

# Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19

## Serological and bacteriological evaluation of a bovine herd infected with brucellosis and revaccinated with a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19

Abraham Aparicio Bahena<sup>a</sup>, Efrén Díaz Aparicio<sup>b,c</sup>, Laura Hernández Andrade<sup>b</sup>, Rafael Pérez González<sup>a</sup>, Edgar Alfonseca Silva<sup>c</sup>, Francisco Suárez Güemes<sup>c</sup>

### RESUMEN

Se realizó un estudio en bovinos Holstein con brucelosis, donde se revacunó la totalidad de las vacas seronegativas con la dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19, para obtener la especificidad de pruebas utilizadas en el diagnóstico. Se trabajó con 73 hembras adultas, seis de ellas fueron positivas y permanecieron en el establo, pero no fueron revacunadas; 67 se revacunaron con la cepa 19 de *B. abortus* ( $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias). Se obtuvo suero los días 0, 30, 60, 90, 180 y 270 posrevacunación, y se utilizó tarjeta, rivanol, fijación de complemento (FC), inmunodifusión radial (IDR), ELISA indirecto (ELISA-I) y ELISA competitivo (ELISA-C). Para bacteriología, se tomaron muestras de leche sólo el día 0. De las seis vacas positivas en ELISA-C e IDR, se aisló *B. abortus* biotipo 1. En tarjeta, rivanol, ELISA-I y FC, se detectaron más reactores positivos de los 30 a los 270 días posrevacunación; ELISA-C e IDR presentaron bajo número de positivos, que correspondieron a las seis vacas positivas al día 0. La especificidad para ELISA-C e IDR siempre fue del 100 %. A los 270 días, tarjeta, rivanol, FC y ELISA-I dieron 53, 74, 59 y 76 % respectivamente. Se concluye que ELISA-C e IDR son capaces de diferenciar vacunados de infectados; para el serodiagnóstico en animales revacunados es necesario esperar más de 10 meses, ya que a los 9 meses más del 50 % de los animales revacunados seguían siendo positivos a las pruebas oficiales de diagnóstico.

**PALABRAS CLAVE:** Brucelosis, Revacunación, Bovinos, *Brucella abortus* cepa 19.

### ABSTRACT

The specificity and sensitivity of different serological brucellosis diagnostic tests was studied in vaccinated Holstein cattle living within an infected herd. All seronegative animals were revaccinated with a reduced dosage ( $3 \times 10^9$  cfu) *Brucella abortus* strain 19 vaccine. A total of 73 adult female cows were studied. Six were found to be brucellosis-positive and were not revaccinated; the remaining 67 were revaccinated with a reduced dose of strain 19. Serum samples were taken on days 0, 30, 60, 90, 180 and 270 after revaccination. Samples were tested with card test, Rivanol, complement-fixation (CF), radial immunodiffusion (RID), indirect ELISA (ELISA-I) and competitive ELISA (ELISA-C). A bacteriological study was done of milk samples collected only on day 0. *Brucella abortus* biotype 1 was isolated from the six cows found positive with ELISA-C and RID. The highest numbers of seropositive reactions were recorded between days 30 to 270, using the card, Rivanol, CF and ELISA-I tests. ELISA-C and RID tests produced a low number of seropositive reactions, all of which corresponded to the six animals found seropositive on day 0. ELISA-C and RID had 100 % specificity throughout the experiment, and by day 270 the specificity values for the card, Rivanol, CF and ELISA-I tests were 53, 74, 59 and 76 % respectively. It is determined that the ELISA-C and RID tests have the ability to differentiate strain 19 vaccinated and revaccinated animals from field strain infected ones. With the revaccinated animals, a  $10 \pm$  month waiting period is required for the other tests.

**KEY WORDS:** Brucellosis, Revaccination, Bovine, *Brucella abortus* strain 19.

Recibido el 5 de junio de 2002 y aceptado para su publicación el 23 de octubre de 2002.

a Facultad de Estudios superiores Cuautitlán, UNAM.

b Proyecto Brucelosis, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, INIFAP, Km 15.5 Carretera Federal México Toluca, 05110, México, DF. Correspondencia y solicitud de separatas al segundo autor.

c Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

## INTRODUCCIÓN

La vacuna de *Brucella abortus* cepa 19, en su presentación de dosis clásica, se ha elaborado en México desde 1951<sup>(1)</sup>; si bien la Norma Oficial Mexicana (NOM) para el control de brucelosis en los animales domésticos no menciona el uso de la vacuna de *Brucella abortus* RB 51, la SAGAR autorizó su uso a partir de 1997<sup>(2)</sup> y deja abierta la posibilidad de uso de la cepa 19 de *B. abortus* para la vacunación de becerras de 3 a 6 meses de edad con dosis clásica y de vacas con la dosis reducida.

El uso de la dosis clásica en animales adultos no es recomendado, debido a que estos permanecen positivos a las pruebas serológicas; este inconveniente puede ser minimizado utilizando la dosis reducida y empleando pruebas serológicas más específicas, o mediante el uso de pruebas después de los 10 meses de haber vacunado<sup>(3)</sup>. En 1941 fue introducida en Estados Unidos de América la vacunación con cepa 19, la dosis usada fue de  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (ufc); en 1985 se cambió a una concentración de  $3 \times 10^9$  ufc. En México, la dosis reducida de cepa 19 para bovinos es de  $3 \times 10^9$  ufc<sup>(4,5)</sup>.

La vacunación de ganado sexualmente maduro ha ocasionado dudas sobre la posibilidad de infección con cepa vacunal, por provocar títulos de anticuerpos inusuales en suero y leche; los estudios realizados demuestran que un mínimo porcentaje del ganado adulto vacunado, presenta infección en ubres<sup>(6)</sup>.

En los países en desarrollo, donde no existe la posibilidad de pagar indemnizaciones por la eliminación de bovinos reactivos a brucelosis, se presentan con frecuencia hatos lecheros que muestran tasas de prevalencia superiores al 20 %<sup>(7)</sup>. Estos valores aparecen aún cuando se cumplan estrictamente las normas de vacunación tradicional. Lo anterior obliga a buscar métodos alternos, como la revacunación, para la protección del ganado contra una posible infección.

Aunque la revacunación constituye una herramienta poco estudiada, existe un antecedente en la cuenca

## INTRODUCTION

The brucellosis vaccine *Brucella abortus* strain 19, classic dosage, has been manufactured in Mexico since 1951<sup>(1)</sup>. The Official Mexican Regulation (Norma Oficial Mexicana - NOM) for brucellosis control in domestic animals makes no mention of the newer *Brucella abortus* RB 51 vaccine, though the Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural - SAGAR authorized its use in 1997<sup>(2)</sup>. The SAGAR also allows for the possibility of *B. abortus* strain 19 use for vaccination of 3 to 6-month old calves (classic dosage) and adult cows (reduced dosage).

Use of the classic dosage is not recommended in adult animals because they can remain positive to serological tests. Using the reduced dosage, applying more specific serological tests, or testing 10 months after vaccination can minimize this inconvenience<sup>(3)</sup>. Vaccination with strain 19 was introduced in the United States of America in 1941 at a dosage of  $5 \times 10^{10}$  colony-forming units (cfu). In 1985, this concentration was changed to  $3 \times 10^9$  cfu, which is the same reduced dosage used for bovines in Mexico<sup>(4,5)</sup>.

Vaccination of sexually mature cattle raises doubts about the possibility of infection with the vaccinated strain and the causing of unusual antibody titers in the blood and milk. Studies have shown that a low percentage of vaccinated adult cattle develop udder infections<sup>(6)</sup>.

Dairy cattle herds in developing countries frequently have brucellosis prevalence rates higher than 20 % because compensation is not paid for destruction of brucellosis-reactive bovines<sup>(7)</sup>. These rates occur even when traditional vaccination regulations are strictly followed. High rates such as these have lead to a search for alternative methods, like revaccination, for protecting cattle against possible brucellosis infection.

Little research has been done on revaccination as a preventative tool, though antecedents for its use do exist. In 1983, there was an increasing incidence of brucellosis in the dairy region of Tizayuca, Hidalgo, Mexico. In response, a decision was made

lechera de Tizayuca, Hidalgo, México, en 1983, donde la incidencia de la brucelosis se incrementaba, por lo que se tomó la decisión, dentro de un programa integral de control de brucelosis, de revacunar con dosis reducida a las vacas antes de su primer servicio posparto. En ese año, se sacrificaron sólo 67 animales positivos, lo que representó 0.36 % de la población. Para 1987, solamente se presentaron cinco casos de vacas rectoras<sup>(8)</sup>.

La revacunación es aceptada por la NOM para la campaña nacional contra la brucelosis animal, la cual especifica que se podrá realizar solamente una vez, en vacas de un hato en el cual se presenten brotes de la enfermedad, en animales adultos previamente vacunados con dosis clásica<sup>(9)</sup>. Sin embargo, la revacunación presenta ciertas dificultades de carácter diagnóstico, ya que una segunda vacunación implica también un aumento en los títulos de anticuerpos, lo que provoca una baja en la especificidad de las pruebas serológicas rutinarias, al ser incapaces de distinguir animales vacunados de infectados; por lo tanto, se presenta un aumento en el periodo de restricción para realizar el diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio serológico y bacteriológico de un hato bovino con brucelosis, donde se revacunaron las vacas que resultaron seronegativas a las pruebas confirmatorias de inmunodifusión radial (IDR) y ELISA-C, con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19, para obtener la especificidad de diversas pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de la brucelosis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó en un establo lechero de bovinos Holstein, situado en Cuautitlán, Estado de México, con 73 hembras adultas: 35 vacas en producción, 30 vacas secas y 8 vaquillas de reemplazo, que fueron vacunadas con la cepa 19 de *B. abortus* dosis clásica, entre los 3 a 6 meses de edad. Se realizó un estudio serológico previo a la revacunación, utilizando las técnicas de tarjeta, rivanol, fijación de complemento (FC), ELISA-I, ELISA-C e IDR. Como criterio de inclusión al experimento, sólo se revacunaron los bovinos que resultaron negativos a

within the integrated brucellosis control program to revaccinate cows with a reduced dosage before their first postpartum service. During this year only 67 seropositive animals were destroyed, approximately 0.36 % of the population, and in 1987 only five cases of reactive cows occurred<sup>(8)</sup>.

Revaccination is accepted within the NOM for the national campaign against animal brucellosis. It specifies that it can be done only once in cows from a herd with brucellosis outbreaks and in adult animals that have previously been vaccinated with classic dosage<sup>(9)</sup>. Revaccination, however, presents certain diagnostic difficulties because a second vaccination also implies an increase in antibody titers. This leads to a decrease in the specificity of routine serological tests because they are not capable of distinguishing vaccinated from infected animals. The restriction period for proper diagnosis increases as a result. The present research objective was to make a serological and bacteriological study of a brucellosis-infected bovine herd in which cows that were seronegative in the radial immunodiffusion (RID) and competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-C) confirmation tests were revaccinated with a reduced dosage of *Brucella abortus* strain 19 to determine the specificity of different serological tests used in brucellosis diagnosis.

## MATERIALS AND METHODS

The study was done at a dairy farm with Holstein breed bovines, located in Cuautitlán, Estado de México, México. The experimental animals included 73 adult females: 35 producing cows, 30 dry cows, and 8 replacement heifers. All had been vaccinated with *B. abortus* strain 19, classic dosage, between 3 and 6 months of age. Before revaccination a serological study was done using card, Rivanol, complement-fixation (CF), ELISA-C, ELISA-I and RID techniques. Only those animals with negative RID and ELISA-C results were included in the study and revaccinated. To avoid revaccinating presumably infected animals, six of the animals with positive RID and ELISA-C results were excluded from the study. These two tests were used because they have been shown capable of

IDR y ELISA-C; con la finalidad de no revacunar animales que presumiblemente estaban infectados, se excluyeron del experimento seis bovinos que resultaron positivos a IDR y ELISA-C, ya que estas pruebas han demostrado ser confiables para discernir entre anticuerpos vacunales y de infección<sup>(10,11)</sup>. La revacunación en este experimento fue con la cepa 19 de *B. abortus* a dosis reducida de  $3 \times 10^9$  ufc, por vía subcutánea. Se obtuvieron muestras de sueros los días 0, 30, 60, 180 y 270, posrevacunación.

Para el estudio serológico, se realizaron las siguientes pruebas: tarjeta, rivanol, FC, IDR, ELISA-I Y ELISA-C. Las pruebas de tarjeta, rivanol y FC, que son consideradas como pruebas oficiales para el diagnóstico de la brucelosis bovina en México, se realizaron siguiendo las técnicas ya descritas<sup>(12,13,14,15)</sup>. La IDR se llevó a cabo utilizando como antígeno, hapteno nativo obtenido a partir de la cepa 16 M de *B. melitensis*, y para la realización de IDR se siguió la técnica descrita por Díaz y Blasco<sup>(16)</sup>. La prueba de ELISA indirecta se realizó utilizando como antígeno el lipopolisacárido extraído a partir de *B. melitensis* 16 M<sup>(17)</sup>. Para ELISA-C, se utilizaron liposáridos (LPS) de *B. abortus* como antígeno de captura<sup>(18)</sup>. El principio de la prueba es un anticuerpo monoclonal único, el cual compete diferencialmente con los anticuerpos producidos en la respuesta a la vacunación con cepa 19, infección por *B. abortus* de campo u otros factores no específicos para un determinante antigénico específico en el LPS de *B. abortus*; el desarrollo de la técnica se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante (D-Tec Brucella A. Synbiotics, Corporation USA).

Para la realización del estudio bacteriológico, se tomaron por única vez al día 0, muestras de leche de los cuatro cuartos, de las 35 vacas en producción; las muestras fueron centrifugadas para separar la grasa y el sedimento; estos se inocularon con un hisopo en placas de medio selectivo de Farrel, y se incubaron a 37 °C por lo menos 10 días, en condiciones normales y en una atmósfera con 5 a 10 % de CO<sub>2</sub>; las colonias sospechosas se sembraron en medio de agar tripticasa soya y se realizaron las pruebas bacteriológicas respectivas

distinguishing between vaccination and infection antibodies<sup>(10,11)</sup>.

Revaccination was done with *B. abortus* strain 19 at a reduced dosage of  $3 \times 10^9$  cfu, via subcutaneous injection. Blood samples were taken the day of revaccination (day 0), then at 30, 60, 180, and 270 d post-revaccination. These samples were submitted to card, Rivanol, CF, RID, ELISA-I and ELISA-C tests. The card, Rivanol and CF tests are considered the official tests for bovine brucellosis diagnosis in Mexico, and were done following described techniques<sup>(12,13,14,15)</sup>. Using the technique of Díaz and Blasco, the RID test was done using a native hapten recovered from a *B. melitensis* strain 16M as antigen<sup>(16)</sup>. The ELISA-I technique was done using a lipopolysaccharide extracted from *B. melitensis* strain 16M as antigen<sup>(17)</sup>. The ELISA-C was done using *B. abortus* liposaccharides (LPS) as capture antigen<sup>(18)</sup>. Initially, there is a single monoclonal antibody in this test, which then competes differentially with the antibodies produced in response to strain 19 vaccination, field *B. abortus* infection or other unspecified factors for a specific antigenic determinant in the *B. abortus* LPS. The technique was carried out following the manufacturer's specifications (D-Tec Brucella A., Synbiotics Corporation, USA).

For the bacteriological study, milk samples were taken from the four udder chambers of the 35 producing animals. These milk samples were centrifuged to separate the fat and sediment and then inoculated on Farrel selective medium plates using a swab. These were then incubated at 37 °C for at least 10 days in normal conditions and with an atmosphere of from 5 to 10 % CO<sub>2</sub>. Any suspicious colonies were recultured in soy tripticase agar medium and bacteriological tests, such as sulfhydryric acid, urea, triple sugar and iron production, were done to establish the *Brucella* species. *Brucella* biotype was determined via growth trials in tironin, fucsina and safrinine dyes, and the A and M antiserum reaction. The phages Iz, Wb, Tb R/C were used in phagotyping. The penicillin sensitivity test was used to determine if the isolated strains were field strains<sup>(12)</sup>. The



para establecer la especie de *Brucella*, como producción de ácido sulfhídrico, urea, triple azúcar hierro. Para conocer el biotipo de *Brucella*, se realizaron las pruebas de crecimiento en los colorantes tionina, fucsina y safranina; la reacción con antisuero A y M. En la fagotipificación se emplearon los fagos Iz, Wb, Tb R/C, y para confirmar que las cepas aisladas eran cepas de campo se utilizó la prueba de sensibilidad a la penicilina<sup>(12)</sup>. Los valores de especificidad de las pruebas serodiagnósticas se obtuvieron siguiendo la fórmula referida por Thursfield<sup>(19)</sup>.

## RESULTADOS

En el muestreo previo a la revacunación, la presencia de reactores varió según la prueba serológica utilizada (Cuadro 1); todas las vacas positivas a las pruebas de tarjeta, rivanol, FC y ELISA-I, pero negativas a ELISA-C e IDR, tenían menos de 10 meses de vacunadas, por ello se consideraron negativas y se les revacunó.

De las seis vacas que resultaron positivas a todas las pruebas, incluyendo IDR y ELISA-C, se logró aislamiento a partir de leche de *B. abortus* biotipo 1, cepa de campo. Las otras 29 vacas en producción resultaron negativas al estudio bacteriológico.

Al principio del trabajo, y tomando en cuenta los resultados de los estudios bacteriológicos de las 35 vacas en producción, la prevalencia de brucelosis en el hato fue del 17 %; con base en el estudio serológico de los 73 animales del hato (vacas en producción, vacas secas y vaquillas), la prevalencia varió dependiendo de la prueba serológica usada; de 8 % para la IDR y el ELISA-C, a 14 % para rivanol, 15 % para FC y ELISA-I, y de 29 % para la prueba de tarjeta.

En los 67 animales revacunados, las pruebas de tarjeta, rivanol, ELISA-I y FC presentaron mayor cantidad de reactores positivos de los 30 a los 270 días posrevacunación. Por el contrario, las pruebas de ELISA-C e IDR no dieron ningún resultado positivo, excepto los registrados en las vacas positivas a la bacteriología (Cuadro 1). A los 270 días posrevacunación, la prueba de tarjeta presentó

serodiagnostic test specificity values were obtained by following the formula of Thursfield<sup>(19)</sup>.

## RESULTS

The presence of reactors in the samples taken before revaccination varied depending on the serological test utilized (Table 1). All the cows positive in the card, Rivanol, CF and ELISA-I tests, but negative in the RID and ELISA-C tests had been vaccinated less than 10 months before. They were thus considered brucellosis negative and revaccinated.

*Brucella abortus* biotype 1, field strain, was isolated from the milk of all six of the cows positive, even with RID and ELISA-C. The remaining 29 producing cows were negative in the bacteriological study.

The brucellosis prevalence in the herd at the beginning of the study was 17 %, based on the bacteriology study of the 35 producing cows. Based on the serological study of the 73 animals in the herd (producing cows, dry cows and heifers), this

Cuadro 1. Número de vacas rectoras a las diferentes pruebas serológicas, después de la revacunación con dosis reducida de la cepa 19 *Brucella abortus*

Table 1. Number of cows reactive to different serological tests after revaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19

	Days post-revaccination					
	0	30	60	90	180	270
Card test	15	62	57	48	43	20
Rivanol	4	59	45	39	21	10
Complement-fixation	11	59	49	47	26	17
Radial immunodiffusion	0	0	0	0	0	0
Competitive ELISA	0	0	0	0	0	0
Indirect ELISA	10	38	27	22	16	9
Total animals*	67	64	60	52	53	45

\* The quantity of sampled animals varies because some animals had to be sacrificed, for various reasons, after 60 d. Also, these samples do not include pregnant and dry cows.

44 % de reactores positivos, 22 % la prueba de rivanol, 38 % para la FC, 20 % la prueba de ELISA-I, y las pruebas de ELISA-C e IDR no presentaron reactores positivos.

En los resultados de especificidad se puede apreciar que ELISA-C e IDR presentaron un valor del 100 % durante todo el experimento; a los 270 días las pruebas de tarjeta, rivanol, FC y ELISA-I dieron 56, 78, 62 y 80 %, respectivamente (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

La presencia de reactores positivos a las pruebas serológicas en el muestreo previo a la vacunación (día 0), se atribuye a que algunos animales tenían vestigios de la inmunidad que adquirieron en su primera vacunación, estos animales fueron negativos a las pruebas de IDR y ELISA-C; y en otros se aisló la bacteria, correspondiendo a los seis animales que fueron positivos a IDR y ELISA-C.

En un experimento en el que se revacunaron vacas con dosis reducida de cepa 19 ( $4.5 \times 10^8$  ufc) por vía conjuntival, las cuales habían sido vacunadas entre los 3 y 8 meses de edad con dosis clásica de cepa 19, se observó que, a pesar de la alta prevalencia de la enfermedad, no se presentaron casos en los animales revacunados, cosa que no sucedió en los animales no vacunados, ya que algunos de ellos se infectaron<sup>(20)</sup>. En este trabajo sólo los seis animales positivos al aislamiento de *Brucella abortus* no se vacunaron, en el resto de los animales revacunados no se presentaron nuevos casos de la enfermedad, a pesar de que en el hato permanecieron los seis animales positivos, que representaban el 17 % de los animales en producción, y de los que se pudo constatar por medio del estudios bacteriológicos de la leche, que estaban eliminando la bacteria. La prevalencia en este estudio fue superior a la prevalencia en el hato del estudio referido (10 %), siendo similares los resultados, ya que no se encontraron nuevos reactores a la enfermedad después de la revacunación.

En un trabajo donde se vacunaron becerras de 3 a 6 meses con dosis clásica ( $5$  a  $6 \times 10^9$  ufc) de cepa 19, en la cuenca Tizayuca, Hidalgo, México, se

same prevalence varied depending on the serological test: 8 % with RID and ELISA-C; 14 % with Rivanol; 15 % with CF and ELISA-I; and 29 % with the card test.

In the 67 revaccinated animals, the card, Rivanol, ELISA-I and CF tests had a higher number of positive reactors in the samples taken at 30, 60, 180 and 270 d post-revaccination. The ELISA-C and RID tests, in contrast, gave no positive results, except in cows positive in the bacteriology study (Table 1). The samples from 270 d post-revaccination had 44 % positive reactors with the card test, 22 % with Rivanol, 38 % with CF, and 20 % with ELISA-I. There were no positive reactors with the RID and ELISA-C tests.

Specificity results showed that the ELISA-C and RID had a value of 100 % throughout the experiment. After 270 d, the card tests had a value of 56 %, Rivanol 78 %, CF 62 % and ELISA-I 80 % (Table 2).

## DISCUSSION

The presence of positive reactors in the serological tests before revaccination (day 0) is attributed to the fact that some of the animals still had immunity from their first vaccination. All these animals tested

Cuadro 2. Especificidad de las diferentes pruebas serológicas en las vacas revacunadas con dosis reducida de la cepa 19 de *Brucella abortus* (%)

Table 2. Specificity of different serological tests in cows revaccinated with a reduced dosage of *Brucella abortus* strain 19 (%)

	Days					
	0	30	60	90	180	270
Card test	77	3	5	8	9	56
Rivanol	94	8	30	25	60	78
Complement-fixation	75	8	18	10	51	62
Radial immunodiffusion	100	100	100	100	100	100
Competitive ELISA	100	100	100	100	100	100
Indirect ELISA	85	41	55	57	70	80

observó, que la prevalencia aumentó y que el número de vacas seropositivas se incrementaba al igual que el aislamiento de cepas patógenas de *Brucella*, por lo que se decidió revacunar todo el ganado con dosis reducida ( $3 \times 10^9$  ufc) por vía subcutánea, al mismo tiempo que se hicieron más estrictos los controles sanitarios; esta medida repercutió en una dramática disminución en el número de animales desechados por este motivo<sup>(8)</sup>; estos resultados son parecidos a los del presente estudio, ya que antes del programa, se había aislado *B. abortus* en seis animales y al término del trabajo no se presentaron nuevos casos.

La prueba de tarjeta mostró en este trabajo un porcentaje de reactores del 95 % a los 60 días después de la revacunación, lo que difiere del trabajo presentado por Dahoo *et al.*<sup>(21)</sup> quienes notifican 30.6 % de reactores a los 45 días posrevacunación. Esta diferencia se atribuye a que la vía de vacunación en el trabajo referido fue la conjuntival, hecho que induce una menor respuesta de anticuerpos séricos que la vía subcutánea, aunque esto no merma la protección que confiere<sup>(17,21,22)</sup>.

Nicoletti<sup>(23)</sup> menciona que la especificidad de la prueba de FC para el diagnóstico en bovinos no vacunados es buena. En un reporte sobre la eficiencia de la vacunación del ganado adulto en cepa 19, se describe que entre los 7 y 9 meses después de una vacunación con dosis reducida, los títulos de anticuerpo en la prueba de FC descienden de forma significativa<sup>(20)</sup>; sin embargo, en el caso del hato utilizado en el presente trabajo, la prueba de FC obtuvo 45 % de reactores positivos 270 días después de la revacunación. También se menciona la excelente especificidad de las pruebas de tarjeta y FC para la distinción de animales infectados de los vacunados con cepa 19, cuando se practica entre los 3 y 7 meses de edad<sup>(22)</sup>; pero en el caso de la revacunación, las pruebas de tarjeta y FC presentaban un número importante de reactores positivos, los cuales no concordaban con los animales positivos a aislamiento. La FC y la tarjeta son pruebas con alta sensibilidad; sin embargo, al momento de diferenciar los animales vacunados de los infectados, su capacidad es mala, lo que se acrecienta en bovinos revacunados.

negative in the RID and ELISA-C tests, with the exception of the six animals with *B. abortus* in their milk, which had positive tests with RID and ELISA-C.

In an earlier experiment, cows were revaccinated with a strain 19 reduced dosage ( $4.5 \times 10^8$  cfu) via conjunctive administration. The animals had been previously vaccinated with a classic dosage of strain 19 between 3 and 6 months of age. Despite the high brucellosis prevalence, none of the revaccinated animals developed cases, whereas some of the non-revaccinated animals did<sup>(20)</sup>. Similar results were obtained in the present study in that none of the revaccinated animals developed new cases of brucellosis even though the six animals positive for *Brucella abortus* isolation remained in the herd. These six animals, representing 17 % of the producing cows, were not revaccinated and it was proven with bacteriological studies of their milk that they were eliminating the bacteria. The present study had higher prevalence than in the study mentioned above (10 %), but the results were similar, with no new positive reactors after revaccination.

In a study done in Tizayuca, Hidalgo, Mexico, calves from 3 to 6 months of age were vaccinated with a classic dosage ( $5$  a  $6 \times 10^9$  cfu) of strain 19. Brucellosis prevalence was seen to increase, as did the number of seropositive cows and the isolation of pathogenic *Brucella* strains. As a result, it was decided to revaccinate all the cattle with a reduced dosage ( $3 \times 10^9$  cfu) administered subcutaneously while simultaneously tightening sanitary controls. This led to a dramatic decrease in the number of animals destroyed due to brucellosis infection<sup>(8)</sup>. The present study had similar results in that *B. abortus* had been isolated before the program, but no new cases occurred afterwards.

The card test results in the present study show a reactor percentage of 95 % at 60 d post-revaccination. This contrasts with the results of Dahoo *et al.*<sup>(21)</sup>, who report 30.6 % reactors at 45 d post-revaccination. The difference between the two studies is attributed to the vaccination

La prueba de ELISA-I tiene una mayor sensibilidad que la de FC, ya que al desafiar vacas que habían sido vacunadas con cepa 19 entre los 3 y 6 meses de edad, estos animales fueron muestreados posdesafío, y se observó que la respuesta para el ELISA-I fue de mayor duración que para FC<sup>(24)</sup>.

Alonso *et al.*<sup>(25)</sup>, al probar los diferentes tipos de antígenos en la prueba de ELISA-I, como el hapteno nativo y el LPS, no encontraron diferencia significativa entre ellos, ya que ambos fallaban al diferenciar entre los anticuerpos posvacunales y posinfección contra *B. abortus* en sueros de bovinos vacunados con dosis clásica de cepa 19. En este trabajo se utilizó el LPS como antígeno para la prueba de ELISA-I, con resultados similares.

Se ha mencionado que la prueba de rivanol es una buena opción para diferenciar vacas vacunadas con dosis reducida; sin embargo, no se refiere la especificidad que se obtiene en la prueba. Otro trabajo sobre la prueba de rivanol en becerras, notifica una especificidad del 95 % a los 210 días posvacunación con dosis clásica de cepa 19<sup>(20)</sup>. En el caso de la revacunación, la prueba de rivanol fue poco efectiva al diferenciar vacunados, ya que a los 270 días se observó una especificidad del 74 %. Esto se debe a que la respuesta secundaria inducida por la segunda vacunación, provoca la producción de anticuerpos de tipo IgG en grandes cantidades, y en cantidades menores IgM<sup>(12,23)</sup>. Por esta razón, la prueba de rivanol que detecta anticuerpos IgG, similares a los producidos por una infección, puede reaccionar ante los anticuerpos producidos por la revacunación y provocar resultados falsos positivos.

Varios autores que han trabajado con la prueba de IDR con hapteno nativo, han observado una especificidad de por lo menos 80 % en ganado bovino vacunado, tanto con dosis clásica como con dosis reducida de la cepa 19<sup>(10)</sup>. Se ha descrito la capacidad que tiene la IDR para identificar animales positivos después de la vacunación con dosis reducida comparada con otras pruebas como tarjeta, rivanol y FC, al estudiar 23 vacas preñadas que fueron vacunadas con dosis reducida ( $5 \times 10^9$  ufc) y muestreadas periódicamente; los resultados demostraron que la IDR fue la que menos resultados

administración method. In the latter study conjunctive administration was used, which induces a lower seric antibody response than subcutaneous administration, though this does not lessen the protection provided<sup>(17,21,22)</sup>.

Nicoletti<sup>(23)</sup> reports CF test specificity for diagnosis of unvaccinated bovines is good. Reporting on vaccination efficiency of adult cattle with strain 19, Nicoletti describes that from 7 to 9 months after a reduced dosage vaccination the antibody titers detected by the CF test decline significantly<sup>(20)</sup>. This was not the case, however, in the present study, in which the CF test produced 45 % positive reactors at 270 d post-revaccination. Excellent specificity has also been reported for the card and CF tests in distinguishing infected animals from those vaccinated with strain 19, if done from 3 to 7 months of age<sup>(22)</sup>. In the case of revaccination, however, these tests have a significant number of positive reactors that do coincide with those animals found positive via bacteria isolation. The card and CF tests are highly sensitive, but they have a reduced ability to differentiate infected from vaccinated animals, which is exacerbated in revaccinated bovines.

The ELISA-I test is more sensitive than the CF. In a study in which cows vaccinated with strain 19 between 3 and 6 months of age were challenged and sampled after the challenge, it was observed that the duration of ELISA-I was greater than that of CF<sup>(24)</sup>. After testing native hapten and LPS as antigens in the ELISA-I test, Alonso *et al.*<sup>(25)</sup> found that both failed in distinguishing between post-vaccination and post-infection antibodies to *B. abortus* in the serum of bovines vaccinated with the classic dosage of strain 19. In the present study, LPS was used as the antigen in the ELISA-I test, with similar results.

Rivanol has been reported as a good option for differentiating cows vaccinated with a reduced dosage, though no mention is made of this test's specificity. Another study of Rivanol, in calves, reports 95 % specificity at 210 d post-vaccination with a classic dosage of strain 19<sup>(20)</sup>. In revaccination, however, Rivanol is not very effective in



falsos positivos presentó, seguida por la de FC. Las pruebas de tarjeta y la prueba de rivanol fueron las que presentaron mayor número de falsos positivos debidos a la vacunación<sup>(26)</sup>.

Al probar la especificidad de IDR, utilizando 40 becerras vacunadas con cepa 19 a dosis clásica ( $1 \times 10^{10}$  ufc) por vía subcutánea, se observó que, dos meses después de la vacunación, ninguna becerro fue positiva con IDR<sup>(27)</sup>. El hapteno es un epítipo intracelular, por lo que sólo una exposición prolongada de la bacteria al sistema inmune, como ocurre en el caso de una infección, produce anticuerpos contra el hapteno nativo, demostrable en la prueba de IDR; no sucede así cuando se trata de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de la vacunación y la revacunación con cepa 19.

La utilización de una prueba diagnóstica tamiz, como la de la tarjeta, aunada a la IDR, mejoraría enormemente la capacidad de distinguir animales vacunados de infectados, como se observa en este trabajo, ya que la IDR coincidió, en los resultados positivos, con los aislamientos realizados, aunado a que la prueba es sencilla y económica.

Otra prueba que logró diferenciar animales vacunados de infectados con 100 % de especificidad fue ELISA-C. En una investigación<sup>(28)</sup>, en la cual utilizaron 25 bovinos vacunados con dosis reducida ( $3 \times 10^{10}$  ufc) cepa 19 por vía subcutánea, 25 animales infectados con *B. abortus* y 25 animales negativos como testigos, que fueron sangrados mensualmente durante diez meses, los sueros de estos animales fueron evaluados mediante las pruebas de ELISA-I y ELISA-C, utilizándose los antígenos de captura; LPS completo para el ELISA-I y cadena "O" del LPS, de *B. abortus* para ELISA-C. Los resultados demostraron que al momento de diferenciar vacunados de los infectados, la ELISA-I no discernía entre anticuerpos inducidos por la vacunación de aquéllos producidos por cepas de campo, lo que sí logró ELISA-C. Lo anterior se debe a que además de trabajarse con un antígeno más específico como es la cadena O, el inmunoensayo competitivo utilizado tiene como base la presencia de un anticuerpo monoclonal, que

differentiating vaccinated animals, as shown by its 74 % specificity at 270 d post-revaccination. This is a result of the secondary response induced by the revaccination, which causes production of large quantities of IgG antibodies and minor quantities of IgM<sup>(12,23)</sup>. Because of this, the Rivanol test for IgG antibody detection, which is similar to antibodies produced by infection, can react to the revaccination-produced antibodies, leading to false-positive results.

A number of authors using the RID test with native haptens have reported specificity of less than 80 % in vaccinated cattle with either the classic or reduced dosage of strain 19<sup>(10)</sup>. A study has been done of the ability of RID to identify positive animals after vaccination with a reduced dosage as compared to card, Rivanol and CF tests. Twenty-three pregnant cows were vaccinated with a reduced dosage ( $5 \times 10^9$  cfu) and sampled periodically. The results demonstrated that, of the tests, RID had the fewest false positives, followed by CF, and that the card and Rivanol tests had a higher number due to the vaccination<sup>(26)</sup>.

In another study of RID specificity, 40 calves were subcutaneously vaccinated with a classic dosage of strain 19. Two months after vaccination, none of the calves presented positive for brucellosis with RID<sup>(27)</sup>. Hapten is an intracellular epitope and only prolonged exposition of the immune system to the bacteria, as occurs in an infection, produces antibodies against native haptens. This can be shown in the RID test. Temporary exposition to the microorganism, such as in the cases of vaccination and revaccination with strain 19, does not cause antibody production.

Use of a screen diagnostic test, such as the card test, in addition to RID, would greatly improve the ability to distinguish vaccinated from infected animals. This was observed in the present study in that positive RID results coincided with the bacteria isolation results. This test has the added advantage of being simple and low cost.

One test that has 100 % specificity in distinguishing infected from vaccinated animals is ELISA-C. A

compite de manera importante contra los anticuerpos séricos inducidos por la infección en el campo, lo que aumenta la especificidad de la prueba<sup>(18)</sup>. Estos resultados coinciden en el caso de la revacunación, donde para la ELISA-C se obtuvieron buenos resultados, ya que se observó una especificidad de 100 %, resultados que concuerdan con el aislamiento.

Al trabajar con ELISA-C<sup>(29)</sup>, el mismo utilizado en este estudio, con diferentes grupos de sueros de bovinos, un grupo de 30 animales positivos a serología y bacteriología, un grupo de 166 animales vacunados con dosis clásica de cepa 19 con diferentes protocolos de vacunación, otro grupo de 39 animales adultos vacunados dos veces con 10 meses de diferencia con dosis reducida de cepa 19, y un grupo de 14 animales negativos a serología y bacteriología; en los diferentes grupos, se observó que 100 % de los testigos negativos dieron resultados negativos a la prueba y 90.5 % de los testigos positivos resultaron positivos. En los demás grupos, ELISA-C mostró resultados negativos, excepto en el grupo de animales vacunados dos veces de adultos con dosis reducida, ya que en el segundo muestreo se obtuvieron animales positivos y 32 sospechosos, por lo que en animales adultos que han recibido más de una vacunación con dosis reducida, ELISA-C pierde su capacidad de diferenciar animales vacunados de infectados; estos resultados son diferentes a los obtenidos en este trabajo, donde se observó que todos los sueros presentaron resultados negativos en los muestreos, debido a que se conocía con certeza que las vacas sólo habían tenido la vacunación con dosis clásica de cepa 19 y en el trabajo de Alfonseca *et al.*<sup>(11)</sup>, las vacas fueron revacunadas dos o más veces de adultas.

La Norma Oficial Mexicana de la campaña contra la brucelosis animal, indica que para el caso de bovinos vacunados con cepa 19 de *B. abortus* se utilizarán las pruebas de tarjeta, FC y rivanol, siendo tarjeta la prueba tamiz, la FC como prueba confirmatoria y rivanol para diferenciar animales vacunados de infectados, especificando que, para el caso de animales vacunados tanto con dosis clásica como con dosis reducida, las pruebas se

study of the ELISA tests<sup>(28)</sup> used 25 bovines subcutaneously vaccinated with a reduced dosage ( $3 \times 10^{10}$  cfu) of strain 19, 25 animals infected with *B. abortus*, and 25 negative animals as a control. Blood samples were taken monthly for 10 months. The samples were evaluated with the ELISA-I and ELISA-C tests, using the complete LPS capture antigen for ELISA-I, and the "O" chain of *B. abortus* LPS for ELISA-C. The ELISA-I test did not differentiate between the antibodies produced by vaccination and those produced by infection with field strains, but the ELISA-C did. This is because the ELISA-C uses a more specific antigen (O-chain), and because it is based on the presence of a monoclonal antibody, which competes against the seric antibodies induced by the field strain infection. This increases the specificity of the ELISA-C test<sup>(18)</sup>. These results coincide with those from the present revaccination study, which showed good results for ELISA-C, with 100 % specificity and results in agreement with the bacteria isolation.

Another study using ELISA-C, the same as in the present study, involved different bovines grouped into different serum groups. These groups included 30 serologically and bacteriologically positive animals, 166 animals vaccinated with a classic dosage of strain 19 under different vaccination protocols, 39 animals vaccinated twice within 10 months with a reduced dosage of strain 19, and 14 serologically and bacteriologically negative animals. Of the positive and negative control groups, 100 % of the negative control animals produced negative results, and 90.5 % of the positive control animals produced positive results. The ELISA-C test produced negative results in the remaining groups, save in the animals that received two reduced dosage vaccinations when adults. In this group, the second sampling produced seropositive animals and 32 suspicious results, suggesting that ELISA-C loses its ability to differentiate between vaccinated and infected animals when they receive more than one reduced dosage. This contrasts with the results in the present study, in which all the serum samples had negative results, primarily because the cows had only had a classic dosage strain 19 vaccination. Also, in

realizarán 10 meses después de la vacunación<sup>(9)</sup>. Sin embargo en la revacunación del hato del presente estudio, 270 días después se encontraron animales con anticuerpos contra *Brucella*. Con respecto a la prueba de rivanol, que es la oficial para diferenciar animales sanos de infectados, tampoco es confiable de acuerdo a los resultados observados en este trabajo, ya que presenta un número considerable de falsos positivos. Por lo que la IDR y la ELISA-C pueden ser una buena alternativa para diferenciar vacas revacunadas con cepa 19 de *B. abortus*. En México es todavía posible el uso de la cepa 19 para la vacunación contra la brucelosis bovina, por lo que se considera importante tomar en cuenta los resultados del presente estudio. El uso de inmunógenos como la cepa RB 51, no interfieren con el diagnóstico, por lo que los animales que reaccionan a las pruebas serológicas, deben ser considerados como positivos, independientemente de su condición de vacunación<sup>(30,31,32)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Si bien actualmente la vacuna RB51 de *Brucella abortus* ha desplazado a la vacuna cepa 19, es muy recomendable el que se cuente con información como la presentada en este trabajo, ya que esta última ha probado su eficacia en programas de control y erradicación de la brucelosis en bovinos en diferentes partes del mundo, y dado que la nueva vacuna tiene relativamente poco tiempo de haber sido introducida en el país, tendremos que esperar para conocer su efectividad en el control y erradicación de la enfermedad en diversas condiciones y expuesta a desafíos diferentes a donde ha sido utilizada; una vez que se cuenten con estos datos, se podrá decidir si la vacuna RB51 es adecuada para las diferentes condiciones del país o si la vacuna cepa 19 de *Brucella abortus* deberá ser utilizada bajo ciertas circunstancias.

## LITERATURA CITADA

1. Rodríguez HGA. Vacunación contra brucelosis: vacunas cepa 19 y Rev1. En: Luna-Martínez EJ, Suárez-Güemes F editores. III Foro nacional de brucelosis. México. SAGAR- UNAM. 1998:117-134.

Alfonseca *et al.*<sup>(11)</sup>, cows were revaccinated two or more times when adult.

The Official Mexican Regulation of the animal brucellosis campaign indicates that for bovines vaccinated with *B. abortus* strain 19, the card test will be used as a screen, the CF test as a confirmation and Rivanol to differentiate vaccinated from infected animals. It also specifies that for animals vaccinated with both the classic and reduced dosages these tests will be done 10 months after vaccination<sup>(9)</sup>. In the present study, however, animals were found with *Brucella* antibodies up to 270 d post-revaccination. The present study also shows that the Rivanol test, the official test to differentiate between healthy and infected animals, is not trustworthy as it produced a number of false positives. Given this situation, RID and ELISA-C may be a good alternative for differentiating animals revaccinated with *B. abortus* strain 19. Because strain 19 can still be used in Mexico for vaccination against bovine brucellosis, it is important that the present results be taken into account. Use of immunogens such as RB 51 do not interfere with diagnosis and thus animals that react to the serological tests should be considered positive, independently of their vaccination status<sup>(30,31,32)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Though the RB 51 *Brucella abortus* vaccination has replaced the strain 19 vaccination, it is still advisable to have information on the latter, like that in the present study. This is because strain 19 has been proven effective in bovine brucellosis control and eradication programs in different parts of the world, and because RB 51 was introduced into Mexico recently, meaning that data are still scarce on its effectiveness in *Brucella abortus* control and eradication under the different conditions and under exposure to the different challenges where it is used. Once these data are available, it can be decided if RB 51 is appropriate for the different conditions of Mexico, or if *Brucella abortus* strain 19 will still be used under certain circumstances.

2. Norma Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995. Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales. Diario Oficial, 28 de octubre 1997.
3. Flores CR. Brucelosis: prevención y control. En: Gurria-Treviño F, Suárez-Güemes F editores. Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. México 1994:254-260.
4. Borton CE, Lomé JR. Reduced dose whole herd vaccination against brucellosis: review of recent experience. *J Am Vet Med Assoc* 1980;177:118-1220.
5. Flores CR. Control y prevención de brucelosis bovina. Simposio internacional de medicina veterinaria preventiva. Monterrey, Nuevo León, México 1992:23-28.
6. Nicoletti P. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. *J Am Vet Med Ass* 1981;78:143-145.
7. Luna ME. Desarrollo y control de vacunas contra brucelosis (normatividad y control de calidad). En: Memorias de la 5ª reunión anual del Consejo Nacional de Salud Animal. México 1996:268-271.
8. Flores CR, Fernández CL, Trejo SJ, Del Río VJ. Adult cattle vaccination with strain 19 reduced dosis for the control of *brucellosis* a field experience in Mexico. *Int J Zoon* 1985;122:799-303.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 Campaña nacional contra la brucelosis en los animales. Diario Oficial, 20 agosto 1996.
10. Cherwonogrodzky JW, Nielsen KH. *Brucella abortus* 119-3 O-chain polisaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19-vaccinated and field strain infected cattle by agar gel immunodiffusion. *J Clin Microbiol* 1988;26:1120-1123.
11. Alfonseca SE, Díaz AE, Hernández AL, Suárez GF. Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en diferentes grupos de bovinos [resumen]. *Vet Mex* 1995;26(Supl 2):138.
12. Alton GG, Jones LM, Pites DE. Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. 2ª ed. Suiza: FAO y OMS; 1988.
13. Mancera MA. Prueba del antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta. En: Díaz AE, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de brucelosis animal. 1ª ed. México D.F. México: INIFAP-SAGARPA;2001:80-81.
14. Leal HM, Martínez MOL. Prueba de Rivanol. En: Díaz AE, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de brucelosis animal. 1ª ed. México D.F. México: INIFAP-SAGARPA;2001:82-86.
15. Cobos ML, Peña FGP, Romero RC, Velásquez QF, Velásquez SMM, Vicencia MMA, *et al.* Fijación de complemento. En: Díaz AE, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de brucelosis animal. 1ª ed. México D.F. México: INIFAP-SAGARPA;2001:56-79.
16. Díaz R, Blasco JM. Diagnóstico inmunológico, *Bovis*. Luzcan España. 1986;5:55-69.
17. Díaz AE. Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina [tesis doctorado]. Navarra, España: Universidad de Navarra; 1993.
18. Adams LG, Mia AS. Field evaluation of "D-Tec Brucella A", a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of brucellosis in cattle. *Proceed U.S.A.H.A Meet. USA*, 1991;92-112.
19. Thrusfield M. Epidemiología veterinaria. Zaragoza, España: Acribia; 1990.
20. Pinochet VL, Abalos PP, Best BA, López MJ, Vergara LC, Palavicino HI. Protección contra brucelosis en hembras adultas mediante la revacunación con dosis reducida de cepa 19. *Cienc Vet* 1991;6:152-157.
21. Dohoo IR, Wright PF, Ruckerbauer GM, Samagh BS, Robertson FJ, Forbes LB. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can J Vet Res* 1986;485-495.
22. Blasco JM. Profilaxis vacunal de la brucelosis en los rumiantes: Las vacunas tradicionales y las nuevas vacunas. En: Luna-Martínez EJ, Suárez-Güemes F editores. III Foro nacional de brucelosis. Acapulco, Guerrero. México. 1998:205-226.
23. Nicoletti P. A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dairy herds in Florida. *Proceed 80th U.S.A.H.A Meet. USDA*. 1976.
24. Suther SS. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for the detection of specific antibody in cattle vaccinated and challenged with *Brucella abortus*. *J Clin Microbiol* 1985;22:44-47.
25. Alonso UB, Moriyón I, Díaz R, Blasca JM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polisaccharide and smooth lipopolisaccharide. *J Clin Microbiol* 1988;26:1642-1646.
26. Nielsen K, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR, Bondle DR. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am J Vet Res* 1989;50:5-9.
27. Berman DT, Jones LM. Radial immunodiffusion a confirmatory test for bovine brucellosis. *Proceed 83a U.S.A.H.A Meet, Depart Vet Sci, University of Wisconsin-Madison* 1979.
28. Reyes PR. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina [tesis licenciatura]. México, DF, México. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. UNAM; 1996.
29. Suárez GF, Alfonseca Silva E, Díaz AE, Adams LG: Evaluation of a competitive ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico [resumen]. XV Congreso Panamericano en ciencias veterinarias. Campo Grande, Brasil;1996:261.
30. Olsen SC, Bricker B, Palmer MV, Jensen AE. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res Vet Sci* 1999(66):101-105.
31. Samartino LE, Fort M, Gregoret R, Schurig GG. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calving vaccination with strain 19 in Argentina. *Preventive Vet Med* 2000;(4),193-199.
32. Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;44, 223-235.