

VACUNA FENOL-INSOLUBLE CONTRA LA BRUCELOSIS HUMANA: EVALUACION DEL PODER INMUNOGENICO EN COBAYOS

J. BOLPE (1), D. F. de LAPENTA (1) & C. GARCÍA-CARRILLO (2)

RESUMEN

Se examinó una vacuna diseñada para inmunizar al hombre, preparada con extracto de fenol insoluble, para determinar si protegía a cobayos contra el desafío con la cepa virulenta **B. abortus** 2308.

Se incluyeron en el experimento las vacunas vivas atenuadas **B. abortus** cepa 19 y **B. melitensis** Rev. 1, para comparar los resultados.

Se vacunaron 93 animales en cada grupo, que fueron subdivididos en subgrupos de 31 y se los desafió con 10^4 , 10^3 y 10^2 unidades formadoras de colonias de la cepa **B. abortus** 2308 virulenta.

El análisis global de los resultados demostró una protección del 11.9% en animales vacunados con el extracto de fenol insoluble, 65% en los vacunados con **B. abortus** cepa 19 y 95% en el grupo que recibió vacuna **B. melitensis** Rev. 1.

UNITERMOS: Brucelosis humana; Vacuna fenol-insoluble; Prueba "in vivo".

INTRODUCCION

La prevención de la brucelosis en el hombre está ligada al control y erradicación de la infección en los animales. Como medida transitoria se ha pensado que una vacuna inocua y eficaz podría evitar la enfermedad en el hombre y sería un arma útil en grupos que por su ocupación tienen especial riesgo de infección. En la Unión Soviética y en la China se ha vacunado un gran número de personas en contacto con cabras y ovejas infectadas utilizando vacunas a base de las cepas atenuadas 19 BA y 104 M respectivamente³.

La vacuna fenol-insoluble (P.I.) es una fracción antigénica obtenida de **Brucella abortus**

cepa 19, por delipidación de los cuerpos bacterianos y extracción por fenol^{2, 9, 10}. El poder protector conferido por la vacuna y su toxicidad han sido probados en animales de laboratorio²; en el ratón, la protección no supera el 65% aún con dosis de 1 mg de la Fracción P.I.². Un mg de antígeno desecado se ha utilizado para la inmunización antibrucélica en humanos, inoculada por vía subcutánea en sujetos a riesgo^{10, 11}.

La vacuna **Brucella abortus** cepa 19, ha sido ampliamente utilizada en la prevención de la brucelosis bovina. En esta especie, la dosis estándar, protege contra el aborto al 70% de las hembras desafiadas experimentalmente; así-

(1) Departamento de Zoonosis Rurales, España 770, C.P. 7300 Azul, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

(2) Centro Panamericano de Zoonosis, Casilla 3092, Correo Central 1000, Buenos Aires, Argentina.

Dirección Postal: J. Bolpe, Departamento de Zoonosis Rurales, España 770, C.P. 7300 Azul, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

mismo, dicha protección se ha observado en cobayos vacunados y expuestos a una cepa de campo⁷.

La vacuna *Brucella militensis* Rev. 1 se utiliza en la prevención de la brucelosis caprina y ovina. En pruebas experimentales realizadas en cobayos, la inmunidad conferida por la vacuna Rev. 1 superó a la de la cepa 19 frente al desafío con *Brucella abortus*^{4, 8}.

El objetivo de este trabajo fue estimar la protección conferida al cobayo por la vacuna P.I. y comparar la protección producida por las tres vacunas frente a tres niveles diferentes de desafío con *Brucella abortus*.

Esta evaluación fue requerida por el Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación y el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, República Argentina, como ensayo previo a una eventual utilización de la vacuna P.I. en el hombre.

MATERIAL Y METODO

Animales

Cobayos raza American Short Hair de 650 a 700 g de peso al iniciar el experimento. Se distribuyeron al azar para conformar nueve grupos de treinta y un animales a vacunar, y cuatro grupos de doce animales testigos.

Vacunas

a) **Vacuna fenol insoluble:** fue provista por el Instituto Bio-Merieux. Se aplicaron 2 dosis de 1 ml de vacuna para uso humano, diluída 1/10, con un intervalo de 15 días, a 92 cobayos, por vía subcutánea.

b) **Vacuna cepa 19:** se utilizó vacuna cepa 19 elaborada por el Centro Panamericano de Zoonosis. Se inocularon 93 animales con una dosis de 1 ml (5×10^7 células, equivalente a 1/1000 de dosis bovina), por vía subcutánea.

c) **Vacuna REV 1:** la vacuna Rev 1, liofilizada, elaborada por el Centro Panamericano de Zoonosis; luego de rehidratada se diluyó 1/100 y se aplicó una dosis de 1 ml (2×10^7 células, equivalente a 1/100 de dosis caprina) por vía subcutánea a 91 animales.

Desafío

Ocho semanas después de la vacunación se inocularon los animales vacunados y testigos con una suspensión de *Brucella abortus* cepa 2308, por vía intramuscular. La cepa fue provista por el Centro Panamericano de Zoonosis. Los grupos vacunados se inocularon con tres niveles diferentes de desafío: 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC por ml; y los grupos testigos con cuatro niveles: 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 UFC por ml.

Sacrificio y Necropsia

Ocho semanas después del desafío, se tomaron muestras de sangre para serología a los animales y se sacrificaron. Se determinaron las medidas y peso del bazo y se hicieron cultivos para detectar *Brucella*¹. Los índices de las medidas del bazo fueron calculados y comparados con los valores esperados de acuerdo al sexo y peso de los animales según GARCÍA-CARRILLO⁶. Las muestras de suero de los animales se analizaron mediante la prueba de aglutinación lenta en tubo de Wright con antígeno provisto por el Centro Panamericano de Zoonosis.

RESULTADOS

La protección producida por las tres vacunas estudiadas se detalla en el Cuadro 1. La vacuna fenol-insoluble independientemente del nivel de desafío, protegió globalmente al 11.9% de los cobayos; la vacuna *Brucella abortus*, cepa 19, al 65.6% y la vacuna *B. melitensis* Rev 1, al 95.6%.

Las alteraciones del bazo y los resultados de la serología de los animales vacunados y testigos se detallan en el Cuadro 2.

Las mayores alteraciones respecto al ancho, largo y peso promedio del bazo, así como los títulos serológicos más elevados, entre los animales vacunados, se observaron en el grupo de animales que recibieron vacuna fenol-insoluble.

Las variaciones del peso promedio de cada grupo de animales y los testigos controlados en las diferentes etapas de la experiencia se detallan en la figura 1. El incremento del peso del total de los animales hasta el momento del desafío sigue un patrón similar, oscilando el peso pro-

CUADRO 1

Inmunidad en cobayos vacunados con vacuna fenol insoluble, *B. abortus* cepa 19 y *B. melitensis* Rev 1 frente al desafío con *B. abortus* 2308 ocho semanas después de la vacunación.

Vacunas	Desafío post-vacunación			
	Nº total animales	Dosis de desafío (UFC)	Nº infectados (1)	Protección %
Fenol-insoluble	30	10 ⁴	27	10.0
	31	10 ³	28	9.7
	31	10 ²	26	16.1
<i>B. abortus</i> Cepa 19	31	10 ⁴	21	32.2
	31	10 ³	10	67.7
	31	10 ²	1	96.8
<i>B. melitensis</i> Rev. 1	30	10 ⁴	3	90.0
	31	10 ³	1	96.8
	30	10 ²	0	100.0
Testigos	12	10 ⁴	11	8.3
	12	10 ³	12	0
	12	10 ²	12	0
	12	10 ¹	10	16.6

1) Se consideraron infectados los positivos bacteriológicamente y protegidos los animales cuyos bazos resultaron negativos en dos intentos de cultivo.

CUADRO 2

Alteraciones del bazo y serología en cobayos vacunados con vacuna fenol insoluble, *B. abortus* cepa 19 y *B. melitensis* Rev 1 expuestos a diferentes dosis de desafío con *B. abortus* 2308 ocho semanas después del desafío.

Vacuna	Dosis Desafío (UFC)	Número Animales	Sexo	Peso Promedio Animal	Índices Esplénicos (1)			Serología (2)
					Ancho	Largo	Peso	
Fenol insoluble	10 ⁴	30	Machos	844	2,84	5,28	0,69	959
	10 ³	31	Hembras	839	2,62	5,70	0,60	886
	10 ²	31	Machos	844	2,18	3,98	0,29	658
Cepa 19	10 ⁴	31	Machos	871	2,22	4,20	0,26	332
	10 ³	31	Hembras	860	1,70	3,83	0,23	87
	10 ²	31	Machos	857	1,62	3,38	0,09	75
Rev 1	10 ⁴	30	Machos	925	1,62	3,24	0,11	76
	10 ³	31	Hembras	898	1,55	3,56	0,11	40
	10 ²	30	Machos	864	1,53	3,47	0,09	30
Testigos	10 ⁴	12	Hembras	806	3,34	7,17	0,94	2416
	10 ³	12	Hembras	819	3,41	7,32	1,10	1310
	10 ²	12	Hembras	845	3,52	6,86	1,01	1000
	10 ¹	12	Hembras	851	2,63	6,22	0,68	1213

(1) Índices: Relación entre la medida o peso del bazo y el peso del animal expresado en gramos.

(2) Media geométrica del recíproco del título de aglutinación lenta o prueba de Wright.

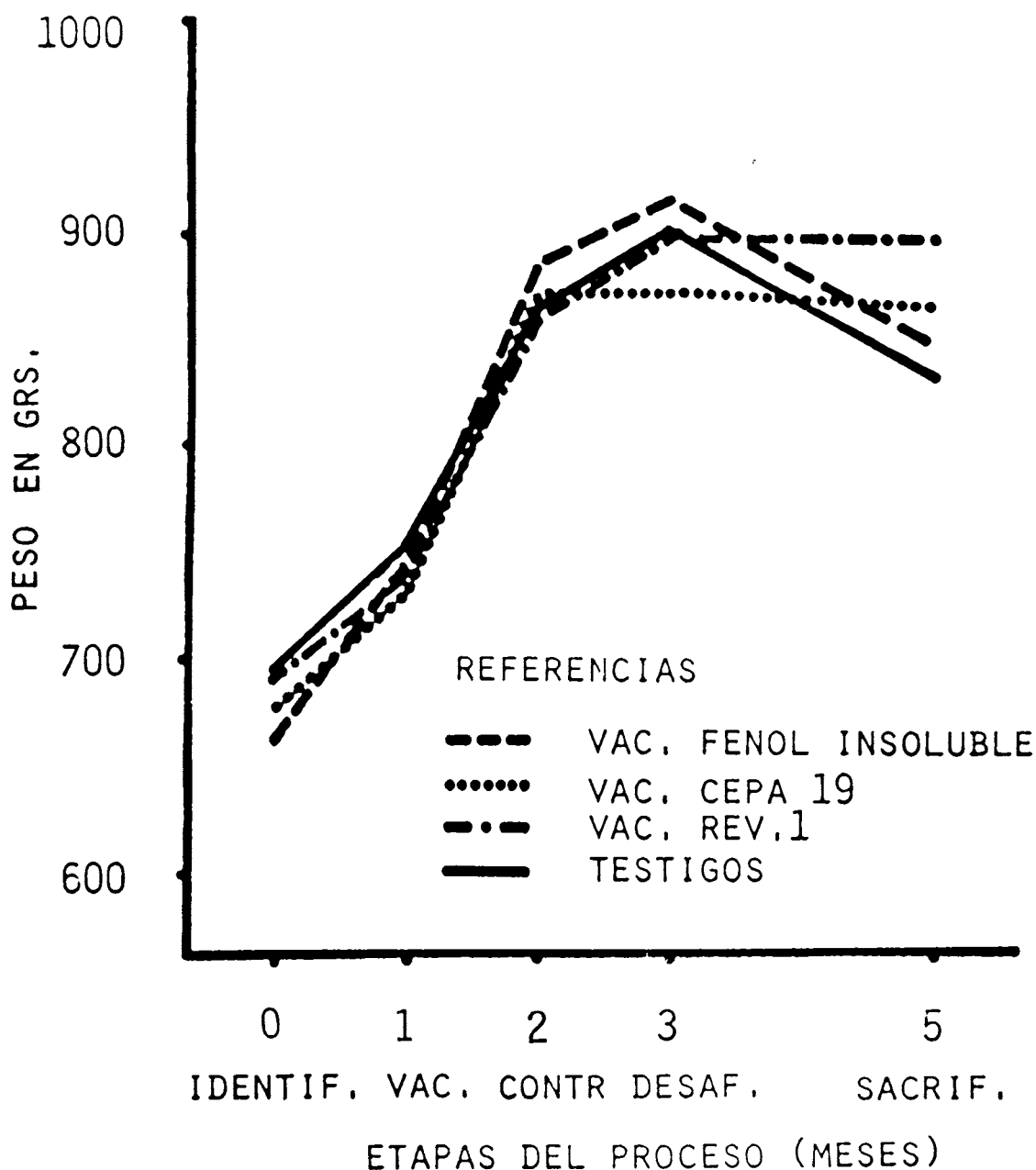


Fig. 1 — Variaciones del promedio de peso de cobayos vacunados con vacunas antibrucélicas fenol-insoluble, *B. melitensis* Rev. 1 y *B. abortus* cepa 19 y desafiados con *B. abortus* 2308.

medio entre 872 a 915 gramos. La estimación del peso al momento del sacrificio muestra una pérdida mayor en los grupos testigos y vacunados con vacuna Fenol Insoluble, con una pérdida promedio de 71 g y menor en los grupos vacunados con cepa 19 y Rev 1, los cuales, en promedio disminuyeron 9 y 2 g respectivamente.

DISCUSION

La protección conferida al cobayo por la vacuna P.I. en nuestro trabajo, fue inferior a la descrita por otros autores en experimentos realizados en el ratón. En nuestra experiencia el porcentaje de protección más alto, se observó en el gru-

po de cobayos desafiados con el nivel mínimo (10^2) de *Brucella abortus*, y aún en dicho nivel de desafío, solamente protegió al 16% de los animales. En este nivel mínimo de desafío (10^2), la protección conferida por las vacunas cepa 19 y Rev 1 fue del 96.8% y 100% respectivamente (Cuadro 1). La inmunidad otorgada por las vacunas vivas *Brucella abortus*, cepa 19 y *Brucella melitensis* Rev 1 (65.6% y 95.6% de protección respectivamente) fue significativamente superior a la conferida por la vacuna P.I.

La vacuna *Brucella melitensis* Rev 1 produjo mejor protección que las otras vacunas, tal cual lo observado en experimentos realizados en animales de laboratorio, cabras y bovinos^{4, 7, 8}.

La hipertrofia del bazo fue utilizada como indicador de infección por brucelas. Los índices esplénicos de los animales vacunados con la Fracción P.I. fueron superiores a los de las restantes vacunas (Cuadro 2); asimismo, los títulos serológicos más elevados (Cuadro 2) y la evolución del peso corporal, comparado con el grupo testigo y los restantes vacunados (Figura 1), son demostrativos de la infección producida por la cepa de desafío en el grupo vacunado con la Fracción P.I.

Los resultados de este experimento mostraron muy bajo poder inmunogénico de la vacuna fenol-insoluble en cobayos y a juzgar por dichos resultados no se justificaría su uso en el hombre.

SUMMARY

Phenol insoluble extract vaccine for the prevention of brucellosis in humans: evaluation in guinea pigs.

A phenol insoluble extract vaccine proposed to immunize men against brucellosis was tested for its ability in protecting guinea pigs against challenge with virulent *Brucella abortus* strain 2308.

Living attenuated *Brucella abortus* strain 19 and *B. melitensis* Rev. 1 were included in the experiment for comparison.

Ninety three animals were vaccinated in each group and subdivided in subgroups of 31

for challenge with 10^4 , 10^3 and 10^2 colony forming units of virulent *B. abortus* 2308.

A global analysis of the results showed protection of 11.9%, 65% and 95% in animals vaccinated with phenol insoluble extract, strain 19 and Rev. 1, respectively.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTON, G. G.; JONES, L. M.; GARCÍA-CARRILLO, C. & TRENCHI, A. — *Brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* 45/20. Vaccines in goats: Immunity. *Amer. J. vet. Res.*, 33: 1747-1751, 1972.
2. DESMETTRE, Ph.; JOUBERT, L.; VALETT, L. & ROUX, J. — Vaccine de la brucellose humaine obtenue a partir de la fraction phenolo-insoluble de *Brucella abortus* souche B 19; Production, controle, standardisation. *Develop. biol. Standard.*, 56: 579-586, 1984.
3. ELBERG, S. S. — A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. Geneva, World Health Organization, 1981. (VPH/81.31).
4. GARCÍA-CARRILLO, C. — Comparación de la inmunidad en cobayos vacunados con cepa 19 y con Rev. 1 desafiados con *B. abortus* un mes y un año después. *J. vet. Med. B.*, 33: 231-236, 1986.
5. GARCÍA-CARRILLO, C. — Comparison of *B. melitensis* Rev. 1 and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against brucellosis in cattle. *Zbl. Vet.-Med. B.*, 27: 131-138, 1980.
6. GARCÍA-CARRILLO, C. — Relationship between body weight and spleen size in guinea-pigs. *Lab. Anim.*, 11: 175-180, 1977.
7. GARCÍA-CARRILLO, C.; CASAS OLASCOAGA, C. R.; SZYFRES, B. & TRENCHI, A. — Protección de la vacuna cepa 19 contra *Brucella abortus* biotipos 1, 2 y 4. Ensayo en cobayos. *Rev. med. vet. (B. Aires)*, 58: 1-11, 1977.
8. GARCÍA-CARRILLO, C. & TRENCHI, A. — Estudio comparativo de la inmunidad conferida a cobayos por varios tipos de vacunas antibrucélicas. *Rev. Med. vet. (B. Aires)*, 55: 3-12, 1974.
9. LÓPEZ MERINO, A.; ASSELINAU, J.; SERRE, A.; ROUX, J.; BASCOUL, S. & LACAVE, C. — Immunization by an insoluble fraction extracted from *Brucella melitensis*: Immunological and chemical characterization of the active substances. *Infect. Immun.*, 13: 311-321, 1976.
10. ROUMIANTZEFF, M.; BENTEJAC, M. C. & VALETTE, L. — La nueva vacuna y el nuevo test brucélicos de uso humano. In: SOCIETE DE BIOPATHOLOGIE COMPAREE. Deux zoonoses majeures: La rage et la brucellose. Lyon, Collection Fondation Marcel Merieux, 1985. p. 83-89.
11. ROUX, J. — Epidemiologie et prevention de la brucellose. *Bull. Org. mond. Santé*, 57: 179-194, 1979.

Recebido para publicação em 2/5/1990.

Aprovado para publicação em 8/11/1990.