ANEXO I

Número de Proyecto: .....
Año: .....

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

1.0. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO:

"Relación entre la edad de vacunación y la persistencia sérica de inmunoglobulinas en terneras vacunadas contra brucellosis".

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada.
APLICADA: Consiste también en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero fundamentalmente dirigidos hacia un objetivo práctico específico.

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

2.0. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS:

- Departamento de Epizootiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.
- Departamento de Ciencias básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.
- Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), Oficina Regional La Pampa – San Luis.

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

- Laboratorio Tecnovax S. A. Luis Viale 2835, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (1416), Argentina. Tel.: 011-582-7879.

2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1. INTEGRANTES

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Investig	Respon-sabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo Dedicac. hs/sem
Meglia, Guillermo	Med. Vet.	III	D	Inmunología Esp.	Prof. Adj.	20
Gastaldo, Marcelo	Med. Vet.	s.c.	CD	Inmunología Esp.	J.T.P.	15
Alvarez Rubianes, N	Med. Vet.	IV	A	Virología	Prof. Adj.	10
Oriani, Susana	Med. Vet.	II	I	Microbiología	Prof. Adj.	10
Cerutti, Dante	Med. Vet.	s.c.	I	Obstetricia	Ayudante 1º	10
Dubarry, Jorge	Med. Vet.	IV	A	Patología	Prof. Adj.	10

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.2. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo Dedicac. Hs./Sem.
Baretta, Lorena	Facultad de Cs Veterinarias	Inicio en la Investigación	Meglia, Guillermo.	10
Herrero, Cristian	Facultad de Cs Veterinarias	Inicio de la Investigación	Meglia, Guillermo	10

2.3.3. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que aspira	Título del Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs/Sem.

2.3.4. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.5. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director **Co-Director** **Tesista**		

3.0. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (Máximo 3 años)

- **Dos años y dos meses.**

3.1. FECHA de INICIO: 02/01/2008. **FINALIZACIÓN:** 31/03/2010.

4.0. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

La brucelosis es una de las zoonosis bacterianas más importantes a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos desde décadas para su control y erradicación en el rodeo bovino argentino, aún continúa teniendo una elevada prevalencia, representando importantes pérdidas productivas y económicas en las explotaciones ganaderas. El objetivo del presente trabajo es determinar si existen diferencias en la persistencia de los títulos de anticuerpos contra brucelosis en dos grupos de terneras vacunadas entre los 3-5 meses y los 6-10 meses de edad. Se constituirán dos grupos de 25 terneras cada uno, e independientemente del grupo se muestrearán los animales mensualmente durante 15 meses tomando la primer muestra sanguínea al aplicar la vacuna. A través de la prueba tamiz BPA se determinará cualitativamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra brucelosis, y por medio de las pruebas confirmatorias de Wright y 2-ME se determinará cuantitativamente la presencia de inmunoglobulinas M y G. La inclusión en el proyecto de la prueba de polarización fluorescente nos permitirá determinar el grado de pertinencia de sus

resultados con el 2-ME, como prueba confirmatoria. Se espera poder concluir sobre el momento adecuado de la vacunación, para reducir el riesgo de animales falsos positivos y sobre la veracidad y ventajas de la prueba de polarización fluorescente.

5.0. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

La brucelosis es una de las principales zoonosis de origen bacterianas de importancia global. Es una enfermedad infecto-contagiosa causada por una bacteria GRAM negativo que afecta a los bovinos, entre otras especies, ocasionando importantes pérdidas económicas como consecuencia de infertilidad (Cutler et al., 2005). A pesar de su condición de zoonosis y de que existe un plan nacional de vacunación y erradicación de la enfermedad, la prevalencia en el rodeo bovino local aún continua siendo elevada, alrededor del 4-6% (Samartino, 2002). En ciertos países como Israel, Kuwait, Arabia Saudita, Brasil y Colombia la brucelosis es considerada una enfermedad re-emergente (Corbel, 1997). No obstante, existen numerosos ejemplos donde la seriedad en el desarrollo e implementación de las campañas de vacunación han resultado en la erradicación de la enfermedad, tal el caso de países del norte de Europa.

En el año 2005, el Plan Provincial de Activación Ganadera estimó en La Pampa una población de 4.100.000 bovinos, y si consideramos que la mitad del rodeo son hembras, estaríamos contando con 2.050.000 animales. Partiendo de las conclusiones hechas por Samartino (2002), que halló una prevalencia de brucelosis del 5%, hipotéticamente 102.500 hembras de nuestro rodeo provincial, solamente atribuible a esta enfermedad, podrían estar sufriendo algún grado de infertilidad que se traduce en cuantiosas perdidas productivas y económicas para las explotaciones ganaderas. En este simple planteo, no se incluyen los machos enteros y el potencial riesgo de infección al personal que trabaja en estrecho contacto o hacen usufructo de ellos. Como resultado de este análisis escueto, consideramos necesario el compromiso de recursos para el desarrollo de trabajos científicos y la incorporación de nuevas tecnologías que ayuden a comprender la compleja epidemiología de esta enfermedad.

La vacuna de uso en la actualidad en Argentina es la cepa 19 de *Brucella abortus*, viva, de probada efectividad y seguridad con una tasa de infección residual de 2-3 cada 100.000 terneras vacunadas (Szyfres, 1983). Ante el desafío antigénico vacunal, se generan anticuerpos diagnósticos detectables por la prueba tamiz de uso oficial, Antígeno Buferado en Placa (BPA), y a medida que el animal crece, la concentración sérica de anticuerpos disminuye. La vacuna esta indicada para hembras prepúberes, puesto que la vacunación en hembras sexualmente activas dificultaría el diagnóstico diferencial entre infección y vacunación por la persistencia de los anticuerpos. Por razones prácticas de manejo de las explotaciones ganaderas, el plan nacional contempla la vacunación de todas las hembras entre los 3-8 meses de edad (SENASA, 2002). Este amplio periodo de vacunación de cinco meses, hipotéticamente hablando puede ser considerado como excesivamente amplio, ya que durante dicho lapso existen importantes cambios en el desarrollo del animal, que pueden afectar la respuesta inmunitaria de protección contra la enfermedad. Existe escasa evidencia científica que documente la influencia de la edad de vacunación de las terneras, dentro del periodo permitido de vacunación, con la persistencia de los títulos de anticuerpos diagnósticos. Solamente datos procedentes de estudios realizados en Estados Unidos durante la década del 60 demostraron (King y Frank, 1961) una relación positiva entre persistencia de anticuerpos diagnósticos y edad de vacunación de las terneras. A la fecha y sin el conocimiento de los autores, no existe evidencia científica local que documente la curva de persistencia de anticuerpos en terneras vacunadas a diferente edad contra brucelosis bajo nuestras condiciones de producción.

El diagnóstico de brucelosis en bovinos se basa en la prueba tamiz BPA y las pruebas confirmatorias en paralelo de Wright o seroaglutinación en tubo y 2 Mercapto etanol (2-ME). Recientemente ha sido aceptada por la Organización Mundial para la Sanidad Animal a la

Polarización Fluorescente (FPA) como prueba confirmatoria en el diagnóstico de brucelosis para el transporte internacional de ganado, y como prueba alternativa para el transporte internacional de cerdos (OIE, 2004). En nuestro país, a través de la resolución del SENASA Nº 438/2006 también ha sido incorporada esta técnica como prueba confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis, pero la información que se posee bajo nuestras condiciones y como prueba de reemplazo del 2-ME es muy escasa.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el (los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

- Determinación de la seroprevalencia de cepas lisas y rugosa de brucella en ovinos. Integrantes: Meglia, G. E., Gastaldo, M. F., Alvarez Rubianes, N., Dubarry, J., Oriani, D. S. y Gomez, B. 2006-2007.

- Causas de aborto en rodeos bovinos de la región noreste de La Pampa, Argentina. Integrantes: Campero, C., Bartolomé, J., Oriani, D. S., Alvarez Rubianes, N, Colazo, M. 1999.

- Seroprevalencia a infecciones con *Brucella abortus* y *Mycobacterium bovis* en rodeos de cría del Departamento Mara-Co, La Pampa (Argentina). Integrantes: Oriani, D. S., Alvarez Rubianes, N. 1995.

6.0. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Problema Científico:

- Existe un consenso generalizado, con escaso sustento científico, que vacunando las terneras a una mayor edad, dentro del límite oficial de 3-8 meses de edad, persisten los anticuerpos séricos por mas tiempo complicando la interpretación de los test diagnósticos.
- Laboratorios y veterinarios del área de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias hallaron importantes diferencias en los resultados entre las pruebas de 2-ME y la Polarización Fluorescente. A su vez, el 2-ME como prueba confirmatoria de brucelosis posee una serie de desventajas en relación a la prueba de Polarización Fluorescente, como la utilización de sustancia oncogénicas y el tiempo en la obtención de los resultados (48 horas).

Objetivos:

- Comprobar que la edad de vacunación de las terneras contra brucellosis afecta la persistencia de los anticuerpos séricos.
- Corroborar si existe diferencia diagnóstica entre las pruebas de 2-ME y polarización fluorescente (FPA).

Hipótesis:

- Al vacunar las terneras a más temprana edad (3 meses) la persistencia de los anticuerpos séricos es menor, en relación a aquellos vacunados a una edad mas avanzada (8 meses).
- Los resultados entre las pruebas de 2-ME y Polarización Fluorescente poseen una significativa correlación.

Resultados Esperados:

- Creemos hallar diferencias en la persistencia de los títulos de anticuerpos séricos como consecuencia de las diferentes edades de vacunación. La vacunación a mayor edad estaría relacionada con una mayor persistencia de los anticuerpos séricos.
- En concordancia con investigaciones realizadas en otros países, creemos hallar pertinencia entre los resultados del 2 M-E y la prueba de polarización fluorescente.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

- El proyecto se llevará a cabo en el establecimiento privado "Don Benjamín", en la zona rural de Rancul, Provincia de La Pampa. El mismo esta declarado como establecimiento libre de brucelosis por el SENASA.
- Sesenta (60) terneras de raza británica serán identificadas individualmente y se asignarán por edad en dos grupos de treinta (30) animales cada uno. Las terneras que componen el grupo 1 (g1) se vacunarán por vía subcutánea entre los 3,5-4,5 meses de edad, mientras que las que componen el grupo 2 (g2) se vacunarán por la misma vía entre los 7,5-8 meses de edad.
- Independiente del grupo, se tomará una muestra sanguínea por animal y por mes durante 15 meses seguidos, tomando la primera muestra al aplicar la vacuna.
- Un tercer grupo de treinta vacas adultas seronegativas a brucelosis se muestrearán mensualmente constituyendo el grupo control negativo (Gcn).
- Vacuna contra brucelosis bovina: se utilizará la vacuna del laboratorio Agropharma, vacuna elaborada con la cepa 19 de *Brucella abortus*, conteniendo entre 15 x 10^9 a 30 x 10^9 células bacterianas en fase lisa por cada dosis de 2 mL.
  - *Vacuna: Agropharma, Serie 85, Vencimiento: Marzo de 2009*

- Las muestras sanguíneas se centrifugarán a 2000 rpm durante quince minutos para la obtención del suero. El mismo se almacenará en tubos plásticos a -20º C para su posterior análisis.
- Las muestras serán analizadas para la presencia o ausencia de anticuerpos contra brucellosis a través de la prueba tamiz antígeno buferado en placa (BPA), y las confirmatorias de Wright o seroaglutinación en tubo (IgM e IgG) y dos mercapto etanol (2-ME) (IgG). Se corroborará el grado de pertinencia de los resultados de la prueba de polarización fluorescente (FPA) con los resultados del 2-ME.
- Desarrollo de las técnicas:

Antígeno Bufferado en Placa - BPA: 80 microlitos de suero es mezclado con 30 μL de antígeno e incubado en una cámara húmeda durante cuatro minutos a temperatura ambiente, luego es mezclado nuevamente e incubado por cuatro minutos mas hasta su lectura según se describe en Bovine brucellosis, OIE, 2004.

Wright o seroaglutinación en tubo: Empleando una batería de tubos, se colocan los siguientes volúmenes séricos: 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL, 0,01 mL y 0,005 mL. Luego se coloca 1 mL de solución fisiológica con 0,5 ‰ de fenol y finalmente 1 mL de antígeno al 2% en solución fisiológica, obteniéndose diluciones finales de suero de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400. Los tubos se incuban a 37º C durante 20 horas y se leen los resultados como es descripto en Alton et al., 1976.

Mercapto Etanol - 2 M-E: Empleando una batería de tubos, se colocan los siguientes volúmenes séricos: 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL, 0,01 mL y 0,005 mL. A continuación se colocan 1 mL de 2-ME 0,1 M y transcurrido 60 minutos se agrega 1 mL de antígeno al 2% obteniéndose diluciones de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400, se agitan y se incuban a 37º C durante 48 horas para su lectura según Alton et al., 1976.

Fluorescencia Polarizada - FPA: El tests emplea un extracto del polisacárido O de la pared celular de *Brucella abortus* que se conjuga con un marcador fluorescente, para la determinación de anticuerpos específicos. El polarizador de fluorescencia mide el grado de polarización emitida por el antígeno conjugado. Luego este, es mezclado con el suero problema y en caso de la existencia de anticuerpos específicos se enlazan con el compuesto conjugado y se detecta un aumento de la polarización en escasos 5 minutos, según es descrito por Nielsen et al., 1996.

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

- La información que se posee actualmente referente al tema, procede de los Estados Unidos, de la década del 60, bajo sistemas productivos y ambientales diferentes a nuestras condiciones de producción. Por consiguiente, es necesario generar información científica local que documente la relación de la edad de vacunación de las terneras con la persistencia de los anticuerpos séricos.
- Se espera poder generar información fidedigna para informar a los profesionales hasta que edad es más apropiado vacunar a las terneras tratando de evitar que la persistencia de los anticuerpos vacunales interfieran en el diagnóstico.
- Creemos muy importante ir incorporando nuevas tecnologías (Polarización Fluorescente), en concordancia con el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) y la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE, 2004) para diagnosticar con rapidez y precisión las enfermedades. Es imprescindible que los avances tecnológicos sean incorporados rápidamente en las Instituciones Públicas, como la Facultad de Ciencias Veterinarias, para difundir los conocimientos desinteresadamente y así facilitar el desarrollo productivo de la Provincia y su zona de influencia. De este modo se contribuirá al control y la erradicación de la enfermedad en pos de favorecer la calidad sanitaria de los alimentos para consumo humano, como también el comercio con otros países.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

- Enero de 2008: Elección de los animales que formarán parte del trabajo. Compra de los insumos necesarios para el inicio de la toma de muestras.
- Febrero de 2008 - Mayo de 2009: Toma de muestras y acondicionamiento de las mismas para su posterior análisis.
- Junio de 2009 - Marzo de 2010: Análisis de las muestras, obtención y evaluación de los resultados, y redacción del informe final del proyecto.

7.0. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

- Laboratorio acondicionado para el procesamiento de muestras sanguíneas, comprendiendo centrífuga, heladera, freezer, tubos, pipetas, dosificadores, agujas, etc.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

- Polarizador fluorescente: Descripción, Instrumento Sentry FP-100. Origen: Estados Unidos. Proveedor: Prionics Argentina S. A. Av. Libertador 336 3º A, 1001 Buenos Aires, Argentina. Tel: 011-4326-3309. www.prionics.com

- Micropipetas: Descripción, Micropipetas electrónicas Acura Electro volumen regulable, Socorex, Suiza (Modelo 925). Proveedor: GLOBAL LAB S. A. Rodríguez Peña 660 3º piso, 1020 Buenos Aires, Argentina. Tel: 011-58113078. www.globallab.com.ar

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual) *

Equipamiento e Infraestructura: (Micropipetas)	**$ 5000**
Bienes de Consumo: - Gastos para el acondicionamiento y transporte de las muestras, compra de tubos al vacío (vacutainer)	**$ 500**
- Gastos análisis de Polarización Fluorescente 5$ x muestra, se calcula aproximadamente 60 muestras/mes, 15 meses	**$ 4500**
Bibliografía:	**$ 1000**
Viajes	**$ 1600**
Personal de Apoyo	
Gastos de presentación a congresos	**$ 3000**
Total	**$ 15600**

***El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.**

8.0. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, H., Agab, H. 2002. A review of camel brucelosis. Preventive Veterinary Medicine, 55: 47-56.

Alton, G. G., Jones, L. M., Pietz, D. E. 1976. Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. 2º Edición. Organización Mundial de la Salud, Ginegra, Suiza, 1976.

Corbel, M. 1997. Brucellosis: an Overview. Emerging Infectious Diseases, April - June, 3: 213-221.

Cutler, S. J., Whatmore, A. M., and Commander, N. J. 2005. Brucellosis - new aspect of an old disease. Journal of Applied Microbiology, 98: 1270-1281.

King, N. B., and Frank, N. A. 1961. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 Brucella abortus vaccine. Journal of American Veterinary Medical Association, July 1, 139: 100-103.

Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Nicoletti, P., Thomas, F. 1996. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. Journal of immunology Methods, 195: 161-168.

Organización Internacional de Epizootias (OIE). 2004. Bovine brucellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th Ed. OIE, Paris. pp 409-438.

Samartino, L. E. 2002. Brucellosis in Argentina. Veterinary Microbiology, 90: 71-80

Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). 2002. Restablecer el Programa de control y erradicación de la brucelosis bovina en todo el país. Resolución 150/2002.

Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). 2006. Programa de control y erradicación de la brucelosis bovina. Resolución 438/2006.

Szyfres, B. 1983. El diagnóstico de la brucelosis bovina en el contexto de un programa de lucha. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) Boletín Técnico Nº 2. Buenos Aires, Argentina.