

DIFERENCIACION TEMPRANA DE OVEJAS VACUNADAS CON REV-1 A DOSIS REDUCIDAS EMPLEANDO ANTIGENO POLI B.^a

EFREN DIAZ APARICIO^c

LUZ MINERVA CORTES MEDINA^b

JESUS VAZQUEZ NAVARRETE^b

JOSE WEIMERSHEIMER RUBI^d

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue demostrar que mediante el empleo de antígeno polisacárido-B en la prueba de inmunodifusión doble es posible la diferenciación temprana de las ovejas vacunadas con dosis reducidas de Rev-1 *Br. melitensis*.

Se utilizaron 30 ovejas mayores de dos años que se dividieron en tres grupos, de 10 borregos cada uno. Al grupo A se le aplicó Rev-1 a dosis 5x103UFC, el grupo B se inmunizó con Rev-1 a dosis 1x105UFC y el grupo C fue el testigo. La totalidad de los ovinos se muestrearon los días 0, 15, 30, 60, 90 y 120 posvacunación; las pruebas serológicas realizadas fueron tarjeta, tubo, Coombs e inmunodifusión doble, con antígeno Poli-B obtenido a partir de la cepa Rev-1 *Br. melitensis*.

En los grupos vacunados (A y B) al utilizar la prueba con antígeno Poli-B se encontraron ovejas positivas hasta los 30 días posvacunación mientras que en las pruebas de aglutinación persistieron aún a los 120 días. En el grupo testigo, no hubo reactores positivos en

ninguno de los muestreos y bajo ninguna prueba. La prueba de inmunodifusión doble con Poli-B es útil para la diferenciación temprana de ovejas vacunadas con Rev-1 a dosis reducida.

INTRODUCCION

La afección por *Brucella melitensis* en ovinos se caracteriza por afectar principalmente a las hembras provocando aborto y retención placentaria, asimismo en los machos causa problemas de tipo reproductivo.¹³

En México se demostró la presencia de anticuerpos contra *Br. melitensis* desde 1974¹⁵. A partir de los experimentos de Neeman y Ulasevich que demostraron la estabilidad de la cepa Rev-1 al ser usada en ovinos² esta vacuna se empezó a emplear para proteger a los ovinos contra la brucelosis.

Al evaluar la inmunidad en ovinos que proporciona la Rev-1 se observó que fue satisfactoria^{2,6}.

El uso de la dosis reducida de Rev-1 en hembras adultas, elimina inconvenientes que se presentarían con la aplicación de la dosis normal como puede ser: aborto, eliminación de la cepa vacunal en leche y persistencia, por largo tiempo, de los títulos serológicos posvacunales². La dosis reduci-

a) Recibido para su publicación el 9 de enero de 1989. Trabajo parcialmente financiado por CONACYT clave PCFBNA-020260

b) Proyecto Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes CENID-Microbiología INIFAP-SARH Km. 15.5 Carr. México-Toluca, C.P. 05110, México, D.F.

c) Campo Experimental "La Campana" CIFAP-Chihuahua INIFAP-SARH, Apdo. Postal 682, C.P. 03100 Chihuahua, Chih.

d) Proyecto Biotecnología en Salud Animal CENID-Microbiología INIFAP-SARH, C.P. 05110, México, D.F.

da ha sido utilizada en forma masiva en caprinos y ovinos en Israel, con resultados alentadores¹² y la persistencia en cuanto a los títulos serológicos posvacunales de Rev-1, de alrededor de 13 semanas⁷.

Entre las bases generales para el control y prevención de la brucelosis se encuentra la identificación y separación o eliminación de los animales infectados, aunado ésto a los programas de vacunación. En la brucelosis en particular es necesario distinguir entre anticuerpos (Ac) por infección natural y los producidos por reciente vacunación¹⁴.

El antígeno Poli-B precipita en la prueba de inmunodifusión radial (IDR) con sueros de bovinos infectados pero no con los sueros de animales vacunados. La prueba de IDR con el antígeno Poli-B puede ser aplicada a sueros de animales que recién han sido vacunados dando negatividad, lo que no se presenta con otras pruebas serodiagnósticas de rutina, ya que las aglutininas pasvacunales y anticuerpos fijadores de complemento aún están presentes, por esta razón, existe un gran número de reactores positivos en dichas pruebas⁸.

En los caprinos la prueba de Inmunodifusión doble (IDD) con Poli-B permite la diferenciación de los anticuerpos posvacunales en las pruebas de aglutinación y fijación de complemento de animales vacunados con Rev-1 a dosis reducida⁹. En cabras revacuadas con dosis reducida de Rev-1 la prueba de IDD con Poli-B deja de encontrar positivos a los 45 días posvacunación a diferencia de la fijación de complemento que dá positivos aún a los 220 días posteriores a la vacunación¹⁰. En cuanto al uso de Poli-B obtenido de la cepa Rev-1 *Brucella melitensis*, Ontiveros y Tenorio¹⁶ notifican su efectividad en el diagnóstico

de la brucelosis bovina; asimismo, se ha observado que el Poli-B producido con Rev-1 fué útil para el diagnóstico de la brucelosis en cabras^{9, 10}.

En una comparación entre el Poli-B producido usando diferentes cepas de *Br. melitensis* se encontró que la cepa Rev-1 y 16 M fueron más adecuadas para la obtención de ese antígeno, ya que el rendimiento en microorganismos (ug) obtenido a partir de éstas, fue casi tres veces mayor que el de la cepa B-115⁵.

El objetivo fue demostrar que mediante el empleo del antígeno polisacárido-B, en la prueba de IDD es posible la diferenciación temprana de los anticuerpos posvacunales en las ovejas inmunizadas con dosis reducidas de Rev-1 *Brucella melitensis*.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron sueros obtenidos de 30 ovejas hembras mayores de dos años, provenientes de un rebaño ubicado en el municipio de Zumpango, Estado de México; estos animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos: grupo A formado por 10 ovejas vacunadas con una dosis de 6×10^3 UFC de Rev-1 *Br. melitensis*; grupo B integrado por 10 ovejas inmunizadas con una dosis de 1×10^5 UFC de Rev-1 *Br. melitensis* y por último, el grupo C fue constituido por 10 ovejas que no recibieron tratamiento. Además se utilizaron dos cuyes inoculados con *Br. melitensis* para la producción del antisuero, usado como control positivo. La vacuna Rev-1 fue producida por la productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE); para obtener la dosis reducida se realizó un conteo de colonias y a partir de este se realizaron diluciones con solución buffer en fosfatos hasta llegar a los títulos mencionados, la vía de inocu-

lación fue subcutánea.

A la totalidad de los animales se les realizó muestreos serológicos, el día de la vacunación y posteriormente los días 15, 30, 60, 90 y 120.

A todos los sueros se les realizó las siguientes pruebas serológicas, según la técnica descrita por Altón y Col³, con el fin de determinar la presencia de anticuerpos contra *Bruce-lla*.

- i) Prueba de tarjeta.
- ii) Prueba de aglutinación lenta en tubo.
- iii) Prueba de Coombs (PC).
- iv) IDD con polisacárido-B obtenido de la cepa Rev-1 *Br. melitensis*.

Los antígenos usados para prueba de tubo y tarjeta se obtuvieron de PRONABIVE y la antigamaglobulina para la prueba de Coombs fue preparada en el Proyecto de Enfermedades Bacterianas de los Rumiante del CENID-Microbiología.

El antígeno Poli-B se obtuvo a partir de un cultivo de 48 horas de la cepa Rev-1 de referencia utilizando ácido tricloroacético 0.5 M para la extracción del antígeno y etanol frío al 95% para una precipitación, siguiendo la técnica descrita por Díaz y Col⁸; la cuantificación del Poli-B contenido en cada ml de solución se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Dubois y Col¹¹ en la que se determina la cantidad de carbohidrato por referencia a una curva estándar de glucosa, las lecturas fueron realizadas en el espectrofotómetro Spectronic-20 de Bausch & Lomb con una longitud de onda 420 nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

En la prueba de IDD se utilizó el antígeno Poli-B a una concentración de 160 ug/ml. El análisis estadístico para la comparación de el número de

reactores positivos por días de muestreo entre las diferentes pruebas serológicas, fue realizado utilizando Ji cuadrada¹⁷

RESULTADOS Y DISCUSION

El Cuadro 1 y la Gráfica 1 presentan los resultados obtenidos en las pruebas serológicas realizadas a las ovejas vacunadas con la dosis 5×10^3 , se puede apreciar que los títulos posvacunales persisten hasta los 120 días para la prueba de Coombs y a los 90 días para la de tubo, mientras que las pruebas de tarjeta e IDD presentan positivos sólo a los 30 días de posvacunación, entre estas dos últimas pruebas es ligeramente menor el número de reactores para IDD.

El Cuadro 2 y la Gráfica 2 muestran los resultados de las pruebas serológicas practicadas a las ovejas vacunadas con la dosis 1×10^5 , se puede observar que los títulos posvacunales se presentan aún a los 120 días para la prueba de Coombs y a los 90 días para la prueba de tubo; en la prueba de tarjeta desaparecen los reactores a los 90 días mientras que en IDD con Poli-B se presenta sólo el 30% de positivos a los 30 días y a los 60 días ya no se observa ningún positivo.

En el grupo testigo, no hubo reactores positivos en ninguna de las pruebas diagnósticas y en ninguno de los muestreos realizados. Los sueros de los dos animales utilizados como control positivo presentaron la línea de precipitación característica para la prueba de IDD y las reacciones características de las pruebas de aglutinación.

Los resultados del análisis estadístico se presentan en los Cuadros 1 y 2. Para las ovejas vacunadas con la dosis 5×10^3 se observa que la prueba de IDD presenta diferencia significati-

CUADRO 1. RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE LOS TITULOS SEROLOGICOS POSVACUNALES EN PRUEBAS DIAGNOSTICAS PRACTICADAS A 10 BORREGAS ADULTAS VACUNADAS CON UNA DOSIS 5x103 DE REV 1 BR. MELITENSIS.

PRUEBA SEROLOGICA		DIAS POSVACUNACION					
		0	15	30	60	90	120
TARJETA	-	100 ^a	60 ^a	75 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	+	-	40	25	-	-	-
TUBO	-	100 ^a	30 ^b	50 ^b	85 ^b	95 ^{ab}	100 ^a
	1:25	-	45	45	15	5	-
	1:50	-	15	5	-	-	-
	1:100	-	10	-	-	-	-
	1:200	-	-	-	-	-	-
COOMBS		100 ^a	15 ^c	20 ^c	70 ^c	85 ^b	95 ^a
	1:25	-	30	55	20	10	5
	1:50	-	45	25	10	5	-
	1:100	-	10	-	-	-	-
IDD Poli-B	-	100 ^a	65 ^a	80 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	+	-	35	20	-	-	-

a, b, c. Diferente literal muestran diferencia estadística ($P < 0.05$).

CUADRO 2. RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE LOS TITULOS SEROLOGICOS POSVACUNALES EN PRUEBAS DIAGNOSTICAS PRACTICADAS A 10 BORREGAS ADULTAS VACUNADAS CON UNA DOSIS 1×10^5 REV 1 BR. *MELITENSIS*

PRUEBAS SEROLOGICAS		DIAS POSVACUNACION					
		0	15	30	60	90	120
TARJETA	-	100 ^a	60 ^a	75 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	+	-	40	25	-	-	-
TUBO	-	100 ^a	30 ^b	50 ^b	85 ^b	95 ^{ab}	100 ^a
	1:25	-	45	45	15	5	-
	1:50	-	15	5	-	-	-
	1:100	-	10	-	-	-	-
	1:200	-	-	-	-	-	-
COOMBS	-	100 ^a	15 ^c	20 ^c	70 ^c	85 ^b	95 ^a
	1:25	-	30	55	20	10	5
	1:50	-	45	25	10	5	-
	1:100	-	10	-	-	-	-
	1:200	-	-	-	-	-	-
IDD Poli-B	-	100 ^a	65 ^a	80 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	+	-	35	20	-	-	-

a, b, c. Diferente literal muestran diferencia estadística ($P < 0.05$).

va ($P < 0.05$) en cuenta a la presencia de reactores positivos con respecto a las pruebas de tubo y de Coombs, más no se aprecia diferencia estadística al compararla con la prueba de tarjeta ($P > 0.05$).

En los resultados del análisis estadístico entre las pruebas diagnósticas en las ovejas vacunadas con la dosis 1×10^5 se puede resaltar que la prueba IDD presenta diferencia estadística ($P < 0.05$) los días 15, 30 y 60 posvacunación, con respecto a todas las otras pruebas.

Blasco y Col⁴ vacunaron borregas gestantes con una dosis 5×10^8 UFC Rev-1, observando que a los 154 días posvacunación a la prueba de tarjeta se encontró un 15% de positivos⁴.

Los resultados del presente trabajo difieren notablemente con los datos anteriores, pero ésto debe atribuirse a que la dosis utilizada por Blasco Col⁴ está muy cerca de la dosis normal 1×10^9 utilizada para la vacunación de tres a seis meses de edad y no recomendada para animales adultos.

Crowther y col⁷ vacunaron dos grupos de borregas adultas con dos diferentes dosis de Rev-1, 1×10^4 y 1×10^5 UFC; utilizaron las pruebas de aglutinación rutinarias y fijación de complemento para observar la respuesta a la vacunación, encontraron que en ambos casos la persistencia de anticuerpos fue hasta los 91 días posvacunación, coinciden estos datos con los del presente trabajo, en lo referente a las pruebas de tubo y tarjeta⁷.

Utilizando la prueba de Coombs se encontró una mayor cantidad de reactores positivos, la respuesta posvacunal se observó hasta los 120 días, ésto puede ser atribuido a que Coombs presenta mayor sensibilidad que otras pruebas¹.

Al comparar los resultados de las

pruebas serológicas entre las dos dosis no se encontró diferencia en cuanto a persistencia de títulos posvacunales a la prueba de Coombs, tubo e IDD y sólo se presentó diferencia en la prueba de tarjeta, donde a dosis mayor los reactores desaparecieron hasta los 90 días a diferencia de la dosis menor que sólo se presentaron a los 30 días.

La prueba de IDD con antígeno Poli-B, no había sido utilizada en ovinos, pero en base a los resultados de este trabajo se observa que esta prueba presenta positividad hasta los 30 días, mostrando que todos los ovinos vacunados con dosis reducidas de Rev-1 se encuentran negativos con IDD a los 60 días posvacunación.

CONCLUSIONES.

La vacunación con dosis reducidas 5×10^3 y 1×10^5 de Rev-1 *Br. melitensis* provocan una buena respuesta humoral en ovejas adultas.

La prueba de IDD, utilizando el antígeno Poli-B, encuentra positivos a los 30 días de posvacunación siendo por lo tanto la mejor prueba para la diferenciación temprana de ovejas vacunadas con Rev-1 a dosis reducida, ya que las pruebas de aglutinación dan reacción posvacunal de 90 a 120 días.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a los MVZ Alfredo Cuelar O. y MVZ Ma. Lourdes Molina N., su colaboración para la realización de este trabajo.

SUMMARY

This study was carried out to demonstrate, that employing the polysaccharide B antigen in the double immunodiffusion test, it is possible to differentiate prematurely the sheeps vaccina-

ted with reduced dose of Rev 1 *Br. melitensis*. Thirty sheep up two years old were used. They were divided in three groups, of ten sheep each. Group A was vaccinated with a Rev 1 dose of 5x10³ UFC, group B, was immunized with a Rev 1 dose of 1x10⁵ UFC, and group C was the control. All the sheep were tested the days 0, 15, 30, 60, 90 and 120 after vaccination. The serologic tests realized were: card, tube, Coombs and double immunodiffusion with poli-B, obtained from the Rev 1 *Br. melitensis* strain.

Using the test with poli-B antigen it was found positive sheep in the groups A and B until 30 after vaccination. In the agglutination tests, there were seropositive until 120 days. In the control group, there were not positive reactions in any test. The double immunodiffusion with reduced dose of Rev 1 from animals naturally infected.

LITERATURA CITADA.

1. ACHARYA, B.N. and PANDA, S.A., 1985. Role of Blocking antibody and coombs antiglobulin test in the detection of brucellosis in sheep Indian J. Anim. Hith. 123.
2. ALTON, G.G. and ELBERG, S.S., 1972. Rev-1 *Brucella melitensis* vaccine, a review of ten years of study Vet. Bull. 37.
3. ALTON, G.G., JONES, M.L. and PIETZ, D.F., 1976. Laboratory techniques in brucellosis. World Health Organization, Genova, Monograph Series, 2nd. Ed. No 55.
4. BLASCO, J.M. ESTRADA, A. and MERCADAL, M., 1984. A note on adult sheep vaccination with reduced dose of *Br. melitensis* Rev-1. Ann. Rech. Vet. 15:553.
5. CORTES, M.L.M., DIAZ, A.E., VAZQUEZ, N.J. y ONTIVEROS, C.L., 1987. Comparación de tres cepas *Brucella melitensis* para la obtención de antígeno polisacárido-B, utilizado en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Téc. Pec. Méx. 25:155.
6. CRADWELL, D.V. and VANZYL, F.E., 1975. Effectivity of Rev-1 vaccine in rams against *Brucella ovis* infection Afr. Vet. Ass. 46:349.
7. CROWTHER, R.W., ORPHANIDES, A. and POLIDOROU, K., 1977. Vaccination of adult sheep with reduced doses of *Br. melitensis* strain Rev-1. Trop. Anima Hith. 9:85.
8. DIAZ, R., GARATEA, P., JONES, M.L. and MORIYON, I., 1979. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polisaccharide antigen for differencing infected from vaccinated cattle. J. Clin. Microbiol 10:37.
9. DIAZ, A.E., MANCERA, M.A., CORTES, M.L.M., VAZQUEZ, N.J. y SUAREZ, G.F., 1987. Utilización del antígeno polisacárido-B de dos cepas de *Br. melitensis* para la diferenciación de anticuerpos producidos por la vacuna Rev-1 en caprinos. Memorias Reunión de Investigación Pecuaria en México INIFAP-UNAM México:15
10. DIAZ, A.E., MANCERA, M.A., VAZQUEZ, N.J., SUAREZ, G.F., 1988. Inmunidad conferida por la revacunación con dosis reducida d Rev-1 *Br. melitensis* en caprinos. Memorias del Congreso Latinoamericano de Producción Caprina. AMPA; Torreón, Coah: C-17.
11. DUBOIS, M., GILES, K.A. HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances Anal. Chem. 28:350.
12. ELBERG, S.A., 1981. Rev-1 *Brucella melitensis* vaccine Part II 1968-1980. The Vet. Bull. 51:67.
13. GILLESPIE, J.H., y TIMONEY, J.F., 1981. (Hagan y Bruner) Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos 4a. Edi Edit. La Prensa Médica, S.A. México, D.F.
14. JONES, L.M., BERMAN, D.T. MORENO, E., DEYOE, B.L. GILSDORF, N.I., HUBER, I.D. and NICOLETTI, P., 1980. Evaluation of radial immunodiffusion test with polysaccharide-B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 12:753.
15. MARTINEZ, P.V.E., 1974. Presencia de anticuerpos contra *Br. ovis* y *Br. melitensis* en sueros de borregos Tabasco y Pelibuey. Tesis de Licenciatura FMVZ-UNAM, México, D.F.
16. ONTIVEROS, C.L., y TENORIO, G.V., 1984. Avances en la utilización de la prueba de inmunodifusión radial con un antígeno Poli-B de *Br. melitensis* cepa Rev-1 para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, D.F.: 177.
17. STELL, G.D.R. y TORRIE, J.H., 1985. Bioestadística: Principios y Métodos McGraw-Hill, México: 458.