

Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*

Radial immunodiffusion test with native hapten in the differentiation of cattle with repeated *Brucella abortus* S19 strain revaccinations

Esperanza González Miranda^a, Laura Hernández Andrade^a, Efrén Díaz Aparicio^a

RESUMEN

El objetivo del estudio fue establecer la capacidad de la inmunodifusión radial (IDR) con hapteno nativo, para diferenciar anticuerpos post-vacunales de anticuerpos por infección, en bovinos con revacunaciones repetidas de cepa S19. Se trabajó en un establo del estado de México, con presencia de abortos, retención de placenta, expulsiones y fetos momificados. Las becerras se vacunaban con dosis clásica de cepa S19 de *B. abortus*, y ya adultas revacunaciones anuales repetidas con dosis reducida de la misma vacuna, existiendo vacas que tenían entre dos a seis revacunaciones. Se realizó un muestreo serológico a todas las hembras en edad reproductiva (n=300); con base en los registros se buscaron vacas con problemas reproductivos, resultando de esta selección 90 vacas (30 %). Los sueros se analizaron con las pruebas de tarjeta, rivanol e IDR con hapteno nativo. De las 90 vacas con problemas reproductivos, se colectaron muestras de leche y exudado vaginal, para diagnóstico bacteriológico. De 300 bovinos muestreados se presentaron 157 positivos a tarjeta (52.3 %), 98 a rivanol (32.6 %). De las 90 vacas con problemas reproductivos se presentaron 88 positivos a tarjeta (97.7 %), 67 a rivanol (74.4 %) y 19 a IDR (21.1 %). De las 19 vacas positivas a IDR, 17 de ellas (89.4 %) se consideraron infectadas ya que eran positivas en 1:200 a rivanol y 2 (10 %) resultaron negativas a rivanol. De leche, se aislaron tres cepas de *B. abortus* biotipo 1. Se concluye que la inmunodifusión radial es útil para diferenciar vacas infectadas de aquéllas revacunadas repetidamente con dosis reducida de la cepa S19.

PALABRAS CLAVE: Bovinos, *Brucella abortus*, Inmunodifusión radial, Cepa S19.

ABSTRACT

The purpose of this study was to learn about the ability of radial immunodiffusion (RID) with a native hapten to differentiate vaccine-derived from infection-derived antibodies in cattle with repeated S19 strain revaccinations. The study was carried out in a dairy herd located in the state of Mexico, with experiencing abortions, placental retentions, stillbirths, and mummified fetuses. Heifer calves had been vaccinated at an early age with the classic dose rate of *B. abortus* S19 strain. Later, as adults, they received yearly repeated vaccinations with the reduced dose of the same vaccine. Some cows had received 2-6 revaccinations at the time of the study. Serum samples were obtained from all females (n = 300) at breeding age. Ninety (30 %) cows with reproductive problems were selected using cow records. Serum samples were analyzed using the card, rivanol, and native hapten RID tests. Milk and vaginal exudate samples were collected from these 90 cows with reproductive problems, for bacteriological diagnosis. Out of the 300 cattle sampled, 157 (52.3 %) were positive to the card test, and 98 (32.6 %) were positive to the rivanol test. Out of the 91 cows with reproductive problems, 88 (97.37 %) cows were positive to the card test, 67 (74.4 %) cows were positive to the rivanol test, and 19 (21.1 %) cows were positive to the RID test. Seventeen (17) (89.4 %) out of the 19 RID-positive cows were considered as infected, since they were positive (1:200) to rivanol, while 2 (10 %) resulted negative to the rivanol test. Three biotype 1 *B. abortus* strains were isolated from milk samples. It was concluded that the RID test is useful to discriminate infected cattle from those that have been repeatedly revaccinated with reduced S19 vaccine doses.

KEY WORDS: Cattle, *Brucella abortus*, Radial immunodiffusion test, S19 strain.

Recibido el 29 de octubre de 2004 y aceptado para su publicación el 26 de diciembre de 2005.

^a CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 15.5 Carretera federal México-Toluca, Palo alto, Delegación Cuajimalpa, 05110 México, D.F. Tel: 55703100 ext 44 ó 65. efredia@yahoo.com. Correspondencia al tercer autor.

En los países en desarrollo, donde existen pocas posibilidades 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 %. Estas cifras aparecen aún cuando se cumplan estrictamente las normas de vacunación tradicional⁽¹⁾. Lo anterior obliga a la utilización de métodos alternos como es la revacunación. Este procedimiento ya sea con la cepa S19 o con la cepa RB51, es aceptada por la Norma Oficial Mexicana para la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal, la cual especifica que se podrá realizar solamente una vez en vacas de hatos localizados en zonas endémicas de la enfermedad⁽²⁾. Sin embargo, la revacunación con la cepa S19 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.

La inmunización del ganado bovino en México se realizaba con la cepa S19 de *Brucella abortus* usando exitosamente la dosis reducida en vacas adultas⁽³⁾ hasta 1998. Esta vacuna induce una protección efectiva al ganado, y no ocasiona abortos en más del 1 % de los animales vacunados, en condiciones experimentales protege aproximadamente al 70 % de los bovinos contra el desafío con cepa virulenta de *B. abortus*, y en condiciones de campo produce una protección superior al 70 %^(1,4). La desventaja de esta vacuna, es que induce la presencia de anticuerpos en el suero y en la leche que interfieren en el diagnóstico, presentando resultados falsos positivos en las pruebas rutinarias. Estos anticuerpos son principalmente dirigidos contra la cadena O del lipopolisacárido, que es una estructura característica de las cepas lisas, dentro de las cuales están incluidas la cepa S19 y las cepas de campo⁽⁵⁾. En México actualmente se están utilizando tanto la vacuna S 19 con la RB51 de *B. abortus* para la prevención de la brucelosis en bovinos.

La prueba de inmunodifusión radial (IDR) usando como antígeno el hapteno nativo, presenta 96 % de

Given the limitations that exist in developing countries to indemnify producers culling brucellosis-positive cattle, dairy herds with >80% brucellosis prevalence are frequently found. Such incidence rates typically appear even if traditional vaccination norms are stringently followed⁽¹⁾. This results in the practice of alternative methods such as revaccination. Revaccination –either with S19 or with RB51 strains– is accepted by the Mexican Official Norm (NOM) for the National Animal Brucellosis Campaign. The NOM specifies that revaccination can be practiced only once in herds located in brucellosis-endemic zones⁽²⁾. Nevertheless, S19 revaccination implies certain diagnostic difficulties, since a booster vaccination results in increased antibody titers, thus decreasing the specificity of routine serological tests, rendering them unable to distinguish vaccinated from infected animals. Therefore, the restriction period of time to perform the diagnosis is extended.

Up to 1998, Mexican cattle used to be successfully immunized using the reduced dose of *Brucella abortus* S19 strain in adult cattle⁽³⁾. This vaccine induces effective protection in cattle and does not cause abortion in more than 1 % of the vaccinated. Under experimental conditions, this vaccine protects ~70 % cattle against challenge with a virulent *B. abortus* strain. Under field conditions this protection exceeds 70 %^(1,4). The disadvantage of this vaccine is that it induces the presence of antibodies in both serum and milk, thus interfering with the diagnosis, and resulting in false positives when routine tests are performed. These antibodies mainly aim the lipopolysaccharide O chain, a characteristic structure of smooth strains, including S19 and field strains⁽⁵⁾. Both S19 and RB51 *B. abortus* strains are currently being used in Mexico for the prevention of brucellosis in cattle.

Radial immunodiffusion (RID) test using the native hapten has shown 96 % sensitivity and 80 to 100 % specificity for the differential diagnosis between cattle infected with *B. abortus* and those vaccinated with the S19 strain⁽⁶⁾. The native hapten is an intracellular antigen so that only an extended exposure of the immune system to the *Brucella* organism –i.e. a field infection– results in antibodies

sensibilidad y entre 80 a 100 % de especificidad, para el diagnóstico diferencial de vacas infectadas con *B. abortus* o vacunadas con la cepa S19⁽⁶⁾. El hapteno nativo es un antígeno de tipo intracelular, por lo que solamente una exposición prolongada de la *Brucella* al sistema inmune, como es el caso de una infección de campo, produce anticuerpos contra este antígeno, y no cuando se trate de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de la revacunación con cepa S19.

El objetivo de este estudio fue establecer la capacidad que presenta la prueba de IDR con hapteno nativo, para diferenciar anticuerpos pos-vacunales de los producidos por infección natural, aún en bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19.

El experimento fue realizado en un establo lechero situado en Cuautitlán, Estado de México, con 300 vacas Holstein en edad reproductiva, con antecedentes serológicos de brucelosis y que presentaba problemas reproductivos como presencia de abortos, expulsiones y fetos momificados. Las vacas habían sido vacunadas cuando tenían entre tres a seis meses de edad con la cepa S19 de *B. abortus* (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, México) a dosis clásica (1×10^{10} ufc/ml) y revacunadas cada año con dosis reducida (3×10^8 ufc/ml) de la misma vacuna, existiendo vacas que tenían entre dos a seis revacunaciones.

Se realizó un muestreo serológico a la totalidad de las hembras en edad reproductiva ($n=300$); posteriormente con base en los registros se buscaron vacas con antecedentes de problemas reproductivos, resultando de esta selección 90 vacas (30 %).

Las muestras de suero se analizaron con las pruebas de tarjeta, rivanol⁽⁷⁾ e IDR con hapteno nativo obtenido a partir de la cepa de *B. melitensis* 16 M, el antígeno se utilizó a una concentración de 1 mg/ml en un gel de agarosa preparado en una solución amortiguadora de glicina⁽⁶⁾. Se colocaron 20 ml de cada uno de los sueros problemas en cada uno de los pozos en las placas de gel, se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente, realizando la lectura al día siguiente.

specific to this antigen. This does not occur after a temporary exposure such as a revaccination with the S19 strain.

The purpose of this study was to establish the ability of the RID test with native haptén to distinguish vaccine-derived antibodies from those caused by natural infection in cattle even after repeated S19 strain revaccinations.

The experiment was performed in a dairy located in Cuautitlán, State of Mexico, Mexico, with 300 Holstein cows at breeding age with positive brucellosis serological background, and experiencing reproductive problems such as abortions, stillbirths, and mummified fetuses. Cows had been vaccinated at an early age (3 to 6 mo) using *B. abortus* S-19 strain (Mexico's Government National Veterinary Biologic Manufacturer, *Productora Nacional de Biológicos Veterinarios*, PRONABIVE) at a classic dose rate (1×10^{10} colony-forming units [cfu]/ml) and revaccinated yearly with a reduced (3×10^8 cfu/ml) dose of the same vaccine. Cows had received 2 to 6 revaccinations.

All cows ($n=300$) at a reproductive age were serologically monitored. Based on records, 90 (30 %) cows with a history of reproductive problems were selected.

Serum samples were analyzed using the following tests: card, rivanol⁽⁷⁾, and RID with native haptén obtained from *B. melitensis* 16 M strain. The antigen was used at a concentration of 1 mg/ml on agarose gel prepared with a glycine buffer solution⁽⁶⁾. Twenty (20) ml of each test serum sample were placed in each well of the gel plate. Plates were incubated for 24 h at ambient temperature, and then read.

In one single occasion, milk samples from all 4 quarters and vaginal exudate samples were obtained from all 90 cattle with reproductive problems for bacteriological analysis. Milk samples were centrifuged in order to separate fat and sediment, then swabbed on Farrell's selective medium plates⁽⁷⁾. Vaginal exudate samples were also cultured on this medium. Plates were incubated at

De las 90 vacas con problemas reproductivos, en una sola ocasión se tomaron muestras de leche de los cuatro cuartos y de exudado vaginal para realizar el estudio bacteriológico, para lo cual las leches fueron centrifugadas para separar la grasa y el sedimento; estos se inocularon con un hisopo en placas de medio selectivo de Farrell⁽⁷⁾; las muestras de exudado vaginal también fueron sembradas en el medio selectivo. Las placas se incubaron a 37 °C por lo menos 10 días, en condiciones normales y en una atmósfera con 5 a 10% de CO₂.

Las colonias sospechosas se sembraron en medio de agar tripticasa soya, y se realizaron las pruebas bacteriológicas respectivas 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 aglutinación con los antiseros A y M. En la fagotipificación se emplearon los fagos: Iz, Wb, Tb R/C, y para determinar si las cepas aisladas eran vacunales o de campo la prueba de sensibilidad a penicilina, estreptomomicina y mesoeritritol⁽⁷⁾.

En las 300 hembras en edad reproductiva, se encontraron 157 positivas a tarjeta (52.3 %), 98 a rivanol (32.6 %) y 19 a IDR (6.3 %). De las 90 vacas con problemas reproductivos se presentaron 88 positivas a tarjeta (97.7 %), 67 a rivanol (74.4 %) y 19 a IDR (21.1 %). De las 19 vacas positivas a IDR, 17 de ellas (89.4 %) eran positivas en 1:200 a rivanol y 2 (10.5 %) negativas.

A partir de las muestras de leche, se aislaron tres cepas de *B. abortus* biotipo 1, ya que resultaron negativas a las pruebas de TSI y citrato; positivas a las pruebas de oxidasa, producción de H₂S y ureasa; existió crecimiento en presencia de penicilina y de los colorantes fucsina y safranina en todas sus concentraciones, además de reaccionar con el antisuero inmunoespecífico A y presentar lisis en presencia de los fagos Iz, Wb y Tb; los tres aislamientos resultaron ser cepas de campo. Los sueros de estos animales con aislamiento fueron positivos a las pruebas de IDR y rivanol.

37 °C for ≥10 d, at both normal conditions and under a 5 to 10% CO₂ atmosphere.

Suspicious colonies were sub-cultured on trypticase soy agar, and bacteriological tests (i.e. hydrogen sulphide production, urea, triple sugar iron [TSI]) were performed as to identify the species of *Brucella*.

In order to determine the *Brucella* biotype, growth tests on thionine, fucsine, and safranine dyes were performed, followed by agglutination with A and M antisera. For phage typing, Iz, Wb, Tb, R/C were used. Finally, penicillin/streptomycin/mesoerythritol⁽⁷⁾ sensitivity test was performed in order to determine whether the isolates were field strains or vaccine strains. Among the 300 cows at reproductive age, 157 (52.3 %), 98 (32.6 %), and 19 (6.3 %) animals were positive to the card, rivanol, and RID tests, respectively.

Among the 90 cows with reproductive problems, 88 (97.7 %), 67 (74.4 %), and 19 (21.1 %) were positive to the card, rivanol, and RID tests, respectively. Among the 19 RID-positive cows, 17 (89.4 %) animals were positive (1:200) to the rivanol test, and 2 (10.5 %) animals were negative.

From milk samples, three biotype 1 *B. abortus* strains were isolated, since they were negative to both TSI and citrate media, but positive to the oxidase test, H₂S production, and urease. Bacterial growth was observed in the presence of penicillin, as well as in the presence of the dyes fucsine and safranine, at all dye concentrations. In addition, isolates reacted with the A specific antiserum, and they were lysed by Iz, Wb, and Tb phages. All 3 isolates came out to be field strains. Serum samples of these animals with isolates were positive to both RID and rivanol tests.

Serology should not only identify animals that have been in contact with the antigen, but they also need to differentiate healthy, vaccinated animals from those infected (either vaccinated or not). This is due to the fact that vaccination does not protect 100% of the animals. Therefore, the ideal serological test should be one that is easy to

Las pruebas serológicas no solamente deben identificar a los animales que han estado en contacto con el antígeno, sino también es preciso poder diferenciar los animales que han sido vacunados y están sanos, de aquéllos que habiendo sido vacunados o no, están infectados. Esto es debido a que la vacunación no protege al 100 % de los animales; por lo tanto la prueba serológica ideal sería aquélla que fuese simple de realizar y proporcionase los resultados con rapidez y repetibilidad, y que fuese capaz de diferenciar los animales infectados de los vacunados con cepa S19. La diferenciación entre animales infectados y vacunados se realiza interpretando las pruebas serológicas en función del tipo de inmunoglobulina, el antígeno empleado y el estado del animal.

La prueba de tarjeta es usada de rutina para el diagnóstico, como prueba tamiz, y debido a su alta sensibilidad se encontró un alto porcentaje de animales positivos⁽⁸⁾. Al realizar las pruebas de rivanol e IDR se encontró una menor cantidad de animales positivos, lo que reafirma su utilidad como prueba confirmatoria en el caso de rivanol y para la prueba de IDR solamente el 21.1% de los animales mostró que había estado en contacto con cepa de campo.

La prueba de rivanol en bovinos vacunados con dosis clásica de cepa S19, presenta una especificidad del 95 % a los 270 días posvacunación⁽⁹⁾, mientras que en otro trabajo se encontró que en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa S19, el rivanol fue poco efectivo al diferenciar animales vacunados de infectados, ya que a los 270 días post-revacunación presentó una especificidad del 85 %⁽¹⁰⁾. En el presente trabajo, el rivanol no se considera efectivo para diferenciar anticuerpos producidos por la revacunación, ya que por la existencia de repetidas revacunaciones, hay niveles elevados de IgG que no son debidos a una infección.

La IDR al compararla con otras pruebas diagnósticas, demostró ser más sensible y más específica que otras pruebas confirmatorias, en bovinos vacunados en edad adulta con cepa 19 de *B. abortus*^(11,12). La IDR tiene la capacidad de detectar a los individuos que no presentan la

perform, yielding quick/repeatable results, and it should be able to discriminate animals infected from those vaccinated with the S19 strain. Differentiation between infected from vaccinated animals is performed by interpreting the serological tests in terms of the type of immunoglobulin, the antigen used, and the condition of the animal.

The card test is routinely used for screening purposes. Given its high sensitivity, a high percentage of positive animals was found with this technique⁽⁸⁾. A lower amount of positive animals to both rivanol and RID tests was detected, thus reconfirming their ability of rivanol as a confirmation test, while the RID test showed that only 21.1 % of the animals had experienced contact with the field strain.

The rivanol test in cattle vaccinated with the classic dose of the S19 strain has 95 % specificity at 270 d postvaccination⁽⁹⁾. A different study found that in cows vaccinated with a reduced dose of the S19 strain, rivanol was little effective in the differentiation of vaccinated vs. infected animals, since at 270 d post-revaccination specificity was 85 %⁽¹⁰⁾. In our study, rivanol was not considered as an effective test for the differentiation of revaccination-derived antibodies, since due to repeated booster vaccinations high IgG levels exist that are not caused by an infection.

When compared to other confirmatory diagnostic tests, RID showed to be more sensitive/more specific in cattle vaccinated at an adult age with *B. abortus* S19 strain^(11,12). RID has the ability of detecting disease-free individuals. After extended exposure of the immune system to this organism – as it occurs in a field infection– antibodies against the native hapten are produced, while this does not occur after a temporary exposure – such as *B. abortus* S19 strain vaccination. Therefore, RID is an extremely important test in the differentiation between infected or vaccinated animals, and it is basic in making the decision on whether or not an animal should be culled^(6,11). Revaccination results in a stronger antigen stimulation. Nevertheless, RID remains able to establish the difference between

enfermedad. En una exposición prolongada de la bacteria al sistema inmune, como es el caso de una infección por cepa de campo, se producen anticuerpos contra el hapteno nativo y no cuando se trata de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de una vacunación con la cepa S19 de *B. abortus*, lo cual la hace una prueba de gran importancia para diferenciar animales infectados de vacunados y básica en la toma de decisiones para que un animal sea eliminado^(6,11). El uso de la revacunación hace que el estímulo antigénico sea más fuerte, sin embargo, la IDR es capaz de seguir diferenciando vacas revacunadas de infectadas, como se demuestra en éste y otros trabajos^(10,13).

En un estudio donde se emplearon diferentes polisacáridos y sueros de vacas infectadas con *B. abortus* biotipo 1, teniendo un grupo control y un grupo experimental, observando que la IDR da en los bovinos vacunados una alta especificidad y en los infectados una alta sensibilidad, principalmente cuando se utiliza el hapteno nativo obtenido a partir de la cepa 16M de *B. melitensis*⁽¹²⁾.

Berman y Jones⁽¹¹⁾ realizaron un estudio con 23 vacas preñadas, las cuales fueron vacunadas con dosis reducida (5×10^9 ufc/ml) y las cuales fueron muestreadas periódicamente, efectuando las pruebas de tarjeta, rivanol y fijación del complemento, la prueba de IDR se realizó en todos los sueros positivos a rivanol, demostrando que la IDR fue la que menos resultados falsos positivos presentó, seguida de la fijación de complemento, llegando a la conclusión que la IDR tiene la capacidad para descubrir animales positivos después de la vacunación con dosis reducida.

Reyes⁽⁹⁾ realizó un estudio en donde probó la especificidad y sensibilidad de diferentes pruebas diagnósticas en becerras de tres a nueve meses vacunadas con dosis normal de cepa S19 de *B. abortus*, encontrando que la IDR fue la segunda prueba más específica para diferenciar animales infectados de vacunados después de ELISA competitivo.

Aparicio *et al.*⁽¹⁰⁾ realizaron un estudio serológico y bacteriológico en un hato bovino con problemas

revacunados o infectados cows, as shown in this and other studies^(10,13).

In a study with different polysaccharides and serum samples from biotype 1 *B. abortus*-infected cows from one control and one experimental group, high specificity of RID was observed in vaccinated cattle, and high sensitivity was observed in infected cattle, mainly when the native hapten of *B. melitensis* 16M strain was used⁽¹²⁾.

Berman and Jones⁽¹¹⁾ carried out a study with 23 pregnant cows that were vaccinated with a reduced dose (5×10^9 cfu/ml). Cattle were sampled periodically, then three (card, rivanol and complement fixation) tests were performed. RID test was performed on all rivanol-positive serum samples. The smallest amount of false positive results was obtained with the RID test followed by the complement fixation test. It was concluded that RID has the ability of detecting positive animals after revaccination with a reduced dose.

Reyes⁽⁹⁾ tested both the specificity and the sensitivity of different diagnostics tests in 3 to 9 mo-old calves vaccinated with a normal dose of the *B. abortus* S19 strain vaccine. This author found that RID was the second most specific test to differentiate infected from vaccinated animals after competitive ELISA.

Aparicio *et al.*⁽¹⁰⁾ carried out a serological/bacteriological study in a herd with brucellosis. These animals were revaccinated with a reduced S19 strain dose followed by periodical sample collections. Both RID and competitive ELISA were positive in 6/70 animals infected 30 d post-revaccination. Biotype 1 *B. abortus* was isolated from the milk samples of these animals.

Similar to the above-mentioned studies, these studies used S19-revaccinated cows, with the difference that in our research animals were given 2 to 6 revaccinations. Even under these circumstances, RID showed ability to differentiate infected from vaccinated animals, showing that 71 of the 90 cattle with reproductive problems were RID negative. Therefore, it was determined that 79 % of the

de brucelosis; estos animales fueron revacunados con dosis reducida cepa S19, efectuando muestreos periódicos obteniendo que la IDR y ELISA competitiva resultaron ser positivas en 6/70 animales infectados 30 días post-revacunación, de estos animales se realizó el aislamiento de *B. abortus* biotipo 1 a partir de muestras de leche.

En estos estudios al igual que en los anteriormente referidos, se trabajó con vacas revacunadas con la cepa S19, pero con la diferencia de que en esta investigación los animales presentaban de dos a seis revacunaciones. Aún así la IDR presentó la capacidad de diferenciar a los animales infectados de los vacunados, mostrando en el grupo de las 90 vacas con problemas reproductivos que 71 fueron negativas a la prueba de IDR, por lo que se determinó que 79 % de los animales revacunados se consideraran como negativos, por no presentar anticuerpos pos-vacunales, ni de infección. Tres de los animales positivos con la IDR coincidieron con el aislamiento de la cepa en el estudio bacteriológico.

El empleo de la revacunación única, además de estar autorizada por la Norma Oficial Mexicana, puede ser una práctica útil que puede emplearse en hatos localizados en zonas enzoóticas, en donde los animales se encuentren más expuestos a contraer la infección y cuando el uso de la vacunación única con dosis normal no proporcione la protección necesaria^(3,10,14).

La utilización de la revacunación repetida, es una práctica que además de no estar autorizada hasta el momento por la Norma Oficial Mexicana, no tiene un sustento científico que explique que una vacuna viva, como es el caso de la S19 o la RB51, para despertar una sólida respuesta celular y humoral debe aplicarse repetidamente, ya que el uso de una revacunación repetida puede llegar a provocar en los animales una respuesta de hipersensibilidad tardía o tipo IV debido a la constante administración del antígeno^(3,10,14).

La revacunación con S19, dificulta el diagnóstico serológico, debido a la persistencia de anticuerpos, ya que las pruebas convencionales no permiten

revacunados animales were considered as negative since they did not show vaccine- or infection-derived antibodies. Three (3) of the RID-positive animals had a positive bacterial isolation.

In addition of being authorized by the NOM, the use of one single revaccination can be a practice useful in herds located in enzootic zones, where animals are more susceptible to getting infected, and when the use of single, normal dose does not provide the necessary protection^(3,10,14).

In addition of not being approved so far by the NOM, multiple revaccinations have no scientific support explaining that the live vaccine (i.e. S19 or RB51) needs to be applied repeatedly in order to mount a solid cellular/humoral immune response. Such multiple revaccinations can trigger a retarded or Type IV hypersensitivity response because of constant antigen administrations^(3,10,14).

S19 revaccination renders serological diagnosis more difficult due to the presence of antibodies, since conventional tests cannot differentiate in the short range between the persistence of residual vaccine antibody titers from those resulting from field infection. This prevents the early culling of positive animals due to natural infection⁽¹⁵⁾.

Repeated S19 revaccination can potentially increase post-vaccine milk shedding, since only one single revaccination at a reduced dose, 0.5 to 2% cows shed the vaccine strain⁽¹⁶⁾.

It can be concluded that the RID test is also useful to establish the difference between infected cattle and those that have been repeatedly revaccinated with the S19 strain at a reduced dose.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financed by the French North-South INSERM's project. The first author of this paper based her bachelor's thesis (Faculty of Superior Studies, Cuautitlán, The National

diferenciar a corto plazo entre la persistencia de títulos vacunales residuales y los originados por una infección de campo, lo que impide la eliminación temprana de animales positivos por infección natural⁽¹⁵⁾.

La revacunación repetida con S19, puede provocar un aumento en la posible eliminación post-vacunal a través de la leche, ya que con una sola revacunación con dosis reducida, se presenta desde un 0.5 a un 2 % de vacas que eliminan la cepa vacunal⁽¹⁶⁾.

Se puede concluir que la prueba de IDR es también útil para diferenciar vacas infectadas de aquéllas revacunadas repetidamente con dosis reducida de la cepa S19.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto Norte-Sur del INSERM de Francia. La primera autora presentó su tesis de licenciatura con base a los resultados de este trabajo, en la FES Cuautitlán UNAM.

LITERATURA CITADA

1. Nicoletti P. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. J Amer Vet Medical Assoc 1978;(178):143-145.
2. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Norma oficial mexicana de emergencia, campaña nacional contra la brucelosis en los animales, Diario Oficial de la Federación, Primera sección, México. 1995.
3. Flores CR, Fernández CL, Trejo SJ, Del Río 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.
4. Nicoletti P. Vaccination against *Brucella*. In: Alan R, editor. Bacterial vaccines. USA: Liss Inc; 1990:147-173.

Autonomous University of Mexico, FES, Cuautitlán, UNAM) on this research's results.

End of english version

5. Díaz R, Jones LM, Leons D, Wilson JB. Surface antigens of smooth *Brucellae*. J Bact 1968;(96):893-903.
6. Díaz R, Garatea P, Jones L, Moriyón I. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. J Clin Microb 1979;(10):37-41.
7. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: Ed. INRA; 1988.
8. 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.
9. 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.
10. Aparicio BA, Díaz AE, Hernández AL, Pérez GR, Alfonseca SE, Suárez GF. Estudio serológico en bovinos revacunados con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19 y expuestos al desafío natural en un hato infectado Téc Pecu Méx 2003;(41):129-140.
11. Berman DT, Jones LM. Radial Immunodiffusion a confirmatory test for bovine brucellosis". [abstract] 83^a Annual Meeting of United States Animal Health Association. Department of Veter Sci University of Wisconsin Madison. 1979.
12. Díaz-Aparicio E, Aragón V, Moreno E, Marín C, Blasco JM, Díaz R Moriyón I. Comparative analysis of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides of A and M type the serological diagnosis in cattle, sheep and goat brucellosis. J Clinical Microb 1994;(31):3136-3141.
13. 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 Pecu Méx 2000;(38):35-42.
14. 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. Avances Cienc Veter 1991;6:152-157.
15. 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 Mex 1983;(14):35-38.
16. Luna JE, Jaramillo CJ. Estudio de la brucelosis en hatos lecheros en una zona conurbana de la ciudad de México. Vet Mex 2002;(27):111-116.