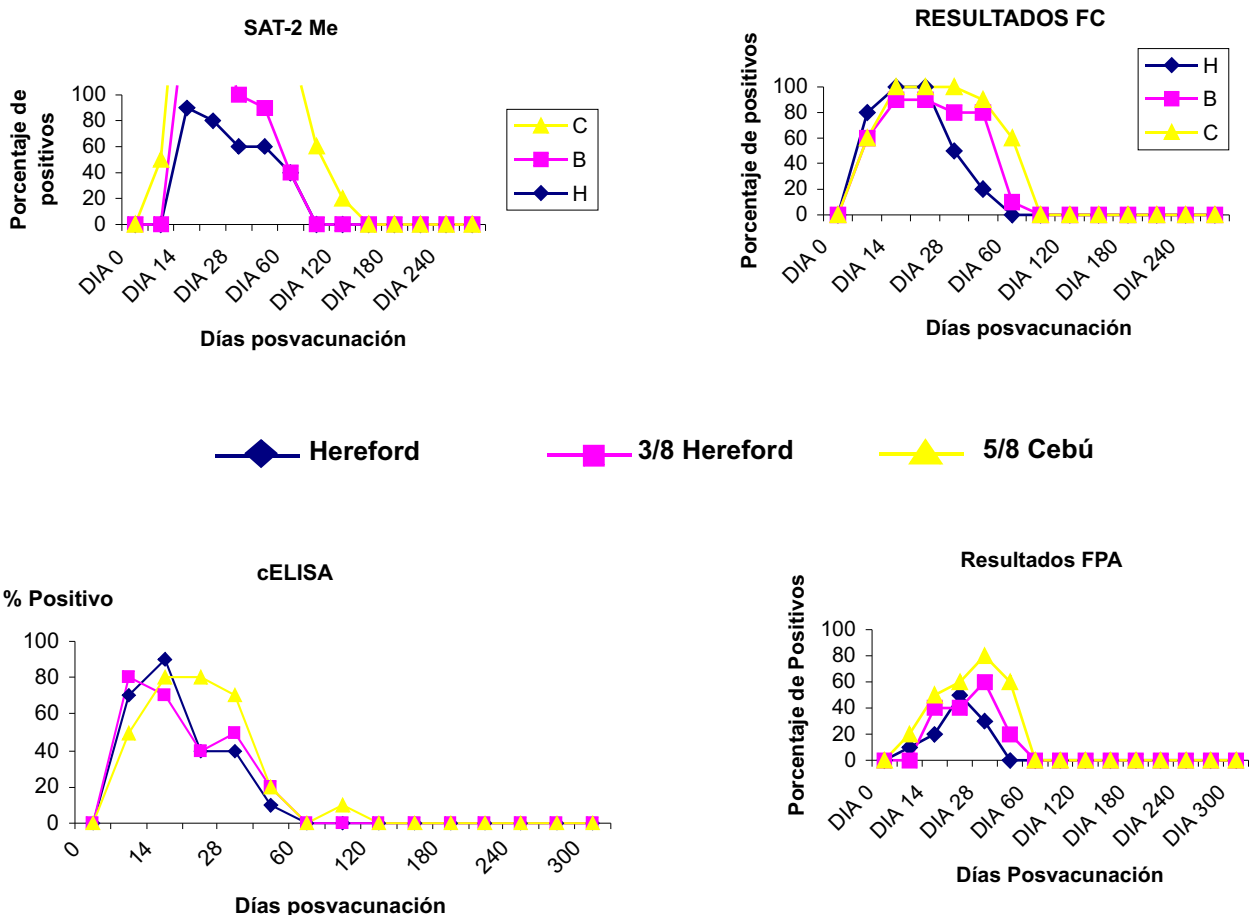


Figura 2. Dinámica de los anticuerpos contra *Brucella abortus* cepa 19 en los biotipos bovinos Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú, vacunados a los 5 meses de edad, mediante pruebas serológicas usadas como confirmatorias. SAT-2Me: seraglutinación en tubos – 2 Me (2 a), FC (2b), cELISA (2c), FPA (2d).

Los análisis estadísticos indicaron:

G1: Vacunados con Brucella abortus cepa 19.

cELISA y FPA: No hubo diferencias entre biotipos.

BPA: No hubo diferencias significativas entre los animales 5/8 Cebú y 3/8 Hereford pero si entre éstos y los del biotipo Hereford.

Los animales del grupo 2, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú que recibieron una primovacuna con cepa 19 y fueron revacunados con B. abortus RB51 presentaron anticuerpos a los 7 días (10 y 40 % respectivamente). Los animales de los biotipos Hereford y 3/8 Hereford se negativizaron a los 210 días y los

FC, SAT, SAT-2Me), iELISA: No hubo diferencias entre Hereford y 3/8 Hereford pero si entre estos y los 5/8 Cebú.

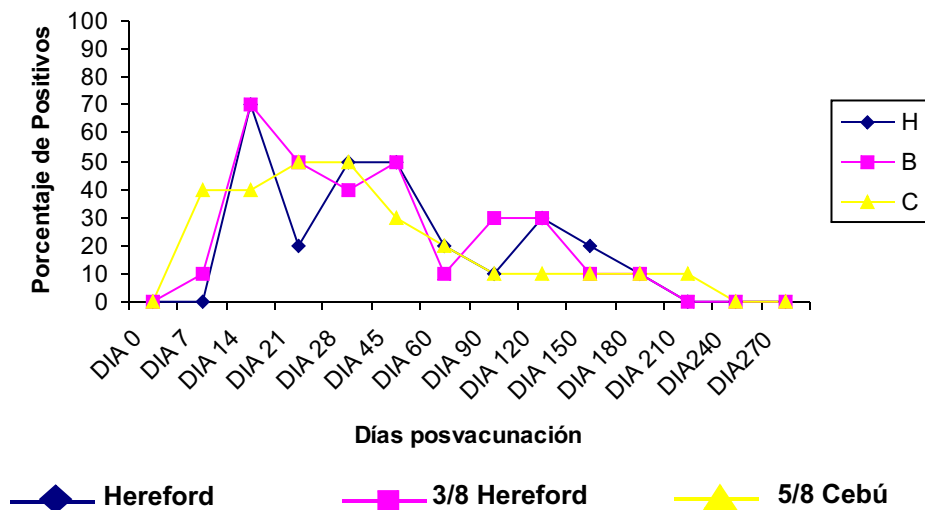


Figura 3: Dinámica de anticuerpos en terneras revacunadas con B. abortus cepa RB 51

G2 Vacunados con B. abortus cepa 19 y revacunados con B. abortus cepa RB 51 y para el G3 vacunados con B. abortus cepa RB 51, no hubo diferencias entre los 3 biotipos en relación a la persistencia de los anticuerpos.

Todos los animales vacunados con B. abortus RB51 fueron negativos a las siete pruebas realizadas empleando antígeno liso. Mediante FPA con antígeno rugoso los animales primovacunados con B. abortus cepa RB 51 presentaron anticuerpos a partir del día 7 PV. Los Hereford y 3/8 Hereford se negativizaron a los 90 días y el 5/8 Cebú a los 150 días. El máximo de animales reaccionantes con esta técnica fue del 70 % los 28 días.

En cuanto al grupo 3 la única prueba capaz de detectar anticuerpos fue FPA con antígeno rugoso (Figura 4).



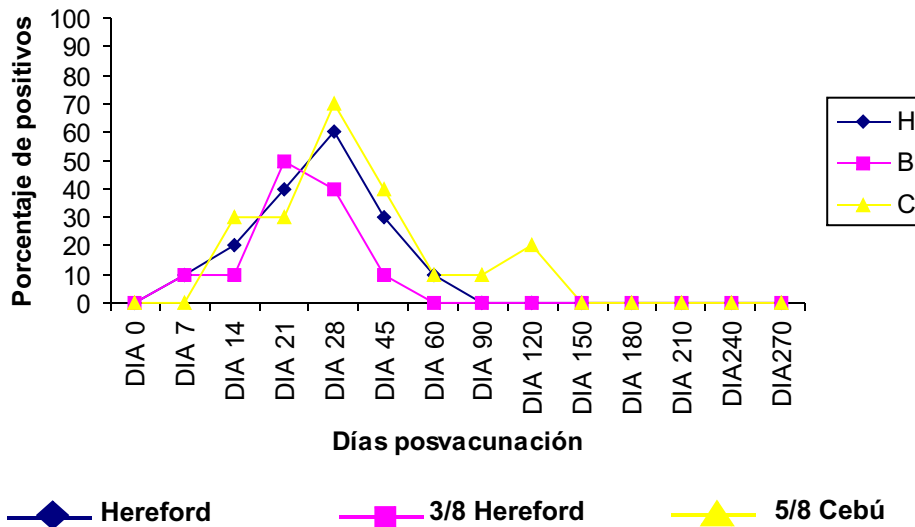


Figura 4: Dinámica de anticuerpos en terneras Vacunadas con B. abortus cepa RB 51

#### PCR

Se amplificaron la secuencias específicas esperadas de 498 pb para B. abortus y de 297 pb para B. abortus cepa 19 (Figura 5). A los 150 días PV se detectaron positivas el 80 % para Hereford, el 50 % para 3/8 Hereford y 100% para 5/8 Cebú y a los 360 días el, 100%

para Hereford, 50% para 3/8 Hereford y 100 % para 5/8 Cebú. No hubo diferencias significativas entre biotipos.

En la Figura 5 se muestran las bandas correspondientes a las secuencias amplificadas.

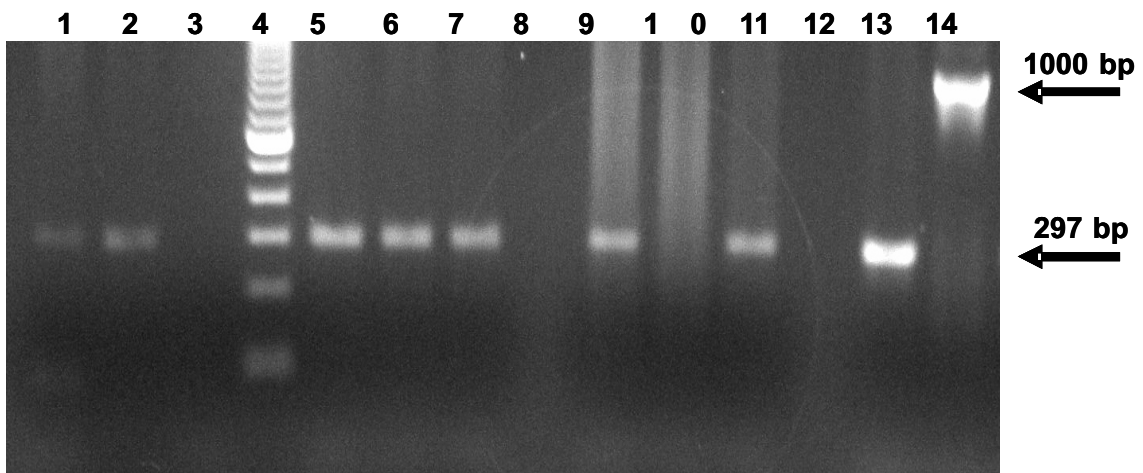


Figura 5. Producto de PCR obtenido a partir de muestras de sangre de terneras vacunadas con Brucella abortus cepa 19 a los 360 días post-vacunación, mediante los primers ERI 1 y OLIGO 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Calles 1 a 3 y 5 a 11 muestras de terneras vacunadas; calle 4: marcador molecular de 100 pb; calle 12: control negativo; calle 13: B. abortus cepa 19; calle 14: B. abortus RB51.

## Discusión y Conclusiones

En los animales vacunados con B. abortus cepa 19 la persistencia de los anticuerpos fue mayor para los biotipos con sangre índica (3/8 Hereford y 5/8 Cebú) que para el Hereford, mediante las pruebas de diagnóstico convencionales.

La mayor persistencia de anticuerpos PV fue detectada mediante las pruebas utilizadas como Tamiz. El tiempo de extinción de los mismos fluctuó entre 150 y 210 días mediante BPA y entre 120 y 180 días mediante i-ELISA para Hereford y Cebú respectivamente. Previos estudios realizados en terneras Holando Argentino vacunadas con cepa 19 entre 4 y 8 meses de edad, BPA e iELISA mostraron un período de extinción mayor a 245 días PV (4). Esta diferencia podría ser atribuida a una mayor edad de vacunación respecto del presente estudio. En contraste Herr et al. (18), mediante la prueba de Rosa de Bengala observaron una persistencia máxima de anticuerpos PV de tan sólo 70 días en Bos taurus, no obstante en Argentina esta técnica no podría ser utilizada en bovinos desde que no está aprobada oficialmente para esta especie. Si la edad de vacunación en Bos indicus se realizara en terneras menores de 6 meses, se llegaría a los 15 meses de edad antes del servicio con una mínima proporción de vaquillonas positivas a las pruebas tamiz para su posterior confirmación por las técnicas complementarias. Sin embargo esta no es la situación corriente en áreas de cría del Norte

Argentino, donde abundan estos biotipos bovinos y donde la vacunación se realiza con frecuencia a una edad mayor a los 5 meses.

Con respecto a las pruebas complementarias convencionales la persistencia máxima de anticuerpos PV de 150 días detectada en Cebú mediante SAT-2ME (Figura 2a) y de 90 días mediante FC (Figura 2b), asegurarían un diagnóstico preciso siempre que la vacunación se efectuara en terneras de 5 meses de edad o menores, ya que en un trabajo previo realizado en el NOA, se encontró que el 40% de las terneras Bos indicus permanecían con niveles de anticuerpos detectables por FC a los 20 meses PV (13). Estas diferencias podrían atribuirse a una mayor concentración de B. abortus cepa 19 en la vacuna aplicada y a una mayor edad de vacunación. La precocidad demostrada por cELISA y FPA respecto del tiempo de extinción de los anticuerpos generados por B. abortus cepa 19 (figura 2c y 2d), permitirían identificar específicamente infecciones naturales con Brucella spp, independientemente del biotipo bovino a partir de los 60 días posvacunación y asegurar un diagnóstico eficiente de las hembras pre-servicio (4, 11, 24).

La vacuna RB51 no indujo anticuerpos detectables por las pruebas convencionales y noveles basadas en antígeno LPS liso en ninguno de los biotipos bovinos vacunados ya sea con una o dos dosis. Similares resultados fueron reportados por Olsen y col en 1996, mediante las pruebas de RBT, BPA, SAT, FC, cuando vacunaron con B. abortus RB51 hembras adultas que habían recibido siendo terneras la cepa 19 y concluyeron que en esas condiciones la RB51 no era capaz de inducir una respuesta contra el LPS liso, medida por las técnicas convencionales (29). Estos trabajos muestran la utilidad de la RB51 en regiones marginales como el NOA y NEA donde por problemas climáticos y de manejo no siempre es posible vacunar antes de los 8 meses de edad con B. abortus cepa 19. Sin embargo esta vacuna ha sido prohibida en el territorio nacional (SENASA Resolución 1048/2002).

Los anticuerpos generados por B. abortus RB51 fueron detectados por la prueba de FPA con antígeno rugoso entre 45 y 120 días PV según el biotipo, siendo el Cebú el que mostró mayor persistencia. El tiempo de extinción de los anticuerpos en las terneras revacunadas osciló entre 180 y 210 días después de la primera dosis. Conde y col. (11), mediante FPA determinaron un tiempo de extinción de 180 días utilizando un punto de corte de 100 UmP, pero en terneras primo-vacunadas, esta diferencia podría ser atribuida a una mayor edad de vacunación

evaluada en el estudio. Diversas pruebas serológicas basadas en antígeno LPS rugoso han sido evaluadas para la detección de los anticuerpos generados por la RB51. A través de la técnica de Dot-blot se verificó un aumento de los títulos de anticuerpos significativamente mayor en los bovinos vacunados respecto de los controles (29). Adone y col (2001) emplearon la prueba de FC para evaluar la respuesta inmune en bovinos y ovinos vacunados con B abortus RB51 y concluyeron que la FC con el antígeno RB51 podría ser de utilidad para identificar infecciones por esta cepa en animales y en el hombre (1,2). En contraste Tittarelli y col (2008) observaron limitaciones de FC para identificar terneras vacunadas con B. abortus RB51, los anticuerpos se detectaron entre los 6 y 120 días, aunque el 100% de sensibilidad se observó sólo en los días 13 y 14 PV (38). En el presente trabajo FPA con antígeno rugoso no fue capaz de detectar la totalidad de las terneras vacunadas con B. abortus RB51, por lo que también muestra una sensibilidad limitada, a diferencia de lo informado por Conde y col. en trabajos preliminares.

Se ha sugerido también que la combinación de antígenos LPS lisos y rugosos podría mejorar la eficacia para la identificación serológica de animales vacunados o infectados en los programas de erradicación (1,2).

La PCR mostró utilidad para identificar B. abortus cepa 19 y RB51 en muestras de sangre en los diferentes biotipos vacunados, más allá del tiempo de detección de los anticuerpos PV. La identificación de ADN bacteriano hasta los 360 días PV no es indicativa de viabilidad de Brucella, por lo que se convertiría en una herramienta complementaria para definir un diagnóstico ante la presencia de anticuerpos residuales de la vacunación por períodos prolongados. Esta técnica posee una gran ventaja sobre los cultivos bacteriológicos ya que permite trabajar con organismos no viables, hecho que reduce los riesgos de infección para el personal de laboratorio.

Se debería evaluar el desempeño de las pruebas serológicas de nueva generación basadas en LPS liso y rugoso en los diferentes biotipos bovinos vacunados a una edad mayor a 5 meses, como ocurre frecuentemente en el NOA y NEA, ya que se está promoviendo desde la EEA Mercedes, Corrientes el servicio de vaquillonas a los 18

meses de edad, y la presencia de anticuerpos residuales en ese grupo etario podría interferir con el diagnóstico.

A diferencia de las pruebas convencionales, el FPA demostró ser una prueba sencilla, objetiva, que permitiría identificar rápidamente los animales positivos a RB51, sin embargo se deberían profundizar los estudios para establecer la sensibilidad de la misma.

La implementación de la nueva tecnología para el control y erradicación de la brucelosis bovina en áreas donde el biotipo Cebú y sus cruza son predominantes y en donde las nuevas prácticas de manejo tienden a dar el primer servicio en las vaquillas a los 18 meses, permitirían diferenciar anticuerpos de infección de los de vacunación tanto para el caso de producirse un aborto o para la comercialización de esos reproductores donde el SENASA exige que sean libres de brucelosis.

## Agradecimientos

Al Dr. Klaus Nielsen del Animal Disease Research Institute, Ontario, Canadá, por su apoyo y la provisión de reactivos.

Al Dr. Eduardo Vicente López del Laboratorio Schering Plough por suministrar las vacunas para el trabajo.

A la Estadística Laura Jiménez y los Dres. Víctor Vanzini y Diego Rochinotti por su apoyo en el análisis de los datos.

Sr. Juan Martín Hid Sehman suministrar para este ensayo las terneras 5/8 Cebú.

Al personal de campo de la EEA Mercedes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adone, R.; Ciuchini, F. 1999. Complement Fixation Test to assess humoral immunity in cattle and sheep vaccinates with Brucella abortus RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.6:787-790.
2. Adone, R.; Ciuchini, F.2001. Brucella abortus RB51 and Hot Saline Extract from Brucella ovis as antigens in a Complement Fixation Test used to detect sheep vaccinated with Brucella abortus RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.1:119 -122.
3. Adone, R.; Ciuchini, F.2001. Field validation of the use of RB51 as antigen in a complement fixation test to identify calves vaccinated with Brucella abortus RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.2:385-387.
4. Aguirre, N.P.; Vanzini, V.R.; Torioni de Echaide, S.; Valentín, B.S.; De Lucca, G.; Aufranc, C.; Vigliocco, A.; Nielsen, K. 2002. Antibody Dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with Brucella abortus strain 19, using seven serological tests. *J. of Immunoassay & Immunochemistry*, 4: 471 – 478.
5. Alton, G.G; Jones, L.M.; Angus, R.D., Verger, J.M.1988 *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- 6 Angus, R.D., Barton, C.E. 1984. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.* 56:349-356.
7. Beh, K.J.,1974. Quantitative distribution of Brucella antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet.. Sci.* 17: 1-4.
8. Berkovich, Z. 1998. Maintenance of Brucella abortus free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence *The Vet. Quaterly* 3:81-88.
9. Bricker, B.J; Halling, S.M (1995): Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of Brucella abortus vaccine strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 33(6, Jun), 1640-1642.
10. Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejía, Bs. As.1982. Nota Técnica N°25.
11. Conde,S., Capellino, F.,Sierra, V., Piazza E., Martinek, L. Samartino, L. Evaluación del test de polarización fluorescente para la identificación de animales vacunados con la cepa RB 51. Resumen presentado en la XIX Reunión científico Técnica de la AAVLD, 13 al 15 de noviembre de 2002, Villa Gral Belgrano, Córdoba.
12. Draghi, M.G.; Zurbriggen, M.A.; Rochinotti, D.; Vanzini, V.R. Homse, A.C.; Baez Kohn,A.R. 1985. Brucelosis bovina: estudio serológico en la provincia de Corrientes (Argentina). *Veterinaria Argentina* 12:149-153.
13. Echaide,S. T de: Aguirre, D.H.: Spath, E.J.A.1988 Respuesta serológica a la vacunación con Brucella abortus cepa 19 en bovinos Bos taurus ( Hereford y Criolla) y Bos indicus (Nelore). *Rev. Med. Vet.* 1: 28 – 34.
14. Fekete, A., J.A. Bantle,S. M. Halling, and M.R. Sanborn.1990 Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriology.* 69:216 -227.
15. García Carrillo,C. Prueba de fijación del complemento para el diagnóstico de la Brucelosis., Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejía, Bs.As.1981. Nota Técnica N° 24.
16. García Carrillo, C. 1987 La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. OIE
17. González Tomé, J.S.; Villa, L.J.; del Palacio, E.; Gregoret, R.1989. El test de Angus y Barton (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Rev. de Med. Vet.*1: 34-36.
18. Herr, S., Te Brugge, LA. 1985, Profiles of serological reactions following adult cow inoculation with standard dose of Brucella abortus strain 19 vaccine.
19. Leal Klevezas, D.S. A. Lopez Merino and J.P.Martínez Soriano 1995 Molecular detection of Brucella spp: rapid identification of B. abortus biovar 1 using PCR. *Arch. Med. Res.* 26(3):263-267.
20. Leal-Klevezas, D.S., Martínez-Vásquez, I.O., López Merino, A., Martínez Soriano, J.P. 1995. Single sep PCR for detection of Brucella spp from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3087-3090.
21. Leal-Klevezas, D.S., López Merino, A., Martínez Soriano, J.P. 1995<sup>a</sup> Molecular detection of Brucella spp.: rapid identification of Brucella abortus biovar 1 using PCR. *Arch. Med. Res.* 26:263- 267.
22. Lord, V.R.; Schurig, G.G.; Cherwonogrodzky,J.W.; Marcano, M.J., Melendez,G.E. 1998. Field study of vaccination of cattle with Brucella abortus strains RB51 under high and low disease prevalence. *Am. J. Vet.Rec.* 8: 1016 -1019.
23. Ministerio de Economía. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Programa Nacional de Control y/o Erradicación de la Brucelosis Bovina. Resolución N° 73, marzo de 1983.
24. Nielsen, K; Cherwonogrodzky, J.W.; Duncan,R.J.; Bundle, D.R. 1989. Enzyme - linked Immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with Brucella abortus or vaccinated with strain 19. *Am. J. of Vet. Res.*50: 5-9.



25. Nielsen, K.; Gall, D.; Kelly, A; Vigliocco, A; Henning, D.; Garcia, M.1996. Immunoassay development application to immunoassays for the diagnosis of brucellosis. Agriculture and Agri-Food Canada, Nepean, Canada.
26. Nielsen, K.; Gall, D.; Lin, M; Massangill, C.A; Samartino, L; Perez, B; Henager, S.; Dajer, A. Nicoletti,P; Thomas, F. 1998 Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Vet. Immunol.Immunopathol.*66:321-329.
27. Nielsen, K.; Gall, D.; Smith, P; Vigliocco,A; Perez, B; Samartino, L; Nicoletti,P; Dajer,A.; Enrigh, F. 1999. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 68:245-253.
28. Office International des Epizooties.2004. Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines, Fifth edition, Volume 1 Office International des Epizooties, Paris, France, 464
29. Olsen, S. C., Evans, D., Hennager, S.G., Cheville, N.F., Stevens, M.G.1996 Serological responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J.Vet. Diagn. Invest.* 8: 451 –454.
30. Samartino, L.E.; González Tomé, J.S.; del Palacio,E. Secuencia y comportamiento de las inmunoglobulinas séricas en terneras vacunadas contra brucelosis. 1986 *Rev. Med. Vet.* 67: 308 - 312.
31. Samartino, L.E.; Fort, M; Gregoret,R.; Schurig,G.G.; 2000. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination. *Prev.Vet.Med.*45: 193-199.
32. Samartino. L.E.; Buffoni, L.; Conde,S.; Gregoret,R. 2001. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de brucelosis bovina. *Rev. Med. Vet.* 2: 90 – 94.
33. Samartino, L.E., Gregoret, R., Gall, D., Nielsen, K. 1999 Fluorescence Polarization Assay. Application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J. of Immunoassay.* 3: 115-126.
- 34.Samartino, L.E., Fort, M.C., González Tomé, J.S., Marduel, M., Piazza, E., Salustio, E. Gregoret, R. 1999. Evolución de la protección antibrucélica otorgada por la cepa 19 en bovinos vacunados simultáneamente con vacuna antiaftosa oleosa. *Rev. Med. Vet.* 3: 186- 189
- 35 Schurig,G., Roop R., Burhman D., Boyle, S., Baghi, T., Sriranganathan, N. 1991. Biological properties of RB51, a stable, O-chain deficient mutant of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28, 171-188.
- 36.Stevens, M.G.; Olsen, S.C.; Cheville,N.F.1995 Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus*\_strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunology and Immunotahology.* 44 223-235.
37. Stevens,M.G.; Olsen,S.C.; Palmer,M.V. 1997. *Brucella abortus* Strain RB51: A new brucellosis vaccine for cattle. *The Compendium* 6: 766 – 774.
38. Titarelli, M., Bonfini, B., De Massis, F., Giovannini A., Di Ventura, M.,Nannini, D., Caporale, V. *Brucella abortus* strain RB51 vaccine: immune response after calfhood vaccination and field investigation in Italian cattle population. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del molise G. Caporale, Campo Boario, 64100 Teramo, Italy.
39. Villa, L. J.; González Tomé, J.; Manetti; Ramis,C.R. Zamora, A. Análisis y evaluación de la metodología de diagnóstico, prevención y control de la brucelosis. Informe producido por la Comisión Científica sobre Brucelosis de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, 1986.

Enero 2010

TIRADA  
200 Ejemplares

Diseño y Diagramación  
Comunicación EEA INTA Mercedes

Imprenta Iberia  
Reconquista 1679  
Corrientes Capital