

# Estudio epidemiológico de un hato bovino con prevalencia media de brucelosis, vacunado con las mutantes rugosas de *Brucella abortus* RB51 y *rfbK*

## Epidemiological study in a bovine herd with intermediate prevalence of brucellosis, vaccinated with RB51 and *rfbK* rough mutant strains of *Brucella abortus*

Antonio Cantú\* Efrén Díaz Aparicio\*\* Laura Hernández Andrade\*\*  
Garry L. Adams\*\*\* Francisco Suárez Güemes†

### Abstract

With the objective of analyzing the behavior of two *Brucella abortus* rough vaccines, a brucellosis infected herd in which the prevalence of the disease was 8.7% was worked with. The animals were randomly distributed in three groups: Group vaccinated with RB51 had 392 cows; Group vaccinated with *rfbK* had 237 cows, and non-vaccinated Group had 35 cows. Bacteriological and serological studies were performed in those animals for a period of one year and an experimental longitudinal comparative and prospective epidemiological study was carried out. There were abortions and stillborn calves in the three groups, and *Brucella abortus* biotype 1 was isolated from the milk of two cows in the control group. Using the criteria that animals vaccinated with rough strains, positive to card test, were infected, the rate of monthly incidence for the vaccinated cows with RB51 was 1.65 per each 100. For the cows that were immunized with *rfbK* this value was of 2.7, with a significant difference between groups ( $P < 0.001$ ). If the results are analyzed using the criterion by which, animals that present equal or higher titers to 1:100 remain as reactors, and those that have titers of 1:50 or less present a transitory answer becoming negatives, the rate of monthly incidence for the cows vaccinated with RB51 was of 0.21 per each 100 immunized cows. For the cows that were immunized with *rfbK* this value was of 0.35, not showing a significant difference between groups ( $P > 0.01$ ). It is concluded that in vaccinated herds with intermediate prevalence of brucellosis, the presence of post-vaccinated reactors is due to a secondary type response to contact with *B. abortus* field strains, which does not necessarily indicate infection and can be discerned by using the test of Rivanol; under this criterion, both vaccines confer good protection.

**Key words:** CATTLE, *BRUCELLA ABORTUS*, BRUCELLOSIS, RB51, *rfbK*

### Resumen

Con el objetivo de analizar el comportamiento de dos vacunas rugosas de *Brucella abortus*, se trabajó en un hato bovino con prevalencia de brucelosis de 8.7%; se formaron al azar tres grupos: 392 vacas inmunizadas con RB51, 237 vacunadas con *rfbK* y 35 sin vacunar. Se realizaron estudios serológicos y bacteriológicos durante un año y se aplicó un estudio epidemiológico experimental comparativo longitudinal y prospectivo. En los tres grupos se presentaron abortos y mortinatos, de la leche de dos vacas del grupo testigo se aisló *B. abortus* biotipo 1. Bajo el criterio de que las vacas inmunizadas con cepas rugosas, positivas a la prueba de tarjeta, estaban infectadas, la tasa de incidencia mensual para las vacas vacunadas con RB51 fue de 1.65 por cada 100 vacas inmunizadas. Para las vacas que fueron inmunizadas con *rfbK* este valor fue de 2.7, por lo que se registró una diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.001$ ). Si se analizan los resultados utilizando el criterio de que los animales que presentan títulos iguales o mayores a 1:100 permanecen como reactores, y los que tienen títulos de 1:50 o menores presentan una respuesta transitoria tornándose luego en negativos, la tasa de incidencia mensual para las vacas vacunadas con RB51 fue de 0.21 por cada 100 vacas inmunizadas. Para las vacas que fueron inmunizadas con *rfbK* este valor fue de 0.35, sin diferencia significativa entre grupos ( $P > 0.01$ ). Se concluye que en hatos de mediana prevalencia de brucelosis, la presencia de reactores posvacunales se debe a una respuesta de tipo secundario por contacto con cepas de campo de *B. abortus*, que no necesariamente indica infección y puede

Recibido el 27 de junio de 2006 y aceptado el 15 de enero de 2007.

\*Centro de Investigaciones Región Noroeste, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Aldama, Tamaulipas, México.

\*\*Centro Nacional de Investigaciones Microbiológicas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera México-Toluca, Km 15.5, Cuajimalpa, 05110, México, D. F.

\*\*\*Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Tx, USA.

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

Autor para correspondencia: Francisco Suárez Güemes, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Correo electrónico: fsg@servidor.unam.mx Fax: 5616 2342.

**Palabras clave:** BOVINOS, *BRUCELLA ABORTUS*, BRUCELOSIS, RB51, *rfbK*.

## Introduction

**B**rucellosis is a bacterial zoonosis that affects different animal species and has worldwide distribution.

In Mexico, up until 1998, cattle immunization was carried out with S19 strain of *Brucella abortus* (S19), using successfully the reduced doses in adult cows,<sup>1</sup> inducing in cattle effective protection without causing more than 1% abortions in vaccinated animals. Under experimental conditions, S19 protects 70% of bovines against *B. abortus* virulent strain; under field conditions protection is above 70%.<sup>2,3</sup> This vaccine has a disadvantage, it induces production of antibodies that are then present in serum and milk, thus interfering with diagnosis of the disease, presenting false positive results in routine tests. These antibodies are mainly directed against the lipopolysaccharide O chain (LPS), that is a structural characteristic of smooth strains, among them S19 and field strains.<sup>4</sup> Besides diagnostic problems, S19 has other undesirable characteristics such as its capacity to infect humans and that it causes repetitive infections in some vaccinated animals.<sup>5,6</sup>

In order to find a vaccine that effectively protects against brucellosis, but does not have the inconveniences of S19 strain, rough mutants have been developed and evaluated, since they avoid sero-conversion by having an incomplete O chain. One of these is RB51, obtained from virulent strain 2308, by several passes in culture media with antibiotics; it is highly attenuated and stable *in vivo*.<sup>7,8</sup>

Through mutagenesis by transposition method, a mutant of 2308 strain was developed: *rfbK* that has the same advantages as RB51 over S19 strain.<sup>8</sup>

Mexican Official Standard (NOM-041-ZOO-1995) for the Campaign Against Animal Brucellosis indicates that S19 and RB51 can be used in their normal and reduced doses as vaccines to prevent bovine brucellosis.<sup>9</sup> Use of RB51 has almost completely replaced the use of S19 in the domestic market; the official criteria is that if a cow immunized with RB51 gives positive results to conventional serological tests, it is considered infected.

The objective of this study was the evaluation and analysis of *B. abortus* RB51 and *rfbK* strains' behavior in a bovine herd that had intermediate prevalence of brucellosis, carrying out an epidemiological follow-up study during one year after vaccination.

## Introducción

**L**a brucelosis constituye una zoonosis bacteriana que afecta a diferentes especies animales y presenta amplia distribución mundial.

Hasta antes de 1998 la inmunización del ganado bovino en México se realizaba con la cepa S19 de *Brucella abortus* (S19), usando exitosamente la dosis reducida en vacas adultas,<sup>1</sup> la cual induce protección efectiva al ganado y no ocasiona abortos en más de 1% de los animales vacunados. Bajo condiciones experimentales, la S19 protege a 70% de los bovinos contra el desafío con cepa virulenta de *B. abortus*; bajo condiciones de campo produce protección superior a 70%.<sup>2,3</sup> La desventaja de esta vacuna es que induce presencia de anticuerpos en el suero y en la leche, los cuales interfieren en el diagnóstico, al presentar resultados falsos positivos en las pruebas rutinarias. Estos anticuerpos están principalmente dirigidos contra la cadena O del lipopolisacárido (LPS), que es una estructura característica de las cepas lisas, entre ellas la S19 y las cepas de campo.<sup>4</sup> Además de los problemas de diagnóstico, la S19 presenta otras características indeseables, como su capacidad de infectar a los humanos, y ocasiona infección recurrente en algunos de los animales vacunados.<sup>5,6</sup>

Con la finalidad de encontrar una vacuna que sea efectiva para proteger contra la brucelosis, pero que no tenga los inconvenientes de la S19, se han desarrollado y evaluado mutantes rugosas, que al estar incompleta la cadena O evitan la seroconversión. Una de éstas es la RB51, obtenida a partir de varios pases de la cepa virulenta 2308: en medios de cultivo con antibióticos, es altamente atenuada y estable *in vivo*.<sup>7,8</sup>

A través del método de mutagénesis por transposición, se desarrolló una mutante de la cepa 2308: la *rfbK*, que presenta las mismas ventajas sobre S19 que la RB51.<sup>8</sup>

La Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995) para la campaña contra la brucelosis animal señala que pueden usarse la S19 y la RB51 en sus dosis normal y reducida, como vacunas para prevenir la brucelosis bovina.<sup>9</sup> El uso de la RB51 ha desplazado casi por completo a la S19 del mercado nacional; el criterio oficial es que si una vaca inmunizada con RB51 da resultados positivos a las pruebas serológicas convencionales, se le considerará infectada.

El objetivo de este trabajo fue evaluar y analizar el comportamiento de las vacunas RB51 y *rfbK* de *B. abortus* en un hato bovino con prevalencia media de

## Material and methods

The experiment was carried out in a commercial beef farm, with 880 grazing bovines, located in Aldama, Tamaulipas, Mexico. At the beginning of this study, the herd had 8.7% brucellosis prevalence, unknown amount of abortions and other reproductive problems.

Three experimental groups were formed assigning randomly 679 different breeds and cross-bred reproductive age cows.

*B. abortus* RB51 vaccine was obtained in commercial presentation at reduced doses,\* *rfbK* vaccine was supplied by Doctor G. Adams.\*\* *B. abortus* reference strains used for the bacteriological study were RB51, 544 and 2308; they were seeded into tryptase soy agar (TSA)\*\*\* for 48 h at 37°C .

### Experimental design

A cohort of 679 bovines were evaluated by a prospective longitudinal comparative study, with 365 days follow-up under normal handling conditions, where the only difference was the application of vaccine and elimination of positive animals. Group A: 392 cows immunized subcutaneously with RB51 at a concentration of  $4 \times 10^9$  colony forming units (cfu) contained in 2 mL; Group B: 237 cows vaccinated subcutaneously with *rfbK* at a concentration of  $4 \times 10^9$  cfu, contained in 2 mL; Group C: 35 cows received subcutaneous inoculation of 2 mL sterile physiologic saline solution, this group was smaller since the owner refused to provide more animals.

Blood samples were taken from all animals on vaccination day (day 0) and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 and 360 days after vaccination. Reproductive events were recorded (abortions, stillborns and weak offspring) as observed by cowhands.

### Laboratory tests

To determine which animals were positive, Rivanol and card serological tests were applied.<sup>10</sup> Bacteriology studies were performed on milk and vaginal exudates of cows that aborted or were seropositive. Milk samples were collected in 50 mL sterile containers, centrifuged at 450 *g*, and a sample of the surface of the supernatant (fat) was taken with a sterile swab. Vaginal exudates were collected with swabs; both samples were mirror seeded in TSA and Farell media,<sup>11</sup> incubated at 5% to 10% CO<sub>2</sub> environment, at 37°C at least for ten days, observing daily to detect growth. Suggestive strains were identified and biotyped by conventional methods, such as urease test, H<sub>2</sub>S production determination, oxidase and catalase, CO<sub>2</sub>

brucellosis, mediante un estudio epidemiológico de seguimiento durante un año posterior a la vacunación.

## Material y métodos

El experimento fue realizado en una explotación comercial de ganado productor de carne, de tipo extensivo, con 880 bovinos, situada en Aldama, Tamaulipas, México. Al inicio del trabajo, el hato tenía una prevalencia de brucellosis de 8.7%, presentaba ocurrencia no cuantificada de abortos y problemas de tipo reproductivo.

Se trabajó con 679 vacas en edad reproductiva, de diferentes razas y cruza entre ellas, que fueron divididas al azar, en tres grupos experimentales.

La vacuna RB51 de *B. abortus* fue obtenida en su presentación comercial a dosis reducida,\* la vacuna *rfbK* fue proporcionada por el doctor G. Adams.\*\* Las cepas utilizadas como referencia para el estudio bacteriológico fueron RB51, 544 y 2308 de *B. abortus*, que se inocularon en agar tripticasa soya (TSA)\*\*\* por 48 h a 37°C .

### Diseño experimental

Mediante un estudio experimental comparativo longitudinal prospectivo, se evaluó una cohorte de 679 bovinos con un seguimiento de 365 días bajo condiciones normales de manejo, donde la única diferencia fue la aplicación de la vacuna y la eliminación de los animales positivos. Grupo A: 392 vacas inmunizadas con RB51 a concentración de  $4 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias/(ufc) contenidas en 2 mL por vía subcutánea; Grupo B: 237 vacas vacunadas con *rfbK* a concentración de  $4 \times 10^9$  ufc, contenidas en 2 mL por vía subcutánea; Grupo C: 35 vacas a las que se les aplicaron 2 mL de solución salina fisiológica estéril por vía subcutánea, este grupo fue más reducido que los vacunados debido a que el propietario se rehusó a que se vacunara más ganado.

Todos los animales fueron sangrados el día de la vacunación (día 0) y los días 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 posteriores a la vacunación. Se registraron los eventos reproductivos (abortos, mortinatos y crías débiles) observados por los vaqueros.

### Pruebas de laboratorio

Para la determinación de los animales positivos se

\*Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, México.

\*\*Texas A&M University, College Station, Estados Unidos de América.

\*\*\*Difco Laboratories, Detroit Michigan, Estados Unidos de América.

dependence, agglutination reaction with mono-specific antisera for: *abortus* (A), *melitensis* (M) and rough (R); strains identified as *B. abortus* were subjected to agglutination tests with acriflavine and crystal violet stain to determine if they were rough strains.<sup>10</sup>

### Statistical analysis

A database (dbase) was established with the obtained data, and then passed into dta format to perform statistical frequency analysis, chi square, regression, incidence, incidence rate ratio and relative risk (RR) of the disease, using the Stata 4.0 statistical package.

### Results

Monthly results of both serology tests are shown in figures 1 and 2. Of 392 cows immunized with RB51, 78 were found positive to card test (19.89%) and 33 to Rivanol test (8.41%), of these, 23 (5.86%) had titers between 1:25 and 1:50 and ten cows (2.55%) had titers of 1:100, 1:200 and 1:400.

Of the group of 237 cows vaccinated with *rfbK*, 78 were positive to the card test (32.91%) and 47 to the Rivanol test (19.83%), of these 37 had titers between 1:25 and 1:50, and ten cows (4.21%) had titers of 1:100, 1:200 and 1:400.

The non-vaccinated group with 35 animals had 12 cows positive to the card test (34.28%) and ten of them were positive to Rivanol (28.57%), with titers between 1:50 and 1:400. *B. abortus* was isolated and identified by bacteriology in milk collected 60 days after vaccination from two cows of the control group. Both were identified as biotype 1, smooth morphology, field strain. *Brucella* suggestive strains were not isolated from the other samples. Four cows of the group vaccinated with RB51 aborted and two had stillborns; of the cows immunized with *rfbK* five abortions and four stillborns were reported, and non vaccinated

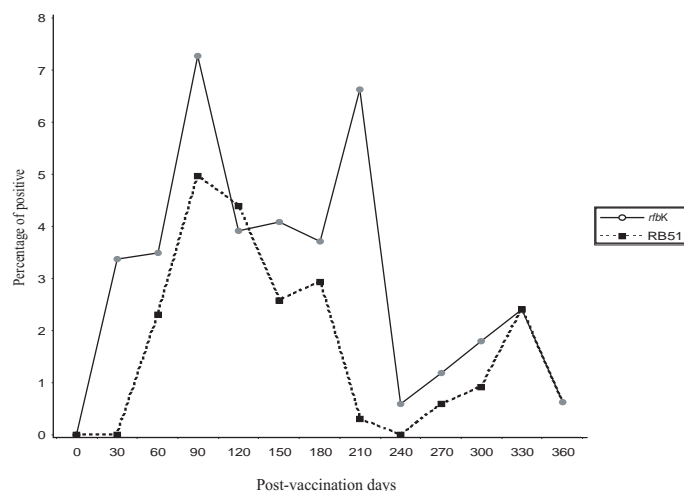
usaron las pruebas serológicas de tarjeta y Rivanol.<sup>10</sup> El estudio bacteriológico se realizó a partir de muestras de leche y exudados vaginales de las vacas seropositivas, o de las que abortaron. Las muestras de leche se recolectaron en recipientes estériles de 50 mL, se centrifugaron a 450 g, y del sobrenadante se tomó una muestra de la superficie (grasa), con hisopo estéril. El exudado vaginal se recolectó con hisopo; ambas muestras se inocularon por duplicado en TSA y medio de Farell,<sup>11</sup> se incubaron en una atmósfera de 5% a 10% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por lo menos diez días, revisando diariamente su crecimiento. Se identificaron las cepas sugerentes y biotipificadas por los métodos convencionales, como prueba de ureasa, determinación de la producción de H<sub>2</sub>S, oxidasa y catalasa; dependencia de CO<sub>2</sub>, reacción aglutinante con antiseros mono-específicos *abortus* (A), *melitensis* (M) y rugoso (R); a las cepas identificadas como *B. abortus* se les realizaron pruebas de aglutinación con acriflavina y tinción con cristal violeta para determinar si eran rugosas.<sup>10</sup>

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se manejaron en una base de datos (dbase) y se pasaron a formato dta para realizar los análisis estadísticos de frecuencias, Ji cuadrada, regresión, incidencia, razón de la tasa de incidencias y riesgo relativo (RR) de la enfermedad, utilizando el paquete estadístico Stata 4.0.

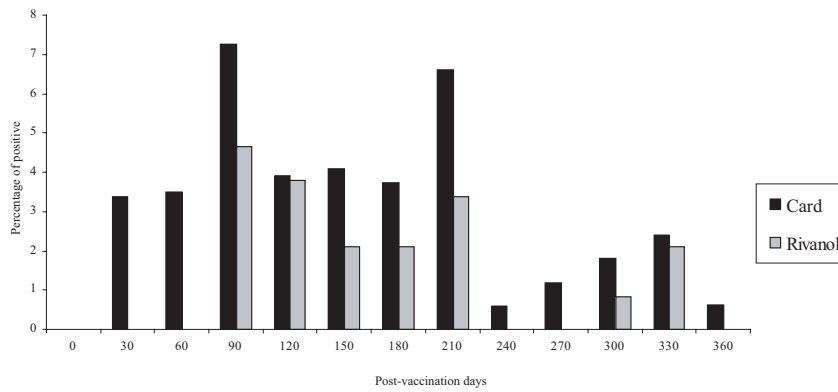
### Resultados

Los resultados mensuales de las dos pruebas serológicas se presentan en las Figuras 1 y 2. De las 392 vacas inmunizadas con RB51, se encontraron 78 positivas a la prueba de tarjeta (19.89%) y 33 a la prueba de Rivanol (8.41%), de las cuales 23 (5.86%) presentaron títulos de 1:25 y de 1:50 y diez vacas (2.55%) manifestaron títulos de 1:100, 1:200 y 1:400.



**Figura 1:** Incidencia mensual de brucelosis, expresado en porcentaje de positivos a la prueba de tarjeta, en dos grupos de vacas inmunizadas con las mutantes rugosas *rfbK* y RB 51 de *Brucella abortus*.

**Figure 1:** Monthly incidence of brucellosis, expressed in percentage of positives to the card test, in two groups of immunized cows with the rough mutants *rfbK* and RB51 of *Brucella abortus*.



**Figura 2:** Porcentaje de reactivos positivos a las pruebas de tarjeta y Rivanol, en 237 vacas vacunadas con *rfbK* de *Brucella abortus*.

**Figure 2:** Percentage of positive reactors to Rivanol and card tests, in 237 cows vaccinated with *rfbK* strain of *Brucella abortus*.

cows had two abortions and two stillborns. *B. abortus* was not isolated from any of these cases.

Two criteria were established to identify positive cows from the results of the epidemiological study. The first one was to consider as positive the ones that reacted to the card test and the second one, only those cows whose Rivanol tests reacted to 1:100 or higher dilutions were considered positive. This last criteria is based on observations that animals that have titer equal to or higher than 1:100 remain as reactors, but not so those with titers of 1:50 or below, whose response is transitory, and later become negative.<sup>22, 26</sup>

Considering the premise that cows immunized with a rough mutant, that were positive to card test, were infected, under these prevalence conditions with the elimination of positive animals, notwithstanding the type of vaccine during the 360 study days, global incidence of the ranch was 24.8 per each 100 cows. Rate of incidence ratio per month was 1.66 per each hundred animals, without taking into consideration the vaccine that was being used. Monthly rate of incidence for cows vaccinated with RB51 was 1.65 per each 100 immunized cows. Cows that were vaccinated with *rfbK* had this value at 2.7, with a significant difference between groups ( $P < 0.001$ ). Incidence behavior throughout the year was similar for both vaccines, with the exception of the sampling performed at 210 days, where animals vaccinated with *rfbK* had an incidence of 6.6 while animals vaccinated with RB51 only 0.30 (Figure 3). Risk ratio results obtained based on the card test for the group vaccinated with RB51 were: RR = 1.50 (95% IC 1.44, 1.55). From these results, it can be inferred that brucellosis infection risk in non-vaccinated animals is 1.50 times greater than when they are vaccinated with RB51. Risk ratio results for cows immunized with *rfbK* were: RR = 0.91 (95% IC. 0.89, 0.92); this demonstrates that the application of this vaccine does not present association in brucellosis protection under the conditions of an intermediate prevalence herd.

Based on the criteria of considering cows positive if their sera were positive to the Rivanol test at

De las 237 vacas del grupo vacunado con *rfbK* se presentaron 78 positivas a la prueba de tarjeta (32.91%) y 47 a la prueba de Rivanol (19.83%), de las cuales 37 tenían títulos de entre 1:25 y 1:50, y diez vacas (4.21%) con títulos de 1:100, 1:200 y 1:400.

El grupo de 35 animales no vacunados presentó 12 vacas positivas a la prueba de tarjeta (34.28%) y diez de ellas también fueron positivas a la prueba de Rivanol (28.57%), con títulos entre 1:50 y 1:400. Del estudio bacteriológico se logró aislar e identificar *B. abortus* de dos vacas del grupo testigo, a partir de la leche recolectada a los 60 días posvacunación, estas dos cepas fueron identificadas como biotipo 1, cepa de campo y con morfología lisa. Del resto de las muestras obtenidas no se aislaron cepas sugerentes a *Brucella*. En las vacas del grupo vacunado con RB51 se presentaron cuatro abortos y dos crías nacidas muertas, de las vacas inmunizadas con *rfbK* se notificaron cinco abortos y cuatro mortinatos, y las vacas no vacunadas manifestaron dos abortos y dos crías nacidas muertas. En ninguno de estos casos se consiguió el aislamiento de *B. abortus*.

Los resultados del estudio epidemiológico para considerar a las vacas inmunizadas como positivas se presentan bajo dos criterios; el primero fue dar como brucelosas a las vacas positivas a la prueba de tarjeta, y el segundo fue que sólo eran positivas las vacas cuyos sueros tuviesen reacciones en la prueba de Rivanol, a diluciones 1:100 o mayores, esto último con base en observaciones, donde los animales que presentan títulos iguales o mayores a 1:100 permanecen como reactivos, no así los que tienen títulos de 1:50 o menores, que presentan respuesta transitoria, tornándose posteriormente en negativos.<sup>22, 26</sup>

Bajo la premisa de que las vacas inmunizadas con una mutante rugosa, positivas a la prueba de tarjeta, estaban infectadas, la incidencia global del rancho bajo estas condiciones de prevalencia y la eliminación de positivos e independientemente del tipo de vacuna, durante los 360 días del estudio fue de 24.8 por cada 100 vacas. La razón de tasas de incidencia mensual fue de 1.66 por cada cien animales, independientemente

1:100 or higher dilutions, global incidence during the 360 study days was 4.48% per each 100 cows. Monthly incidence ratio was 0.37 per each one-hundred animals, independently of the applied vaccine. Monthly incidence rate for cows vaccinated with RB51 was 0.21 per each 100 immunized cows. This value was 0.35 for cows immunized with *r/bK* and did not show significant difference among groups ( $P > 0.01$ ). Risk ratio results obtained based on the card test for the group vaccinated with RB51, were:  $RR = 2.97$  (95% IC 5.4, 0.55), and for cows vaccinated with *r/bK*,  $RR = 1.80$  (95% IC 3.09, 0.52); this shows that vaccination with any of both rough strain vaccines represents a protection factor.

## Discussion

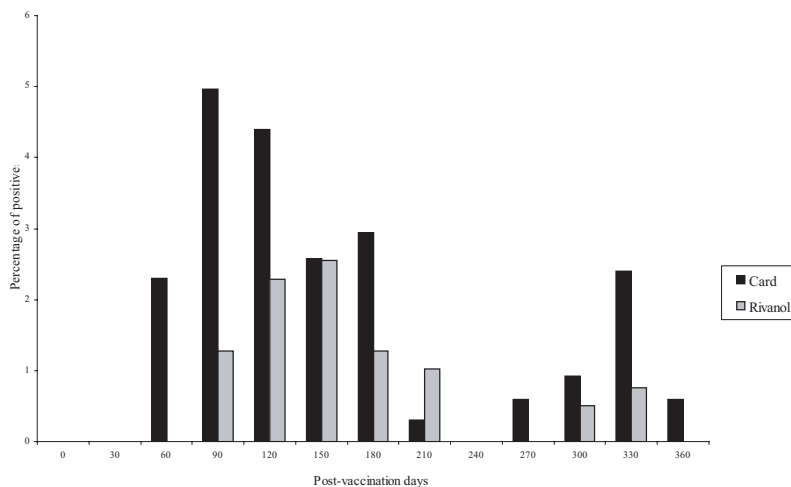
The main advantage of rough mutant strains over S19 is that they have an incomplete O chain causing a lack of post-vaccination responses that may interfere with serological diagnosis. Laboratories that produce this biological and Mexican animal health authorities, based on this property of RB51, have encouraged its introduction and recognition as official vaccine in Mexico displacing S19. Furthermore, there are many studies that support this statement, but it must be considered that they were performed under controlled conditions or in brucellosis free zones.<sup>12-18</sup>

Minimal and few post-vaccination responses have been detected by agglutination tests, although it must be highlighted that they were observed on cows vaccinated with S19 and then revaccinated with RB51.<sup>18</sup> Using more sensitive diagnostic tests such as ELISA and Dot-blot, minimum amounts of antibodies have been found although they have not been agglutinating antibodies.<sup>13,17,19</sup>

This primary type of stimulation induced by S19 would be replaced in brucellosis endemic zones by the constant shedding of field strains that induce recog-

de de la vacuna aplicada. La tasa de incidencia mensual para las vacas vacunadas con RB51 fue de 1.65 por cada 100 vacas inmunizadas. Para las vacas que fueron inmunizadas con *r/bK* este valor fue de 2.7, con una diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.001$ ). El comportamiento que siguió la incidencia de la enfermedad a través del año fue muy similar para las dos vacunas, con excepción del muestreo realizado a los 210 días, en el cual los animales vacunados con *r/bK* presentaron incidencia de 6.6 y los animales vacunados con RB51 sólo de 0.30 (Figura 3). Los resultados de la razón de riesgo obtenidos con base en los resultados de la prueba de tarjeta, fueron para el grupo vacunado con RB51 de:  $RR = 1.50$  (95% IC 1.44, 1.55), de estos resultados se infiere que el riesgo de infectarse contra brucelosis en los animales no vacunados es de 1.50 veces mayor que cuando son vacunados con RB51, y para las vacas inmunizadas con *r/bK*, de  $RR = 0.91$  (95% IC. 0.89, 0.92), lo que demuestra que la aplicación de esta vacuna no presenta asociación en la protección contra la brucelosis bajo las condiciones de un hato con mediana prevalencia.

Partiendo del criterio de considerar positivas a las vacas cuyos sueros presentaban resultado positivo a la prueba de Rivanol en diluciones 1:100 o mayores, la incidencia global durante los 360 días del estudio fue de 4.48% por cada 100 vacas. La razón de incidencia mensual fue de 0.37 por cada cien animales, independientemente de la vacuna aplicada. La tasa de incidencia mensual para las vacas vacunadas con RB51 fue de 0.21 por cada 100 vacas inmunizadas. Para las vacas que fueron inmunizadas con *r/bK* este valor fue de 0.35, que no presentó una diferencia significativa entre grupos ( $P > 0.01$ ). Los resultados de la razón de riesgo obtenidos con base en los resultados de la prueba de tarjeta fueron, para el grupo vacunado con RB51, de  $RR = 2.97$  (95% IC 5.4, 0.55), y para las vacas inmunizadas con *r/bK*, de  $RR = 1.80$  (95% IC 3.09, 0.52), ello demuestra que la vacunación con



**Figura 3:** Porcentaje de reactivos positivos a las pruebas de tarjeta y Rivanol, en 392 vacas vacunadas con RB51 de *Brucella abortus*

**Figure 3:** Percentage of positive reactors to Rivanol and card tests, in 392 cows vaccinated with RB51 strain of *Brucella abortus*

nition of the bacteria by the immune system of animals that come into contact with the shed strains. It has been demonstrated in mice<sup>17</sup> and bovines,<sup>20</sup> that the oral route is appropriate for the production of an immune response.

In a study in Venezuela, under high prevalence conditions, cows were immunized with  $5 \times 10^9$  ufc doses of RB51, and then followed during a year. No reactors were found after vaccination in this zone with 39% prevalence.<sup>21</sup>

Contrasting the foregoing data, in this study, positive results were found to both serological tests during almost all post-vaccination samplings, when using the criteria that cows immunized with rough strains, that have positive results to the card test are infected. Vaccine RB51 with 19.89% positive cows during the year after vaccination was observed to be more efficacious than *rfbK* vaccine that had 32.91% of animals positive to the card test and the non-vaccinated group with 34.28% positive animals. When the official criteria is set aside but conditions in Mexico are taken into account, it is appropriate to consider results under the same parameters that are applied to cows immunized with S19, where positive results to card test and Rivanol at 1:25 and 1:50 titers, are taken as not infected and cows with serological titers of 1:100 to 1:400 are considered infected. Using these parameters, both vaccines adequately protect cows of herds in an intermediate prevalence zone. Cows immunized with RB51 had 2.55% positive cows with titers of 1:100 or higher, cows of the *rfbK* group had 4.21% positives, while the non-vaccinated group had 28.57%, without differences between the vaccinated groups, but there was difference between both vaccinated groups in relation to the control group.

Observations have been made in vaccinated and revaccinated bovines, with RB51 normal and reduced doses, in endemic areas with intermediate or high brucellosis prevalence, finding transitory post-vaccination responses, detected by card test. These responses last two to four months and are negative or have very low titers in the confirmation Rivanol test, which is different from infected cows where that test is positive with high titers.<sup>22,23</sup>

RB51 has this same pattern of behavior in free from brucellosis goat herds where post-vaccination reactors are not detected by routine serological tests; but in brucellosis endemic areas, under intermediate or low prevalence conditions, there are high percentages of reactors, as well as abortions.<sup>24</sup>

The idea that cattlemen and veterinarians have that RB51 vaccinated bovines are infected with brucellosis if they have positive results to routine serological tests, should be shaded by the fact that the presence of a positive response to the card test, in herds located

cualquiera de las dos vacunas rugosas constituye un factor de protección.

## Discusión

La principal ventaja de las mutantes rugosas sobre la S19 es que la carencia de la cadena O les otorga la capacidad de no provocar una respuesta posvacunal, que interfiera en el diagnóstico serológico. Los laboratorios productores del biológico y las autoridades de sanidad animal mexicanas se basaron en esta propiedad de la RB51 para favorecer su introducción y reconocimiento como vacuna oficial en México, desplazando a la S19, y aunque existen bastantes trabajos que sustentan esa aseveración, hay que considerar que fueron realizados bajo situaciones controladas o en zonas libres de brucellosis.<sup>12-18</sup>

Se han encontrado mínimas y puntuales respuestas posvacunales en pruebas de aglutinación, aunque hay que resaltar que fueron observadas en vacas revacunadas con RB51, previamente vacunadas con la S19.<sup>18</sup> Utilizando pruebas diagnósticas más sensibles, como es el caso de ELISA y Dot-blot, se han detectado cantidades mínimas de anticuerpos que no fueron aglutinantes.<sup>13,17,19</sup>

Este tipo de estimulación primaria inducida por la S19 sería reemplazada en las zonas endémicas de brucellosis por la constante eliminación de las cepas de campo, que inducen un conocimiento de la bacteria por el sistema inmune en animales que entran en contacto con las cepas eliminadas; se sabe que la vía oral es adecuada para que se produzca una respuesta inmune, como está demostrado en ratones<sup>17</sup> y en bovinos.<sup>20</sup>

En la evaluación de vacas inmunizadas con RB51, bajo condiciones de elevada prevalencia, existen resultados de un trabajo en Venezuela donde se determinó durante un año, la presencia de reactores en un hato bovino vacunado con dosis de  $5 \times 10^9$  ufc, que estaba localizado en una zona con 39% de prevalencia, en el que no se presentaron reactores posvacunación.<sup>21</sup>

En contraste con estos datos, en este trabajo se encontraron resultados positivos a las dos pruebas serológicas durante casi todos los muestreos posvacunales, al usar el criterio de que las vacas inmunizadas con cepas rugosas que presentan resultados positivos a tarjeta están infectadas, se observa que la vacuna RB51 con 19.89% de vacas positivas durante el año posvacunación, resulta más eficaz que la *rfbK*, que tuvo 32.91% de positivos a la prueba de tarjeta y 34.28% de positivos en el grupo no vacunado. Al dejar de lado el criterio oficial se parte de la idea de que bajo las condiciones de México es adecuado considerar los resultados bajo los mismos parámetros que se aplican para las vacas inmunizadas con S19, donde los resultados

in endemic zones, not always is an indication of an infected animal and the Rivanol test is the method that is recommended to determine if the response is a secondary type or *B. abortus* infection. Results should be considered as if S19, had been applied, and this observation should be included in the Mexican Official Standard (NOM-041-Z00-1995) of the National Campaign for Animal Brucellosis Control.

These results are similar to those found in a prospective study in two dairy herds, with different brucellosis prevalence, revaccinated with RB51; in the herd with 8.8% prevalence, positive animals were eliminated during the study and new cases decreased to 1% after 660 days. In the herd with 15.3% prevalence sero-positive cows were not eliminated, and incidence had increased by the end of the first year as positive animals started to be eliminated and then incidence was reduced to 1% by day 660. Even if there are recurrent post-vaccination reactors, a differential diagnosis should be applied by means of the Rivanol test.<sup>25</sup>

Abortions and stillborns observed in this study cannot be attributed to vaccination, since the isolation of the bacteria was not achieved, and these occurred also in the non-vaccinated group. Furthermore, the fact that vaccination with RB51 does not cause abortion has been corroborated by other authors.<sup>14,15,18,21,22,26</sup> Nevertheless, there have also been reports that mention RB51 as a cause of abortion in cows.<sup>27</sup>

It is concluded that in intermediate brucellosis prevalence herds, the presence of post-vaccination reactors reflects a secondary type response, that not necessarily indicates infection and that it may be confirmed by the use of the Rivanol test. Under these criteria, immunization of cows with any of both rough strain vaccines is a protection factor, although the loss of the alleged advantage of rough mutant strains of not presenting post-vaccination reactors makes the use of S19 vaccine viable again.

## Acknowledgments

This study was partially financed by: National Council of Science and Technology, of Mexico (Conacyt), Project 31642 and ULDP PCE-5063-A-00-2045-00.

## Referencias

1. Flores CR, Fernandez CL, Trejo SJ, Del Rio VJ. Adult cattle vaccination with strain 19 reduced doses for the control of brucellosis a field experience in Mexico. *Int J Zoon* 1985;122:299-303.
2. Nicoletti P. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1981;178:143-145.

positivos a la prueba de tarjeta y de Rivanol con títulos de 1:25 y 1:50, son considerados no infectados, y las vacas con títulos serológicos de 1:100 a 1:400 se consideran infectadas. Utilizando estos parámetros, las dos vacunas protegen adecuadamente a las vacas de un hato en una zona de mediana prevalencia. En las vacas inmunizadas con RB51 hubo 2.55% de positivos con títulos de 1:100 o mayores, en las vacas del grupo de *rfbK* se presentaron 4.21% de positivas, y el grupo no vacunado, 28.57%, sin que hubiera diferencias al aplicar una u otra vacunas, pero sí se encontraron entre las dos vacunas con respecto del grupo testigo.

Se han realizado observaciones en bovinos vacunados y revacunados con dosis normal y reducida con RB51, en áreas endémicas y con mediana o alta prevalencia de brucelosis, y se ha encontrado una respuesta posvacunal transitoria, detectada por la prueba de tarjeta, que dura de dos a cuatro meses y que es negativa o con títulos bajos a la prueba confirmatoria de Rivanol, a diferencia de las vacas infectadas, en las que dicha prueba es positiva y con títulos altos.<sup>22,23</sup>

Este mismo patrón de comportamiento de la RB51 se presenta en las cabras de hatos libres de brucelosis, en los cuales no se presentan reactores posvacunales a las pruebas serológicas rutinarias, pero bajo las condiciones de una prevalencia mediana o baja, en una zona endémica de brucelosis, existen elevados porcentajes de reactores, así como presencia de aborto.<sup>24</sup>

La idea que tienen los ganaderos y los veterinarios respecto de que los bovinos vacunados con RB51, que resultan positivos a las pruebas serológicas rutinarias, están infectados con brucelosis, debe ser matizada y quedar establecido que la presencia de una respuesta positiva a la prueba de tarjeta, en hatos localizados en zonas endémicas, no siempre es indicativo de un animal infectado y que el método recomendado para determinar si se trata de una respuesta de tipo secundario o de una infección por *B. abortus*, es confirmar con la prueba de Rivanol, considerando los resultados de esta prueba como si se hubiese aplicado la S19, e incluir esta observación en la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-Z00-1995) de la Campaña Nacional para el Control de la Brucelosis Animal.

Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio prospectivo en dos hatos bovinos lecheros con diferente prevalencia de brucelosis, revacunados con RB51, en el hato con 8.8% de prevalencia se eliminó a los animales positivos durante el estudio y los nuevos casos decrecieron al 1% después de 660 días. En el hato de 15.3% de prevalencia no se eliminaron vacas seropositivas, incrementándose la incidencia al término del primer año, cuando se empezó a eliminar animales positivos y la incidencia disminuyó a 1% para el día 660; aun cuando haya presencia recurrente de reactores posvacunales, debe realizarse un



3. Nicoletti P. Vaccination against *Brucella*. Adv Biotechnol Processes 1990;13:147-168.
4. Diaz R, Jones LM, Leons D, Wilson JB. Surface antigens of smooth *Brucellae*. J Bacteriol 1968;96:893-903
5. Taylor AW, McDiarmid A. The stability of the avirulent characters of *Brucella abortus*, strain 19 and strain 45/20 in lactating and pregnant cows. Vet Rec 1949;61:317-318.
6. Bustamante SJ, Salazar HFI, Díaz AE, Manzano CC, Pérez GR, Hernández AL. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. Téc Pec Méx 2000;38:35-42.
7. Schurig GG, Roop RM, Bagchi SB, Buhrman D, Sricanganathan N. Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet Microbiol 1991;28:171-188.
8. Moriyon UI, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, Lopez-Goñi I *et al*. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. Vet Res 2004; 35:1-38.
9. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Diario Oficial de la Federación (20 agosto). México (DF): SAGAR, 1996.
10. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris (Francia): Institute National de la Recherche Agronomique, 1988.
11. Farrell ID. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. Res Vet Sci 1974;16:280-286.
12. Cheville NF, Stevens GM, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *B. abortus*. Am J Vet Res 1993;54:1591-1597.
13. Nielsen K, Gall D, Kelly W, Henning MD, Garcia M. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Immunol Immunopathol 1995;46:285-291.
14. Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. Am J Vet Res 1997;58: 472-477.
15. Samartino LE, Fort M, Gregoret R, Schurig GG. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhod vaccination with strain 19 in Argentina. Prev Vet Med 2000;45:193-199
16. Stevens MG, Olsen S. Antibody response to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. Infect Immun 1996;64:1030-1034.
17. Stevens MG, Olsen SC, Palmer MV, Pugh GW. Immune response and resistance to brucellosis in mice vaccinated orally with *Brucella abortus* RB51. Infect Immun, 1996;64:4534-4551.
18. Uzal FA, Samartino L, Schurig GG, Carrasco A, Nielsen K, Cabrera RF *et al*. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. Vet Res Commun 2000;24:143-151.
19. Stevens MG, Hennager DC, Olsen SC, Cheville NF. Serological response in diagnostic test for brucellosis

diagnóstico diferencial mediante la prueba de Rivanol.<sup>25</sup>

Los resultados de este trabajo, referentes a la presencia de abortos y mortinatos no pueden ser atribuidos a la vacunación, ya que no se logró el aislamiento y estos sucesos se presentaron también en el grupo no vacunado, además, el dato de que la vacunación con RB51 no provoca abortos está corroborado por otros autores.<sup>14,15,18,21,22,26</sup> Sin embargo, también existen informes que mencionan a la RB51 como causal de aborto en vacas.<sup>27</sup>

Se concluye que en un hato de mediana prevalencia de brucelosis, la presencia de reactores posvacunales refleja una respuesta de tipo secundario que no necesariamente indica infección y que puede discernirse usando la prueba de Rivanol; bajo este criterio, la inmunización de vacas con cualquiera de las dos vacunas rugosas es un factor de protección, aunque al perderse la ventaja ponderada de las mutantes rugosas de no presentar reactores posvacunación, el uso de la vacuna S19 vuelve a ser viable.

## Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, Proyecto 31642 y ULDP PCE-5063-A-00-2045-00.

- 
- in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or RB51. J Clin Microbiol 1994;32:1065-1066.
  20. Elzer PH, Enright FM, Colby L, Hagius SD, Walker JV, Fatemi MB *et al*. Oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51 protects against infection and abortion induced by virulent challenge. Am J Vet Res 1999;59:1575-1578.
  21. Lord VR, Schurig GG, Cherwonogrodsky 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 1998; 59:1016-1020.
  22. Leal-Hernandez M, Diaz-Aparicio E, Perez R, Hernandez L, Arellano-Reynoso B, Edgar Alfonso *et al*. Protection of *Brucella abortus* RB51 vaccine in cows introduced in a herd with active brucellosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2005; 28: 63-70.
  23. Díaz A E, Arellano RB, Herrera LE, Leal HM, Suárez GF. Estudio de la respuesta serológica post-vacunal atípica a *Brucella abortus* RB51, en zonas endémicas de brucelosis. Memorias del XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 2004 octubre 24-28; Buenos Aires (Argentina). Buenos Aires (Argentina): Asociación Panamericana de Ciencias Veterinarias, 2004:19
  24. Perea VM, Mora PO. Evaluación de vacunas (Rev 1, RB51 y rfbK) en rebaños caprinos con brucelosis (tesis de licenciatura). Cholula (Puebla) México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2000.
  25. Herrera LE. Comportamiento de la vacuna rugosa RB51 (*Brucella abortus*) en hatos bovinos con diferente

- prevalencia de brucelosis (tesis de maestría). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.
26. Zambrano AJ, Villava FM, Schurig GG, Cherwonogrodzky J. Preliminary results for the vaccination of pregnant cattle with *Brucella abortus* strain 19 or *B. abortus* strain RB51 (Special issue). Arch Med Vet 1995; 27: 119-123.
27. Van Metre DC, Kennedy GA, Olsen SC, Hansen GR, Ewalt DR. Brucellosis induced by RB51 vaccine in a pregnant heifer. J Am Vet Med Assoc 1999;215: 1491-1493.