

Estudio de la eliminación en la leche de la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis* en cabras vacunadas con dosis reducida

Shedding of *Brucella melitensis* Rev 1 strain in the milk of reduced dose-vaccinated goats

Olga Lidia Martínez Martínez^a, René Pérez De la Rosa^a, Efrén Díaz Aparicio^a, Andrew Charles Snyderlaar Hardwicke^b, Laura Hernández Andrade^a, Francisco Suárez Güemes^c

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar si al vacunar cabras en lactación con Rev 1 *Brucella melitensis* a dosis reducida, esta cepa es eliminada en la leche. El Exp 1 se efectuó en un chinchorro caprino localizado en Cuautitlán, Edo. de México, con 60 cabras en lactación sin antecedentes de vacunación contra brucelosis, las cuales se dividieron en dos grupos de 30 animales, uno de ellos sin vacunar, y el otro vacunado por vía subcutánea con Rev 1 de *B. melitensis* a dosis de 1×10^5 ufc/ml; se colectaron muestras de leche de los dos medios de la glándula mamaria diariamente durante el primer mes, y semanalmente en el segundo y tercer mes post-vacunación. El Exp 2 se llevó a cabo en Jaumave, Tamaulipas, se trabajó con 40 hembras en lactación, se dividieron en dos grupos, uno de 30 cabras vacunadas con Rev 1 a dosis de 1×10^5 ufc/ml por vía subcutánea y el otro constó de 10 cabras sin vacunar; de las 40 cabras se tomaron muestras de leche de los dos medios de la glándula mamaria los días 3, 7, 14, 21 y 28 post-vacunación, este muestreo se realizó así debido a las condiciones de explotación. La leche fue centrifugada y el sobrenadante fue inoculado en dos placas, una de agar brucela y otra de medio Farell, que se incubaron a 37 °C durante 10 días. No se consiguió el aislamiento de ninguna colonia sugerente de *Brucella* de la totalidad de las muestras colectadas. En conclusión, la cepa vacunal Rev 1 de *B. melitensis* en la dosis recomendada en México para cabras adultas, no fue eliminada en leche, durante 90 días post-vacunación.

PALABRAS CLAVE: Brucelosis, *Brucella melitensis* Rev 1, Cabras, Leche.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine whether the vaccination of lactating goats with *Brucella melitensis* Rev 1 strain at a reduced dose allows for the shedding of such strain in the milk. Exp 1 was carried out in a small goat farm located in Cuautitlán, State of Mexico, using 60 lactating goats with no brucellosis vaccination history. Goats were divided in two 30-goat groups (i.e.: a non vaccinated control and a *B. melitensis* Rev 1 strain-vaccinated group at a dose rate of 1×10^5 colony forming units (CFU's)/ml. Milk samples were collected daily during the first month, and then weekly during the second and third months postvaccination. Exp 2 was performed in Jaumave, State of Tamaulipas, Mexico, using 40 lactating goats that were divided in two groups. One 30-goat group was vaccinated with *B. melitensis* Rev 1 strain at the dose rate of 1×10^5 CFU's/ml subcutaneously. The remaining 10 goats were used as non vaccinated controls. Milk samples were collected from all 40 goats on d 3, 7, 14, 21, and 28 post-vaccination. Sampling was performed this way because of farming conditions. Milk was centrifuged and the supernatant was inoculated in two plates (one *Brucella* Agar plate and one Farell's Medium plate). Plates were incubated at 37 °C for 10 d. No isolates of colonies suggesting *Brucella* were obtained from any of all samples. In conclusion, *B. melitensis* Rev 1 strain was not isolated from adult goat milk throughout 90 d after vaccination with the dose rate recommended for Mexico.

KEY WORDS: Brucellosis, *Brucella melitensis* Rev 1, Goats, Milk.

Recibido el 29 de octubre de 2004 y aceptado para su publicación el 22 de abril de 2005.

^a CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 15.5 carretera federal México-Toluca, 05110 Palo alto, Delegación Cuajimalpa, Distrito Federal. Tel. 55703100 ext 44, efredia@yahoo.com. Correspondencia al 3er autor.

^b Departamento de Virología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas.

^c Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

En México la brucelosis humana es producida principalmente por *Brucella melitensis*, siendo la vía digestiva la forma de infección más importante, debido a que en nuestro país, los hábitos alimenticios incluyen el consumo de leche sin pasteurizar, así como la costumbre de preparar y comercializar productos lácteos sin control sanitario⁽¹⁾.

Se ha reportado que existe un mayor riesgo de adquirir la brucelosis cuando la leche está contaminada con *B. melitensis* y *Brucella suis* que con *Brucella abortus*; esta última es destruida más rápidamente por el jugo gástrico, además de ser muy lábil al ácido láctico de la leche⁽²⁾.

La vacunación con la cepa Rev 1 por vía subcutánea en dosis clásica de 1×10^9 unidades formadoras de colonias (ufc), está contraindicada en cabras preñadas, ya que puede producir el aborto, debido a ello se utiliza la Rev 1 a dosis reducida de 1×10^5 ufc^(3,4); al usar la vacuna en esta dosis las cabras adultas resultan negativas a las diferentes pruebas serológicas de tres a siete meses después de la inmunización^(5,6).

El objetivo del presente trabajo fue determinar por medio de un estudio bacteriológico, si la vacuna Rev 1 de *B. melitensis* en dosis reducida es eliminada por cabras lactantes.

Se realizaron dos experimentos independientes en chinchorros caprinos sin antecedentes de vacunación contra brucelosis. Previo a la vacunación se colectaron muestras de suero para determinar la prevalencia de brucelosis, por medio de la prueba de tarjeta con antígeno al 3% de concentración celular⁽⁷⁾.

Experimento 1

El estudio se realizó en una explotación caprina de tipo semi-extensivo, localizada en Cuautitlán, Estado de México, con 110 animales de raza criolla, dedicado a la producción de leche para la fabricación de dulces. Del total de 110 caprinos, se seleccionaron 60 cabras en lactación, que fueron divididas en dos grupos de 30 animales cada uno, un grupo fue vacunado por vía subcutánea con Rev 1 de *B. melitensis* a dosis de 1×10^5 ufc/ml

In Mexico, human brucellosis is caused mainly by *Brucella melitensis*. The digestive route is the most important route of infection, since in this country the habit prevails of drinking non-pasteurized milk, together with the preparation and sale of milk products under no sanitary control⁽¹⁾.

A higher risk of acquiring Brucellosis exists when milk is contaminated with *B. melitensis* and *B. suis* than with *B. abortus*, in accordance with the literature. *B. abortus* is destroyed faster by the gastric fluid. In addition, this particular species are highly prone to destruction by milk's lactic acid⁽²⁾.

Subcutaneous vaccination with *B. melitensis* Rev 1 strain at the classic dose rate of 1×10^9 colony-forming units (CFU's) is contraindicated in pregnant goats because of the risk of abortion. For this reason, the reduced dose of 1×10^5 CFU's Rev 1 is used^(3,4). When the vaccine was given at this dose rate, adult goats resulted negative to different serological tests from 3 to 6 mo after vaccination^(5,6).

The purpose of this research was to determine –by a bacteriological study– whether the *B. melitensis* Rev 1 vaccine strain at the reduced dose is shed by vaccinated lactating goats.

Two independent experiments in small goat farms with no history of brucellosis vaccination were performed. Prior to vaccination, serum samples were collected in order to determine the prevalence of brucellosis, using the card test with a 3% antigen cell concentration⁽⁷⁾.

Experiment 1

The study was carried out in a semi-extensive 110 Creole-goat farm located in Cuautitlán, State of Mexico. Milk from this farm is used for candy manufacturing. Sixty (60) lactating goats were selected, they were divided in two 30-animal groups. One group was vaccinated subcutaneously with *B. melitensis* Rev 1 strain at the dose rate of 1×10^5 CFU's/ml (*Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, PRONABIVE*, Mexico's Government Veterinary Biologic-Producing Plant, Mexico City). The second group was left as a non vaccinated

(Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, México D.F) y el segundo grupo fue el control no vacunado. De las 60 cabras, se colectaron muestras de leche de los dos medios de la glándula mamaria, diariamente durante el primer mes post-vacunación, para el segundo y tercer mes se tomaron muestras semanalmente.

Experimento 2

La explotación caprina tenía 216 animales de raza criolla, estaba ubicado en Jaumave, Tamaulipas, con un sistema de pastoreo extensivo. Las principales actividades eran la venta de cabritos, producción de leche y de queso. De estos 216 caprinos, un total de 40 cabras en lactación fueron divididas en dos grupos: 30 animales vacunados con la cepa Rev 1 de *B. melitensis* (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, México D.F) a dosis de 1×10^5 ufc/ml por vía subcutánea y un grupo de 10 cabras sin vacunar. Se colectaron muestras de leche de ambos medios de la glándula mamaria, durante los días 3, 7, 14, 21 y 28 post-vacunación.

La diferencia entre los días de toma de muestras entre ambos experimentos, se debió a que el caprinocultor del Exp 2 considerando que sus cabras salían a pastorear, determinó que un muestreo diario causaría una baja de producción en sus animales, por lo que no fue posible unificar los días de muestreo.

Las muestras de leche se centrifugaron, de la nata se realizó la inoculación con un hisopo estéril en una placa de agar brucela y una de medio Farrell por cada muestra de leche, incubándolas a 37 °C por lo menos durante siete días, revisando las placas diariamente, con el fin de seleccionar las colonias sospechosas⁽⁸⁾.

Los sueros que se obtuvieron en los muestreos iniciales de los dos chinchorros, al ser analizados con la prueba de tarjeta a una concentración celular del 3%, resultaron todos negativos. Los resultados del estudio bacteriológico de las muestras de leche de cabras, en los dos experimentos fueron negativos al aislamiento de *Brucella*. El total de muestras de leche, a las que se les realizó el estudio bacteriológico

control. Milk samples were collected from the two mammary halves of all 60 goats daily during the first month, and then weekly during the second and third months post-vaccination.

Experiment 2

This experiment was carried out in a farm with 216 Creole goats located in Jaumave, Tamaulipas, Mexico, under an extensive grazing system. Farm's main objectives are the sell of kids, and the production of both milk and cheese. A total of 40 lactating goats were taken for this experiment. Goats were divided in two groups, i.e. 30 goats were vaccinated with *B. melitensis* Rev 1 strain (PRONAVBIVE) at the dose rate of 1×10^5 CFU/s/ml subcutaneously. One group of 10 goats was kept as a non vaccinated control. Milk samples were collected from both mammary halves on d 3, 7, 14, 21, and 28 post-vaccination.

The difference in sampling days between both experiments was due to the fact that owner of the second farm considered that the daily sampling could result in decreased milk production. Therefore, sampling dates between both experiments could not be matched.

Each individual milk sample was centrifuged. Supernatant was inoculated on one Brucella Agar plate and one Farrell's Medium, using a sterile swab. Plates were incubated at 37 °C for at least 7 d. Plates were checked daily for suspicious colonies⁽⁸⁾.

All sera from the initial sampling in both farms resulted negative to the card test at a 3 % cell concentration. Results of the bacteriological study of goat milk samples from the two experiments were all negative to Brucella isolation. The total amounts of milk samples that were bacteriologically analyzed were 4,560 and 480 for Exp 1 and 2, respectively.

There are reports⁽⁹⁻¹³⁾ showing that *B. melitensis* Rev 1 strain is the best option for the protection of goats against Brucellosis. Using a reduced dose rate decreases the presence of vaccine-associated undesirable events, such as post-vaccine reactors

fueron: para el Exp 1 de 4,560 y para el Exp 2 de 480 muestras.

Existen estudios (9-13) que demuestran que la cepa Rev 1 de *B. melitensis*, es la mejor opción para proteger a las cabras contra la brucelosis, el uso de la dosis reducida disminuye la presencia de situaciones indeseables atribuidas a la vacuna, como es la presencia de reactores post-vacunales a las pruebas convencionales⁽⁵⁾, la presencia de abortos^(3,4), la eliminación en leche; además se ha establecido que el empleo de la Rev 1 a dosis reducida protege cabras vacunadas en una zona endémica de brucelosis, aún cinco años después de la inmunización⁽¹⁴⁾.

El que no se consiguieran aislamientos de Rev 1 en leche, en muestreos que abarcaron tres meses post-vacunación, sugiere que esta vacuna a dosis reducida no es eliminada en la leche de cabras. Sin embargo, otra investigación menciona que en cabras vacunadas con Rev 1 con dosis normal, se presenta la excreción de la cepa vacunal hasta por 14 semanas post-vacunación, y que algunas cabras la eliminaron hasta por dos lactaciones⁽¹⁵⁾. Una explicación para esta diferencia, es que en el presente trabajo la vacunación se efectuó con una dosis de 1×10^5 ufc, y en el estudio de Alton y Elberg⁽¹⁵⁾ se realizó con una dosis de 1×10^9 ufc, esta diferencia de 50,000 a 1,000,000 de ufc, parece favorecer la eliminación de la cepa Rev 1 en la leche.

Pero existe evidencia de que vacunando con Rev 1 a una dosis de 10^5 ufc, en 16 cabras gestantes, lograron el aislamiento en la leche de un solo animal de la cepa vacunal durante el primer mes posterior al parto⁽¹⁶⁾. Estos resultados indican la posibilidad de que aún vacunando con dosis reducida, se elimine la cepa vacunal en la leche, aunque en el trabajo no se precisa el número de unidades que se aplicaron a la dilución 10^5 , y sólo se aisló de una de las 16 cabras vacunadas. Los resultados bacteriológicos que se obtuvieron en este experimento concuerdan con lo realizado por Mancera *et al.*⁽⁶⁾ quienes lograron el aislamiento de la cepa vacunal Rev 1 en leche y órganos de cabras vacunadas con dosis reducida.

Soberón *et al.*⁽¹⁷⁾ estudiaron si posteriormente a la vacunación de cabras en lactación con mutantes

to conventional tests⁽⁵⁾, abortion^(3,4), and milk shedding. In addition, it has been established that the use of *B. melitensis* Rev 1 strain at a reduced dose protects goats within a Brucellosis-endemic zone, even after 5 yr from vaccination⁽¹⁴⁾.

The lack of isolation of *B. melitensis* Rev 1 strain from milk samples obtained throughout 3 mo after vaccination, suggests that this reduced dose vaccine is not shed in the milk of goats. Nevertheless, one other research mentions the shedding of *B. melitensis* Rev 1 vaccine strain in the milk of goats vaccinated with a regular dose rate, for up to 14 wk post-vaccination, and that even some goats shed the vaccine strain for up to two lactations⁽¹⁵⁾. One explanation for this difference is that in our research vaccination was performed using 1×10^5 CFU's, while Alton and Elberg⁽¹⁵⁾ used 1×10^9 CFU's. This difference between 50,000 and 1,000,000 CFU's, seems to promote the shedding of *B. melitensis* Rev 1 strain in the milk.

Evidence has been published elsewhere that when 16 pregnant goats were vaccinated with *B. melitensis* Rev 1 strain at the dose rate of 10^5 CFU's, the vaccine strain was isolated from the milk of only one animal during the first month after parturition⁽¹⁶⁾. These results show the possibility that even after using the reduced dose rate; the vaccine strain can be spread in the milk, even though the report does not mention the precise number of CFU's applied in the 10^5 dilution. In addition, the vaccine strain was only isolated from one of the 16 vaccinates.

The bacteriological results from such experiment agree with Mancera *et al.*⁽⁶⁾ who isolated *B. melitensis* Rev 1 vaccine strain from both milk and organs of goats vaccinated with a reduced dose.

Soberón *et al.*⁽¹⁷⁾ studied whether after the vaccination of lactating goats with the rough mutants RB51 and *rfbK* of *B. abortus*, allowed for the re-isolation of these strains from the milk. For such purpose, they obtained daily samples throughout the first months, and weekly samples throughout the second and third months postvaccination. No isolation was obtained whatsoever. The similarity of results between these two rough *B. abortus* strains

rugosas RB51 y *rfbK* de *B. abortus*, era posible recobrar estas cepas en la leche; para ello muestrearon diariamente durante el primer mes y semanalmente durante el segundo y tercer mes post-vacunación, no consiguiendo aislamiento alguno. La similitud de los resultados entre estas dos cepas rugosas de *B. abortus* y la cepa lisa Rev 1 de *B. melitensis*, no era esperada, ya que las brucelas lisas tienen una capacidad mayor de evadir o reducir el proceso de digestión por los macrófagos, que las brucelas rugosas⁽¹⁸⁾.

También se ha mencionado que al vacunar borregas durante la lactación con Rev 1 a dosis de 1×10^9 ufc/ml, no se presenta eliminación de la cepa vacunal durante un mes posterior al parto⁽¹⁹⁾. En bovinos de México, se ha reportado el aislamiento de las cepas vacunales en leche de vacas revacunadas con S19⁽²⁰⁾ y con RB51⁽²¹⁾.

En conclusión, la cepa vacunal Rev 1 de *B. melitensis* en la dosis recomendada en México para cabras adultas, no fue eliminada en leche, durante 90 días post-vacunación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Grant B/1539-3 de la International Foundation of Science. Los autores agradecen al Ing. Francisco Velázquez Quezada su contribución para el desarrollo de este trabajo.

LITERATURA CITADA

1. López-Merino A, Migrañas-Ortíz R, Pérez-Miravete A, Magos C, Salvatierra-Izaba B, Tapia-Coyer R, *et al.* Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud Pública Méx* 1992;34(2):230-240.
2. FAO/OMS: Organización Mundial de la Salud. Sexto Informe del Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Ginebra, 1986.
3. Díaz-Aparicio E, Ayala G, Céspedes M, Sánchez U, Rivero L, Prado F. Epidemiological study of caprine brucellosis in Aldama, Chihuahua, Mexico, and implementation of a control program, preliminary results. En: IFS/FAO/IAEA editores. Workshop animal disease diagnostics in Latinamerica. San José. 1990:38-45.

and the smooth Rev 1 *B. melitensis* strain was unexpected, since smooth Brucella have a higher ability to evade or decrease macrophage digestion than rough Brucella⁽¹⁸⁾.

It has also been published that after vaccinating lactating ewes with *B. melitensis* Rev 1 strain at the dose rate of 1×10^9 CFU's/ml, no vaccine strain shedding was observed during the first month after parturition⁽¹⁹⁾. The isolation of vaccine strains from the milk of cows vaccinated with S19⁽²⁰⁾ and RB51⁽²¹⁾ strains has been reported in Mexico.

In conclusion, the *B. melitensis* Rev 1 strain was not shed in the milk of adult goats vaccinated with the dose rate recommended in Mexico throughout 90 d post-vaccination.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financed by International Foundation of Sciences' Grant B/1539-3. The authors express their gratitude to Mr. Francisco Velázquez Quezada for his contribution in the development of this research.

End of english version

-
4. Scharp DW, al Khalaf SA, al Muhanna MW, Cheema RA, Godana W. Use of mass vaccination with a reduced dose of REV 1 vaccine for *Brucella melitensis* control in a population of small ruminants. *Trop Anim Health Prod* 1999;31:135-141.
 5. Díaz AE, Prado AF, Ontiveros CL, Batalla CD. Evaluación serológica de anticuerpos posvacunales en cabras adultas, vacunadas con una dosis reducida (5×10^{-4}) de Rev 1 en una zona enzootica de brucelosis. *Tec Pecu Mex* 1984;(47):157-164.
 6. Mancera A, Díaz-Aparicio E, Vázquez J, Velázquez F, Suárez GF, Flores-Castro R. Vacunación de cabras con la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: Evaluación serológica y desafío. *Vet Méx* 1992;(2):117-123.
 7. Díaz AE, Blasco MJM, Suárez GF. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Vet Méx* 1999;(30):307-311.
 8. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Ed. INRA 1988.
 9. Alton GG. Further studies on the duration of the immunity produced in goats by the Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. *J Comp Pathol* 1968;(78):173-178.

10. Alton GG. Vaccination of goats with reduced doses of Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. Res Vet Sci 1970;(11):54-59.
11. Blasco JM. A review of the use of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. Preventive Vet Med 1997;(31):275-283.
12. Elberg SS, Faunce K. Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a non-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. J Bacteriology 1957;(73):211-217.
13. Elberg SS. Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II 1968-1980. Vet Bull 1981;(51):67-72.
14. Díaz-Aparicio E, Hernández AL, Suárez-Güemes F. Protection against brucellosis in goats, five years after of vaccination with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine in reduce dose. Trop Anim Health Prod 2004;(36):117-121.
15. Alton GG, Elberg SS. Rev 1 vaccine. A review of ten years of study. Vet Bull 1967;(37):793-800.
16. Crowther RW, Orphanides A, Polydorou K. Vaccination of adult shhep with reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev 1. Trop Anim Health Prod 1977;(9):85-91.
17. Soberón MA, Díaz-Aparicio E, Torres-Armenta J, Adams LG, Suárez GF. Absence of shedding of two *B. abortus* strains in goats after vaccination with live vaccines. Vaccine 2000;(18):3018-3020.
18. Adams GL. Development of live *Brucella* vaccines. In: Advances in brucellosis research. 1st ed. College Station, Texas, USA: Texas A & M University Press; 1989:159-176.
19. Entessar F, Ardalan A, Ebadi A, Jones LM. Effect of living Rev 1 vaccine in producing long-term immunity against *Brucella melitensis* infection in sheep in Iran. J Comp Path 1967;(77):367-377.
20. Hitos F, García S, Angulo G. Aislamiento de *Brucella abortus* biotipos 1, 2, 4, 7 y 9 a partir de muestras de leche procedentes de bovinos Holstein adultos revacunados con dosis reducida de la cepa 19 y su relación con la prueba de fijación del complemento. Vet Méx 1983;(14):35-38.
21. Leal HM, Díaz-Aparicio E, Pérez R, Hernández L, Arellano-Reynoso B, Alfonseca E, Suárez-Guemes F. Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced in a herd with active Brucellosis, with presence of atypical humoral response. Comparative Immun Microbiol Infect Dis 2005;(28):63-70.