

Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca

Identification of *Brucella abortus* S19 vaccinal strain in cow milk samples

Luany Carolina Martínez Chavarría* Antonio Verdugo Rodríguez*
Rigoberto Hernández Castro*

Abstract

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella* which affects several domestic and wild life animals, as well as humans. Until the past decade, strain 19 (S19) of *B. abortus* was used as the vaccine for brucellosis in cattle in Mexico. *Brucella abortus* S19 carries a deletion in two genes of the operon *ery*, responsible for the erythritol catabolic pathway. Since 1997, *B. abortus* strain RB51 was officially approved in Mexico for its use as a vaccine for cattle. This strain has an insertion sequence (IS) named IS711, which interrupts the *wboA* gen. Based on this knowledge, two PCR assays were standardized to allow the identification of strains S19 and RB51, and distinguish them from other *Brucella* species and biotypes. These assays were used for characterization of 11 field strains of *B. abortus* isolated from milk of cattle. A 456-bp DNA fragment was amplified from all strains when PCR, that identifies RB51, was used, discarding the presence of vaccine strain RB51 among the field strains. In contrast, when the assay to identify strain S19 was performed, a 1063-bp DNA fragment was amplified from nine strains, while the other two were identified as vaccine strain S19 by amplification of a 361-bp DNA fragment. The finding of vaccine strains among this isolates is important to both epidemiological and government level, due to their direct and indirect implications on the National Campaign for Control and Eradication of Bovine Brucellosis.

Key words: BRUCELOSIS, BOVINE, PCR

Resumen

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano que afecta tanto al humano como a diferentes especies animales domésticas y silvestres. En la década pasada, la vacuna que se usaba ampliamente en los bovinos era la cepa vacunal *B. abortus* S19, que tiene una delección en dos de los genes del operón *ery* que participa en el catabolismo del eritritol. En México, desde 1997 se aprobó la cepa *B. abortus* RB51 como vacuna para el ganado. Esta cepa presenta una secuencia de inserción (IS) conocida como elemento IS711, que interrumpe el gen *wboA*. La presencia de una delección en la cepa S19, así como del elemento IS711 que interrumpe el gen *wboA* en la cepa RB51, puede evidenciarse fácilmente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con base en este hecho se estandarizaron dos ensayos de PCR que permiten identificar y diferenciar a las cepas S19 y RB51, respectivamente, de todas las demás especies y biotipos de *Brucella*. Estos ensayos se utilizaron para la caracterización de 11 cepas de campo de *Brucella abortus* procedentes de leche bovina. A partir de las once muestras se amplificó un producto de 456 pb con la PCR que identifica a la cepa vacunal RB51, descartando con ello la presencia de dicha cepa en las de campo. Con la PCR que identifica a la cepa S19, nueve de las 11 muestras amplificaron un producto de 1063 pb, mientras que dos lo hicieron para un producto de 361 pb, ello significa que estas dos cepas de campo corresponden a cepas vacunales S19 de *B. abortus*. El hallazgo de cepas vacunales dentro de dichas cepas es de importancia tanto a nivel epidemiológico como oficialmente, debido a las implicaciones directas e indirectas que tiene sobre la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina.

Palabras clave: BRUCELOSIS, BOVINO, PCR.

Recibido el 30 de noviembre de 2005 y aceptado el 23 de mayo de 2006.

*Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia: Rigoberto Hernández Castro, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Tel.: 5622589, Fax: 56225971, correo electrónico: rhc@servidor.unam.mx

Introduction

Brucellosis is a worldwide disease which affects several domestic and wild life animal species, as well as humans. This disease is caused by bacteria of the genus *Brucella*.¹

In cattle, brucellosis is primarily caused by *B. abortus*, less frequently by *B. melitensis* and rarely by *B. suis*.^{2,3} Infection affects reproductive organs and causes abortion or premature calving during the last third of gestation. Other signs of brucellosis in cows can include lowering of fertility with poor conception rates, decrease in milk production and lengthening of the interpregnancy interval.⁴

In humans, this disease affects several organs and systems and causes many unspecific signs and symptoms, by which diagnostic is difficult because the disease can be confused with another pathologies.^{5,6}

Brucellosis is a chronic course disease that implies great repercussions in public and animal health, causing devastating economic losses because its treatment generates high costs, and to restrictions applied to infected animals and their products.⁷ In 1995, the Agriculture, Cattle, Rural Development, Fish and Food Department (Sagarpa), issued the Mexican Official Norm 041-ZOO-1995 denominated National Campaign for the Eradication of Animal Brucellosis. Essentially, the Campaign follows two strategies, the herd diagnosis focused on the establishment of free herds, and vaccination programs.⁸

Until the past decade, strain 19 (S19) of *B. abortus* was used for the vaccination against cattle brucellosis in Mexico. Strain 19 is an attenuated organism of smooth morphology unable to grow in presence of erythritol, which is a sugar used by *Brucella* in preference to glucose.⁹ *Brucella abortus* S19 carries a 702 bp deletion in the genes *eryC* and *eryD* of the operon *ery*, responsible for the erythritol catabolic pathway.^{10,11}

On the other hand, since 1997, *B. abortus* strain RB51⁷ was officially approved in Mexico to be used as the cattle vaccine strain. This is a live, attenuated rough strain; derived from the virulent smooth strain *B. abortus* 2308.¹² Strain RB51 has an 842 bp insertion sequence known as IS711, which interrupts the *wboA* gene that codifies a glycosyltransferase enzyme, essential in the LPS biosynthesis.¹³

Deletion in locus *ery*, present in Strain,¹⁹ as well as the IS711 element in the *wboA* gene of strain RB51 are unique molecular traits which provide a diagnostic method for the identification of these strains. Using such genetic markers, Sangari *et al.*¹¹ and Vemulapalli *et al.*¹³ developed a polymerase chain reaction (PCR) which is useful to identify and distinguish strains S19 and RB51, respectively, from other *Brucella* species and strains. In this work both PCR assays to detect the

Introducción

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial que afecta a diferentes especies animales domésticas y silvestres, así como al humano, la ocasionan bacterias del género *Brucella*.¹

En el ganado bovino, es causada principalmente por *B. abortus*, con menor frecuencia por *B. melitensis* y en raras ocasiones por *B. Suis*.^{2,3} La enfermedad afecta los órganos reproductores y provoca abortos en el último tercio de la gestación, disminución de la producción láctea, alargamiento del periodo interparto del ganado e infertilidad.⁴

En el humano, esta enfermedad afecta varios órganos o sistemas del cuerpo, y presenta diversos signos y síntomas inespecíficos, por ello es difícil diagnosticarla debido a que puede confundirse con otras patologías.^{5,6}

La brucelosis es una enfermedad de curso crónico con graves repercusiones en la salud pública y animal, provoca grandes pérdidas económicas debido a que su tratamiento propicia altos costos, y a las restricciones tanto en animales infectados como a sus productos.⁷ En 1995 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa), expidió la Norma Oficial Mexicana 041-ZOO-1995 denominada Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. Las estrategias de la campaña son básicamente dos: el diagnóstico de hatos, cuyo objetivo final es el establecimiento de hatos libres, y la vacunación.⁸

En México, en la década pasada se utilizaba como vacuna para los bovinos la cepa *B. abortus* S19, cepa lisa y atenuada, incapaz de crecer en presencia de eritritol, un azúcar utilizado por el género *Brucella*.⁹ La cepa S19 presenta una delección de 702 pb que afecta a los genes *eryC* y *eryD* del operón *ery* que participa en el catabolismo del eritritol.^{10,11}

Por otro lado, desde 1997 se aprobó en México como vacuna oficial para los bovinos la cepa *B. abortus* RB51,⁷ cepa rugosa atenuada derivada de la cepa *B. abortus* 2308, cepa lisa y virulenta.¹² La cepa RB51 presenta una secuencia de inserción de 842 pb conocida como elemento IS711 que interrumpe el gen *wboA*, que codifica una glicosiltransferasa, enzima esencial en la biosíntesis del lipopolisacárido.¹³

La delección en el locus *ery* que presenta la cepa *B. abortus* S19, así como la mutación en el gen *wboA* por el elemento IS711 en la cepa RB51 de *B. abortus*, son características moleculares únicas que proveen un método diagnóstico para identificar a estas cepas. Con base en dichos marcadores genéticos, Sangari *et al.*¹¹ y Vemulapalli *et al.*¹³ diseñaron una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) capaz de identificar y diferenciar a las cepas S19 y RB51, respectivamente,

presence of vaccine strains in eleven *B. abortus* strains isolated from cow milk samples, were used.

Bacterial strains

Strains used in this work are listed in table 1. *B. abortus* 2308 is a smooth, virulent, nalidixic acid resistant strain; *B. abortus* 544 is a rough virulent strain. Eleven field isolations were obtained from cow milk and they were identified as *B. abortus* biotype 1 by means of standard microbiological tests for *Brucella*.¹⁴

All isolates were grown on *Brucella* agar* for 24 to 72 h at 37°C. Medium cultures were supplemented with nalidixic acid** (15 µg/mL).

DNA extraction

Genomic DNA extraction from pure cultures of the S19 and RB51 vaccine strains, as well as control strains 2308 and 544, was performed using a guanidin tyocianate-base technique, described previously by Pitcher *et al.*¹⁵ To perform the PCR, 100 ng of purified DNA were used as template.

A 2 mm-sized freshly isolated colony from each field isolate, was taken from the culture medium and it was suspended in 200 µL sterile water. Afterwards, it was incubated for 15 min at 90°C in water bath and centrifuged at 11 000 *g* for 5 min; 10 µL of the supernatant were used as DNA template in the PCR assay.

de otras especies y cepas de *Brucella*. En este trabajo se utilizaron ambos ensayos de PCR para detectar la presencia de cepas vacunales en once aislamientos de campo de *B. abortus* procedentes de leche de vaca.

Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en el Cuadro 1. *B. abortus* 2308 es una cepa lisa, virulenta, resistente al ácido nalidíxico; *B. abortus* 544 es una cepa rugosa virulenta. Las 11 cepas de campo se aislaron a partir de leche de vaca, fueron identificadas como *B. abortus* biotipo 1 por medio de pruebas microbiológicas estándar para *Brucella*.¹⁴

Todas las cepas se cultivaron en agar *Brucella** a 37°C de 24 a 72 h. Los medios de cultivo se complementaron con ácido nalidíxico** a una concentración final de 15 µg/mL.

Extracción de ADN

Para las cepas vacunales S19 y RB51, así como para las cepas testigo 2308 y 544, la extracción del ADN genómico se realizó mediante una técnica donde se utiliza tiocianato de guanidina, descrita previamente por Pitcher *et al.*¹⁵ a partir de cultivo puro. Se emplearon 100 ng del ADN extraído como templete para realizar la PCR.

*Oxoid, Hampshire, Inglaterra

**Merck, Darmstadt, Alemania

Cuadro 1
CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO
BACTERIAL STRAINS USED IN THIS WORK

Specie	Biotype	Strain	Source
Control strains			
<i>B. abortus</i>	1	S19	Brovel
<i>B. abortus</i>	1	S19	National Producer of Veterinary Biologics (Pronabive)
<i>B. abortus</i>	1	RB51	Dr. J. M. García Lobo
<i>B. abortus</i>	1	RB51	Pronabive
<i>B. abortus</i>	1	RB51	Schering Plough
<i>B. abortus</i>	1	2308	Dr. J. M. Garcia Lobo
<i>B. abortus</i>	1	544	Dr. J. M. Garcia Lobo
Field strains			
<i>B. abortus</i>	1	136	Forest and Agricultural National Research Institute (INIFAP)
		187	
		259	
		325	
		499	
		596	
		615	
		657	
		700	
		708	
		770	

PCR

The polymerase chain reaction for *B. abortus* S19 strain, was performed as described previously by Sangari *et al.*¹¹, and as described by Vemulapalli *et al.* for *B. abortus* RB51 strain.¹³

For *B. abortus* S19 strain, oligonucleotides are flanking the *ery* operon sequence which contains the 702-bp deletion. The expected PCR product from S19 is a 361-bp fragment and a 1063-bp fragment from other strains, which have the complete *ery* locus.

To identify RB51 strain, a 1298-bp product will be amplified by oligonucleotides flanking the *wboA* gene sequence which carries the IS711 insertion sequence. From other strains, a 456-bp PCR product will be amplified, due to the absence of the IS711 element in the *wboA* gene (Table 2).

PCR assay from vaccine strains as well as field isolates and control strains, were carried out in a 50- μ L total volume, which contained PCR 1X buffer*, magnesium 1-mM,** DNTP 200 μ M,*** 1- μ M of each oligonucleotide† and 2 units of Taq polymerase.‡

The PCR for RB51 strain identification (PCR-1) was carried out as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1.5 min and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR for S19 strain identification (PCR-2) was carried out as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles at 94°C for 1 min, 59°C for 30 s and 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 2 min.

Purified DNA from S19 and RB51 vaccinal strains, and control strains (2308 and 544) were used as template to carry out the PCR assay that identifies vaccine strains RB51 (PCR-1) and S19 (PCR-2).

PCR-1 amplified a 1298-bp product for vaccine strain RB51 because this strain has the IS711 element insertion, and a 456-bp for other strains. This result confirms the work done by Vemulapalli *et al.*¹³ (Figure 1).

PCR-2 amplified a 361-bp product from with *B. abortus* strain S19. Other strains amplified a 1063-bp PCR product, since these strains have the complete *ery* locus (Figure 2).

Para las cepas de campo, se tomó del medio de cultivo una colonia bacteriana de 2 mm de diámetro y se resuspendió en 200 μ L de agua estéril. Posteriormente se incubó en baño María a 90°C por 15 min y fue centrifugada a 11 000 *g* durante 5 min; se usaron 10 μ L del sobrenadante como template de ADN para llevar a cabo la PCR.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó como lo describe Sangari *et al.*¹¹ para la cepa *B. abortus* S19 y según lo descrito por Vemulapalli *et al.*¹³ para la cepa *B. abortus* RB51.

Para la cepa *B. abortus* S19, los oligonucleótidos se encuentran flanqueando la secuencia del operón *ery* en la que se halla la delección de 702 pb y amplifican un producto de 361 pb cuando se trata de la cepa S19, y un producto de 1 063 pb para las demás cepas, ya que éstas poseen completo el locus *ery*.

En cuanto a la cepa RB51, los oligonucleótidos se encuentran flanqueando la secuencia del gen *wboA* en la que se halla la secuencia de inserción IS711 y amplifican un producto de 1 298 pb cuando se trata de la cepa RB51 y un producto de 456 pb cuando se trata de cualquier otra cepa, ya que éstas no presentan el elemento IS711 en el gen *wboA* (Cuadro 2).

La PCR, tanto para las cepas vacunales como para las cepas testigo y las cepas de campo, se realizó en un volumen total de 50 μ L, que contenía amortiguador para PCR 1X*, 1 mM de magnesio**, 200 μ M de cada nucleótido trifosfatado,*** 1 μ M de cada oligonucleótido† y dos unidades de Taq polimerasa.‡

Los ciclos de la reacción de PCR para identificar a la cepa RB51 (PCR-1) fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C por 1.5 min y una extensión final a 72°C durante 5 min. Los ciclos para la reacción de PCR que identifica a la cepa S19 (PCR-2) fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a

*Promega, Madison WI, Estados Unidos de América.

**Promega, Madison WI, Estados Unidos de América.

***Promega, Madison WI, Estados Unidos de América.

†Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos de América

‡Promega, Madison WI, Estados Unidos de América.

Cuadro 2
SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO
OLIGONUCLEOTIDES SEQUENCE USED IN THIS WORK

Oligonucleotide	Sequence	Genes
S19-1	5' TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT 3'	<i>eryC-eryD</i>
S19-2	5' CCCAGAAGCGAGACGAAACG 3'	
RB51-1	5' TTAAGCGCTGATGCCATTCCTTCAC 3'	<i>wboA</i>
RB51-2	5' GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA 3'	

It was decided to use the standardized PCR technique to characterize the 11 field strains of *Brucella abortus* isolated from cow milk samples. Both PCR-1 and PCR-2 were carried out on these field strains.

All samples showed a 456-bp product when PCR-1 was performed. Thus, these results ruled out the presence of vaccine strain RB51 among the field strains (Figure 3 a y b).

Using PCR-2, nine of the eleven samples amplified a 1063-bp product, while two of them amplified a 361-bp. Hence, these two field strains correspond to vaccine strains S19 of *B. abortus* (Figure 4 a y b).

In this work PCR assays standardized previously by Sangari *et al.*¹¹ and Vemulapalli *et al.*¹³ were used to detect the presence of vaccine strains among eleven field isolations of *B. abortus* biotype 1 proceeding from cow milk.

When PCR-1 was carried out, the eleven field strains amplified a 456-bp product, result that discarded the presence of vaccine strain RB51 of *B. abortus*.

On using PCR-2, nine of the field strains amplified a 1063-bp product; nevertheless, two strains amplified a 361-bp product, which indicated the presence of two vaccine strains S19 of *B. abortus* among the 11 field strains.

These results are of great significance to the government as for the epidemiological level, due to the direct and indirect implications on the National Campaign for the Eradication of Animal Brucellosis.

The persistence of post-vaccinal serologic titers that interfere with serological tests interpretation is one of the most important disadvantages of the vaccinal strain S19 of *B. abortus*.^{16,17} This fact make the use of vaccine S19 incompatible with the simultaneous application of the brucellosis control procedures.

94°C por 1 min, 59°C por 30 s y 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por dos min.

El ADN extraído a partir de cultivos puros de las cepas vacunales (S19 y RB51) y de las cepas testigo (2308 y 544) se utilizó para realizar la PCR que identifica las cepas vacunales RB51 (PCR-1) y S19 (PCR-2) de *Brucella abortus*.

Con la PCR-1, los oligonucleótidos amplificaron un producto de 1298 pb para la cepa vacunal RB51, ya que ésta presenta la inserción del elemento IS711 y un producto de 456 pb para las demás cepas, con ello se confirma lo descrito por Vemulapalli *et al.*¹³ (Figura 1).

Al realizar la PCR-2 el producto de amplificación obtenido a partir de la cepa *B. abortus* S19 fue de 361 pb. Las demás cepas, al poseer el locus *ery* completo, dieron como resultado un producto de amplificación de 1 063 pb (Figura 2).

Al estandarizarse la técnica de PCR para las cepas vacunales, se decidió utilizar esta técnica para la caracterización de las 11 cepas de campo de *Brucella abortus* procedentes de leche de vaca. A todas las cepas se les realizó tanto la PCR-1 como la PCR-2.

A partir de las once muestras se obtuvo un producto de amplificación de 456 pb con la PCR-1, por lo cual se descarta la presencia de alguna cepa vacunal RB51 dentro de las cepas de campo (Figura 3 a y b).

Con la PCR-2, nueve de las once muestras amplificaron un producto de 1 063 pb, mientras que dos de ellas amplificaron un producto de 361 pb, ello significa que estas dos cepas de campo corresponden a cepas vacunales S19 de *B. abortus* (Figura 4 a y b).

En este trabajo se utilizaron los ensayos de PCR estandarizados previamente por Sangari *et al.*¹¹ y Vemulapalli *et al.*¹³ para detectar la presencia de cepas

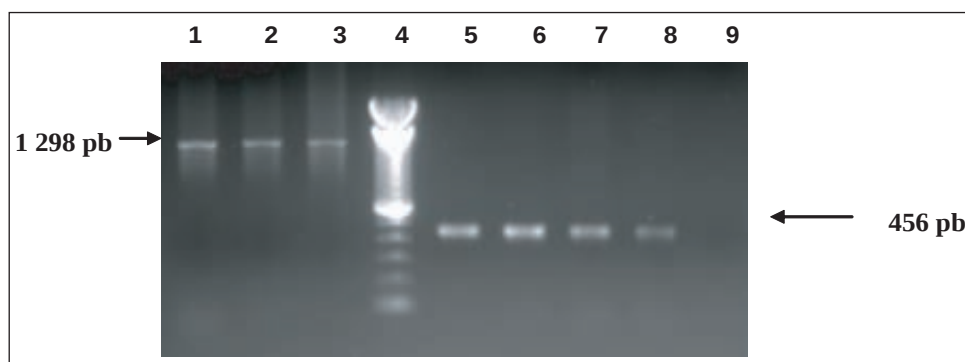


Figura 1: Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio en el que se separan los productos amplificados con la PCR-1. 1: *B. abortus* RB51 (EUA). 2: *B. abortus* RB51 (Pronabive). 3: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). 4: Marcador de peso molecular 100 pb ADN Ladder. 5: *B. abortus* 2308. 6: *B. abortus* 544. 7: *B. abortus* S19 (Brovel). 8: *B. abortus* S19 (Pronabive). 9: Testigo negativo (agua). Con las flechas se señala el producto de 1 298 pb característico de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus* y el producto de 456 pb que se amplifica a partir de cepas diferentes a ésta.

Figure 1: 1% Agarose gel in TAE stained with ethidium bromide which shows the products amplified with PCR-1. 1: *B. abortus* RB51 (EUA). 2: *B. abortus* RB51 (Pronabive). 3: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). 4: Molecular weight marker 100 pb ADN Ladder. 5: *B. abortus* 2308. 6: *B. abortus* 544. 7: *B. abortus* S19 (Brovel). 8: *B. abortus* S19 (Pronabive). 9: Negative control (water). Arrows indicate the characteristic 1298-bp product amplified from vaccine strain RB51 of *B. abortus* and the 456-bp product amplified from other strains.

Likewise, it is worth mentioning that even though S19 is a vaccine strain, it is a live attenuated strain, and it is able to cause disease. In fact, there are reports of infection in humans caused by *B. abortus* strain S19.¹⁸

B. abortus RB51 as vaccine strain was officially approved in 1997, then the production of vaccines based on the S19 strain was stopped in Mexico; despite of the fact that this strain is still in force in the NOM-041-ZOO-1995 in Mexico. Nevertheless, the field strains used in this work were isolated at the end of year 2000.

Previous studies have demonstrated that vaccine strain S19 can be excreted with low frequency in the milk of vaccinated cows. The most important fact

vacunales en once aislamientos de campo de *B. abortus* biotipo 1 procedentes de leche de vacas.

Al utilizar la PCR-1 se observó que las once cepas de campo amplificaron un producto de 456 pb, con lo cual se descartó la presencia de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus*.

Para el caso de la PCR-2, nueve de las cepas de campo amplificaron un producto de 1063 pb; sin embargo, dos cepas amplificaron un producto de 361 pb, lo que reveló la presencia de dos cepas vacunales S19 de *B. abortus* dentro de las 11 cepas de campo.

Este hecho es de importancia tanto a nivel epidemiológico como oficialmente, debido a las implicaciones directas e indirectas que tiene en relación con la

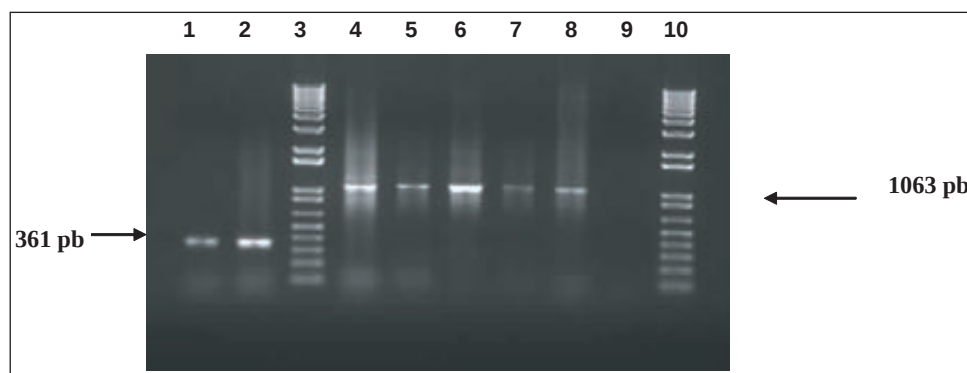


Figura 2: Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio en el que se separan los productos amplificados con la PCR-2. 1: *B. abortus* S19 (Brovel). 2: *B. abortus* S19 (Pronabive). 3: Marcador de peso molecular 1 kb ADN Ladder. 4: *B. abortus* 2308. 5: *B. abortus* 544. 6: *B. abortus* RB51 (EU). 7: *B. abortus* RB51 (Pronabive). 8: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). 9: Testigo negativo (agua). 10: Marcador de peso molecular 1 kb ADN Ladder. Las flechas señalan el producto de 361 pb característico de la cepa S19 de *B. abortus* y el producto de 1063 pb amplificado a partir de cepas diferentes a ésta

Figure 2: 1% Agarose gel in TAE stained with ethidium bromide which shows the products amplified with PCR-2. 1: *B. abortus* S19 (Brovel). 2: *B. abortus* S19 (Pronabive). 3: Molecular weight marker 1 kb ADN Ladder. 4: *B. abortus* 2308. 5: *B. abortus* 544. 6: *B. abortus* RB51 (EU). 7: *B. abortus* RB51 (Pronabive). 8: *B. abortus* RB51 (Schering Plough). 9: Negative control (water). 10: Molecular weight marker 1 kb ADN Ladder. Arrows indicate the characteristic 361-bp product amplified from strain S19 of *B. abortus* and the 1063-bp amplified from other strains.

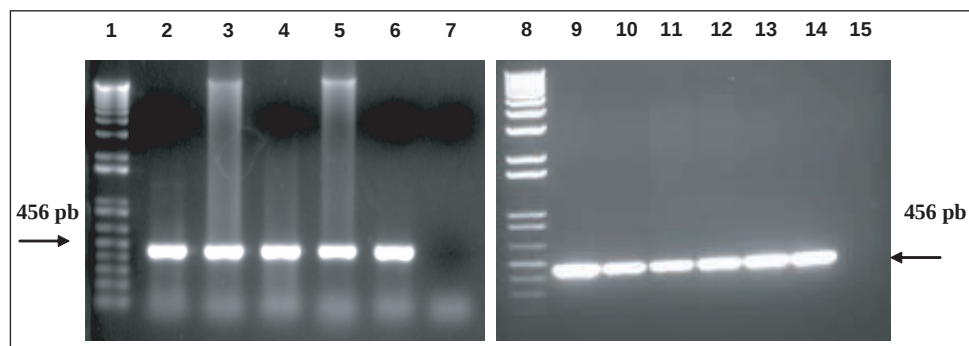


Figura 3 a y b: Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio en el que se separan los productos amplificados con la PCR-1 a partir de las cepas de campo. 1: Marcador de peso molecular 1 kb ADN Ladder. 2: *B. abortus* 325. 3: *B. abortus* 596. 4: *B. abortus* 657. 5: *B. abortus* 708. 6: *B. abortus* 720. 7: Testigo negativo (agua). 8: Marcador de peso molecular 1 kb ADN Ladder. 9: *B. abortus* 136. 10: *B. abortus* 187. 11: *B. abortus* 259. 12: *B. abortus* 499. 13: *B. abortus* 615. 14: *B. abortus* 700. 15: Testigo negativo (agua). Las flechas señalan el producto de 456 pb característico de aquellas cepas diferentes a *B. abortus* RB51

Figure 3 a and b: 1% Agarose gel in TAE stained with ethidium bromide which shows the products amplified with PCR-1 from field strains. 1: Molecular weight marker 1 kb ADN Ladder. 2: *B. abortus* 325. 3: *B. abortus* 596. 4: *B. abortus* 657. 5: *B. abortus* 708. 6: *B. abortus* 720. 7: Negative control (water). 8: Molecular weight marker 1 kb ADN Ladder. 9: *B. abortus* 136. 10: *B. abortus* 187. 11: *B. abortus* 259. 12: *B. abortus* 499. 13: *B. abortus* 615. 14: *B. abortus* 700. 15: Negative control (water). Arrows indicate the characteristic 456-bp product amplified from strains different from *B. abortus* RB51

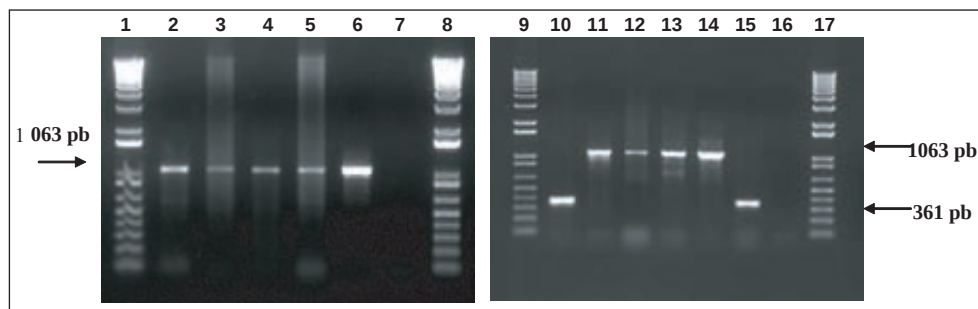


Figura 4 a y b: Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio en el que se separan los productos amplificados con la PCR-2 a partir de las cepas de campo. 1: Marcador de peso molecular 1 kb ADN Ladder. 2: *B. abortus* 325. 3: *B. abortus* 596. 4: *B. abortus* 657. 5: *B. abortus* 708. 6: *B. abortus* 720. 7: Testigo negativo (agua). 8: Marcador de peso molecular 1 kb ADN Ladder. 9: Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder. 10: *B. abortus* 136. 11: *B. abortus* 187. 12: *B. abortus* 259. 13: *B. abortus* 499. 14: *B. abortus* 615. 15: *B. abortus* 700. 16: Testigo negativo (agua). 17: Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder. Con una flecha se señala el producto característico de 361 pb amplificado a partir de la cepa S19 de *B. abortus*

Figure 4 a and b: 1% Agarose gel in TAE stained with ethidium bromide which shows the products amplified with PCR-2 from field strains. 1: Molecular weight marker 1 kb ADN Ladder. 2: *B. abortus* 325. 3: *B. abortus* 596. 4: *B. abortus* 657. 5: *B. abortus* 708. 6: *B. abortus* 720. 7: Negative control (water). 8: Molecular weight marker 1 kb ADN Ladder. 9: Molecular weight marker 1 kb DNA Ladder. 10: *B. abortus* 136. 11: *B. abortus* 187. 12: *B. abortus* 259. 13: *B. abortus* 499. 14: *B. abortus* 615. 15: *B. abortus* 700. 16: Negative control (water). 17: Molecular weight marker 1 kb DNA Ladder. One arrow indicates the characteristic 361-bp product amplified from strain S19 of *B. abortus*

is that the excretion of strain S19 could not be for more than a year.^{19,20} For this reason, even if the field isolations used in this work had been isolated from cows vaccinated in 1997, when there might still be vaccine batches available, it would be almost impossible that those cows were excreting bacteria for three years. This fact suggests that vaccination should have been done maximum a year before the isolates were obtained (1999). What remains to be elucidated is the precedence of such vaccines, since the production of vaccine S19 was stopped two years earlier.

Further works will focused on sampling the rest of the herd from where the vaccine isolates were obtained, as well as the nearby farms. Furthermore, the performance of serological tests and bacterial cultures from slaughtered animals will enlighten the source of the *B. abortus* S19 identified in this work.

Acknowledgements

This work was partially supported by research grants IN205701 and IN245802 from PAPIIT-UNAM and CONACYT 45271. Luary C. Martínez Chavarría was supported by a research fellowship from PROBETEL (Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación).

Referencias

1. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997;3:213-221.
2. Cook DR, Noble JW. Isolation of *Brucella suis* from cattle. *Aust Vet J* 1984;61:263-264.
3. Verger JM. *Brucella melitensis* infection in cattle. In: Verger JM, Plommet M, editors. *Brucella melitensis*. Hol-

Campana Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

Una de las principales desventajas de la cepa vacunal S19 de *B. abortus* es el desarrollo de anticuerpos posvacunales que interfieren con la interpretación de las pruebas serológicas,^{16,17} hecho que hizo incompatible el uso de la vacuna con la aplicación simultánea de los procedimientos para el control de la brucelosis. Asimismo, se destaca que aunque se trata de una cepa vacunal, la S19 es una cepa viva atenuada de *B. abortus*, capaz de causar enfermedad, ya que existen informes de la infección en humanos con la cepa S19 de *B. Abortus*.¹⁸

Desde que la cepa RB51 de *B. abortus* se aprobó oficialmente en 1997, las empresas productoras de biológicos veterinarios en México dejaron de elaborar la vacuna a partir de esta cepa, a pesar de que la NOM-041-ZOO-1995 de México, continúa vigente. Sin embargo, las cepas de campo utilizadas en este trabajo procedían de aislamientos de campo realizados a finales de 2000.

Algunos estudios han demostrado que la cepa vacunal S19 puede ser excretada en la leche de las vacas vacunadas, también la baja frecuencia de esta situación. Lo más importante es que cuando la excreción de la cepa vacunal S19 se presenta, lo hace por un tiempo máximo de un año.^{19,20} Por tal motivo, aun cuando las vacas de las que se realizaron los aislamientos analizados en este trabajo hubieran sido vacunadas en 1997, cuando se podrían encontrar todavía lotes de vacunas con la cepa S19, sería casi imposible que estuvieran excretando la bacteria durante tres años. Esto último sugiere que la vacunación debió realizarse como máximo un año antes de que dichos aislamientos fueran obtenidos (1999). Lo que queda

- land: Dordrecht. The Netherlands Martinus Nijhoff Publishers 1985:197-203.
4. Samartino LE, Enright FM. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immun Microbiol* 1993;16:95-101.
 5. Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis* 2003;7:173-186.
 6. Sauret J, Vilissova N. Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract* 2002;15:401-406.
 7. Luna-Martinez JE, Mejia-Teran C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol* 2002;90:19-30.
 8. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. México: Diario Oficial de la Federación. 1996.
 9. Sperry JF, Robertson DC. Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 1975b;124:391-397.
 10. Sangari FJ, Agüero J. Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. *Vaccine* 1994;12:435-438.
 11. Sangari FJ, García-Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994;121:337-342.
 12. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 1991;28:171-188.
 13. Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:760-764.
 14. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. París : Institut National de la Recherche Aronomique 1988.
 15. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8:151-156.

en duda es de dónde provenía la vacuna, si en México se dejó de producir dos años antes.

Futuros trabajos enfocados a muestrear al resto de los animales que integran el hato del que se obtuvieron los aislamientos y las explotaciones cercanas a él, así como la realización de las pruebas serológicas y cultivos bacterianos de los animales que sean sacrificados, podrán ayudar a encontrar el origen de los aislamientos de *B. abortus* S19 identificados en este trabajo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por los proyectos de investigación IN205701 e IN245802 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México y CONACYT 45271. Luary C. Martínez Chavarría fue becada por el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL).

16. Stevens MG, Hennager SG, Olsen SC, Cheville NF. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J Clin Microbiol* 1994;32:1065-1066.
17. Lord VR, Schurig GG, Cherwonogrodzky JW, Marcano MJ, Melendez GE. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am J Vet Res* 1998a;59:1016-1020.
18. Revich S, Walder A, Pivnick H. Human infection by *Brucella abortus* strain 19. *Can J Public Health* 1961;52:285.
19. Nicoletti P, Jones LM, Berman DT. Comparison of the subcutaneous and conjuntival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1978;173:1450-1456.
20. Alton GG, Corner LA, Plackett P. Vaccination of pregnant cows with low doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *Aust Vet J* 1980;56:369-372.