

Presencia de aborto y mortinatos en cabras inmunizadas contra brucelosis con las vacunas RB51, *rfbK* y Rev 1

Abortions and stillbirths in goats immunized against brucellosis using RB51, *rfbK* and Rev 1 vaccines

Rocío Villa^a, Marcell Perea^a, Efrén Díaz Aparicio^b, Alicia Soberón Mobarak^c, Laura Hernández Andrade^b, Francisco Suárez Güemes^c

RESUMEN

Se evaluó la presencia de abortos en cabras vacunadas contra brucelosis en zonas endémicas. Se trabajó con 243 cabras en explotaciones extensivas, 57 fueron vacunadas con RB51 a una dosis de 1×10^{10} ufc/ml, 68 cabras con *rfbK* a 1×10^9 ufc, 97 cabras con Rev 1 a 1×10^5 ufc y 21 cabras sin vacunar. Se detectaron gestantes a 139 cabras, los porcentajes de gestación fueron: 40.3 % (23 de 57) para RB51, 66.2 % (45 de 68) de *rfbK*, 46.4 % (45 de 97) para Rev 1 y en las no vacunadas 85.7 % (18 de 21). Los porcentajes de abortos fueron para RB51 de 23/31 (74.1 %), para *rfbK* de 16/45 (35.5%), para Rev 1 de 10/45 (22.2 %) y en el grupo no vacunado 3/18 (16.6 %), se logró aislar la cepa RB51 de un feto abortado. El riesgo relativo de presentar abortos en el grupo con RB51 fue de 4.45, con *rfbK* de 2.13 y con Rev 1 de 1.33. Además se vacunaron cabras gestantes de un rebaño con excelentes condiciones nutricionales, 10 con RB51 a una dosis de 1×10^{10} ufc, 10 con *rfbK* a 1×10^9 ufc, diez con Rev 1 y nueve cabras sin vacunar. El grupo de RB51 presentó un aborto y un mortinato, en ambos casos RB51 fue aislada de los fetos y exudados vaginales. Se concluye que entre los inmunógenos evaluados en cabras, la RB51 no es una opción conveniente ya que es causa de abortos y de mortinatos.

PALABRAS CLAVE: Brucelosis, Cabras, RB51, Rev 1, *rfbK*.

ABSTRACT

The presence of abortions was evaluated in brucellosis-vaccinated goats in endemic zones. In total, 243 goats under extensive management conditions were used; 57 goats were vaccinated with RB51 at the dose rate of 1×10^{10} colony-forming units (cfu)/ml; 68 goats received 1×10^9 cfu *rfbK*; 97 goats received 1×10^5 cfu Rev 1; and 21 goats were kept as non-vaccinated controls. One hundred thirty nine (139) goats were detected pregnant, resulting in the following pregnancy rates: 40.3 % (23/ 57) for RB51; 66.2 % (45/68) *rfbK*; 46.4 % (45/97) for Rev 1; and 85.7 % (18/21) for the non-vaccinated controls. Abortion rates were as follows: RB51: 74.1 % (23/31); *rfbK*: 35.5 % (16/45); Rev 1: 22.2 % (0/45); and non-vaccinated controls: 16.6% (3/18). The RB51 strain was isolated from one aborted fetus. The relative risk of abortion was as follows: RB51: 4.45; *rfbK*: 2.13; and Rev 1: 1.33. In addition, goats in a herd with excellent nutritional conditions were also vaccinated, as follows: 10 with 1×10^{10} cfu RB51; 10 with 1×10^9 cfu *rfbK*; 10 with 1×10^5 cfu Rev 1; and 9 goats remained as non-vaccinated controls. The RB51 group had one abortion and one stillborn kid. In both cases, the RB51 strain was isolated from the fetuses and vaginal exudates. It was concluded that among the immunogens evaluated in goats, the RB51 strain vaccine is not an adequate option, since it results in abortions and stillbirths.

KEY WORDS: Brucellosis, Goats, RB51, Rev 1, *rfbK*.

INTRODUCCIÓN

En México, la brucelosis caprina es causa de una importante zoonosis bacteriana que provoca grandes

INTRODUCTION

In Mexico, goat brucellosis is an important bacterial zoonosis causing large economic losses. *Brucella*

Recibido el 19 de enero de 2007. Aceptado para su publicación el 10 de octubre de 2007.

^a Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco, Puebla, México.

^b CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 15.5 carretera Federal México-Toluca, Palo alto, Delegación Cuajimalpa, México, 05110, Distrito Federal. Tel.5536180800 ext .44. efredia@yahoo.com. Correspondencia al segundo autor.

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

pérdidas económicas. *Brucella melitensis* es la principal especie que afecta a las cabras. En los países subdesarrollados, la vacunación es la principal herramienta para el control de la enfermedad, pero para ser efectiva debe de ir acompañada de buenas prácticas sanitarias y diagnósticas.

La cepa Rev 1 de *B. melitensis* es la vacuna más usada para el control de la brucelosis en pequeños ruminantes, y se ha demostrado que usándola a dosis reducida protege a las cabras, por lo menos durante cinco años después de la vacunación⁽¹⁾. La vacunación en bovinos con cepas rugosas de *Brucella abortus* ha demostrado eficacia y se realiza en algunos países con mayor o menor éxito.

La vacuna *rfbK* es una mutante por transposición, que fue desarrollada en la Universidad de Texas, pero no es usada comercialmente⁽²⁾. La cepa RB51 se aprobó en México en 1998 como vacuna oficial para los bovinos⁽³⁾, es una cepa rugosa atenuada derivada de la cepa 2308 de *B. abortus*, que es una cepa lisa y virulenta. La cepa RB51 presenta una secuencia de inserción de 842 pb conocida como elemento IS711 que interrumpe el gen *wboA*, que codifica una glicosiltransferasa, enzima esencial en la biosíntesis del lipopolisacárido⁽⁴⁾. Estas cepas han sido evaluadas en cabras y ovejas en condiciones controladas, obteniéndose una buena protección contra el desafío experimental de *B. melitensis* aunque menor que la Rev 1^(5,6), encontrándose que en condiciones experimentales no se presenta aborto, ni producción de anticuerpos post-vacunales con pruebas serológicas convencionales^(7,8). Esto mismo se menciona en trabajos realizados con vacunación masiva de cabras usando RB51 en el estado de Veracruz⁽⁹⁾. Sin embargo, para poder utilizar estas vacunas masivamente en cabras, deben de realizarse más pruebas, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar si se presentaban abortos, al vacunar cabras de zonas endémicas de brucelosis, con las mutantes rugosas RB51 y *rfbK* de *B. abortus* y compararlo con la Rev 1 de *B. melitensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1

Este estudio fue realizado con un total de 243

melitensis is the major species affecting goats. In underdeveloped countries, vaccination is the main tool used in the control of this disease, but for vaccination to be effective, it must be accompanied by sound health and diagnostic practices.

B. melitensis Rev 1 strain is the most popular vaccine for the control of brucellosis in small ruminants. When used at a reduced dose, Rev 1 has shown to protect goats for at least 5 yr after vaccination⁽¹⁾. Cattle vaccination using rough strains of *B. abortus* has shown to be efficacious, and some countries use it with more or less success.

The *rfbK* vaccine is a trans-positional mutant developed by the Texas A&M University, but it is not used commercially⁽²⁾. RB51 was approved in Mexico in 1998 as the official vaccine for cattle⁽³⁾. It is an attenuated rough strain derived from *B. abortus* 2308 strain, which is a virulent, smooth strain. The RB51 strain has an 842 bp insert known as the IS711 element, that breaks into the *wboA* gene, which codes for a glycosyl transferase, an essential enzyme for lypopolysaccharide biosynthesis⁽⁴⁾. These strains have been evaluated in both goats and sheep under controlled conditions with good protection against the experimental challenge with *B. melitensis*, even though protection is lower than that obtained with the Rev 1 vaccine^(5,6). Under experimental conditions no abortion occurs. Also, no post-vaccination antibodies can be detected by conventional serology^(7,8). The same has been reported⁽⁹⁾ after mass goat vaccination with RB51 in the Mexican State of Veracruz. Nevertheless, for these vaccines to be massively used in goats, further trials are needed. The purpose of this study was to see if whether abortions occurred after vaccinating goats in brucellosis-endemic areas using the *B. abortus* rough mutants RB51 and *rfbK*, as compared with *B. melitensis* Rev 1 strain.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1

This study was performed using a total of 243 3-mo-old females from three goat herds located in the Mexican States of Puebla and Tlaxcala, where

hembras mayores de tres meses de edad, de tres rebaños de cabras localizados en los estados de Puebla y Tlaxcala, en los que nunca se había vacunado contra brucelosis. La seroprevalencia inicial de brucelosis en los tres rebaños, obtenida mediante la prueba de tarjeta, fue de 7.4, 8.9 y 6.6 %. Los tres hatos tenían condiciones similares, con pastoreo diurno en una zona con escasa vegetación; no se les proporcionaba ningún tipo de suplemento nutricional y estaban alojados en corrales al aire libre sin ninguna protección contra el viento y el frío.

Las cabras en los tres rebaños, fueron divididas de manera aleatoria en cuatro grupos y vacunadas subcutáneamente de la siguiente manera: 57 cabras con 1×10^{10} ufc/ml de la cepa RB51 de *B. abortus*; 68 cabras con 1×10^9 ufc/ml de la cepa rfbK de *B. abortus*; 97 cabras con 1×10^5 ufc de la cepa Rev 1 de *B. melitensis*; 21 cabras permanecieron sin vacunar.

En el muestreo del día 0, las 243 cabras usadas en este experimento, fueron negativas a la prueba de tarjeta; sin embargo las cabras seropositivas que fueron encontradas en los tres rebaños, permanecieron mezcladas con las cabras del experimento durante todo el tiempo del estudio.

De las 243 cabras que integraron este experimento, el 57.2 % (139) estaban gestantes, los porcentajes de gestación por grupo fueron de: 40.3 % (23 de 57) para el grupo de RB51, 66.2 % (45 de 68) en el grupo de rfbK, 46.4 % (45 de 97) para el grupo de Rev 1 y de 85.7 % (18 de 21) en las cabras no vacunadas.

Experimento 2

Se vacunaron 39 cabras adultas en el segundo tercio de la gestación, que tenían las características de no haber sido nunca inmunizadas contra brucelosis, así como pertenecer a un rebaño libre de la enfermedad. Las 39 cabras fueron divididas aleatoriamente en tres grupos: 10 cabras vacunadas con una dosis de 4×10^{10} ufc/ml de *B. abortus* RB51; 10 cabras vacunadas con una dosis de 1×10^9 ufc/ml de rfbK; 10 cabras vacunadas con Rev 1 a una dosis de 1×10^5 ufc/ml y 9 cabras sin vacunar. Estas 39 cabras se mantuvieron alojadas en corrales,

no brucellosis vaccines had been previously used at all. In accordance with the card test, the original serological brucellosis prevalence rates in these herds were 7.4, 8.9 and 6.6 %, respectively. All three herds had similar conditions with daytime grazing on fields with scarce vegetation and no nutritional supplementation whatsoever. Goats were held in open pens with no wind or cold protection.

Goats in all three herds were randomly allocated to four groups then vaccinated subcutaneously as follows: 57 goats with 1×10^{10} cfu/ml *B. abortus* RB51 strain; 68 goats with 1×10^9 cfu/ml *B. abortus* rfbK strain; 97 goats with 1×10^5 cfu *B. melitensis* Rev 1 strain; and 21 goats were kept as non-vaccinated controls.

Day 0 sampling showed that all 243 goats were serologically negative to the card test, but all other goats which tested serologically positive in the three herds remained co-mingled with the experimental animals throughout the study.

Of the 243 goats in the experiment, 139 (57.2 %) were pregnant. Per-group pregnancy rates were 40.3 % (23/57) for RB51; 66.2 % (45/68) for rfbK; 46.4 % (45/97) for Rev 1; and 85.7 % (18/21) for the non-vaccinated control group.

Experiment 2

Thirty nine (39) adult goats in their second third of gestation were vaccinated. These animals had never been immunized against brucellosis, and they belonged to a brucellosis-negative herd. Goats were assigned at random to three treatment groups, i.e.: 10 goats received one dose of 4×10^{10} cfu/ml *B. abortus* RB51 strain; 10 goats received one dose of 1×10^9 cfu/ml rfbK; 10 goats received one dose of 1×10^5 cfu/ml Rev1; and 9 goats were not vaccinated. These 39 goats were housed in pens protected against cold and wind in a farm located in Topilejo, DF (Mexico City), with excellent nutritional conditions, grazing during the daytime and when back in their pens in the afternoon, these animals were supplemented with alfalfa, minerals and concentrated feed.

Bacterial strains and culture conditions. Commercially-available (*Productora Nacional de*

protegidas del frío y del viento en un rancho localizado en Topilejo, DF, presentaban un excelente estado nutricional, pastoreaban durante el día y al regresar a sus corrales eran suplementadas con alfalfa, sales minerales y alimento concentrado.

Cepas y condiciones de cultivo. Se usaron vacunas comerciales de RB51 y de Rev 1 (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios México). La vacuna *rfbK* de *B. abortus* fue donada por el Dr. Adams de la Universidad de Texas A&M en EUA. Las cepas fueron crecidas durante 48 h a 37 °C en agar tripticasa soya (Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA).

Muestras. En el Exp 1 se colectaron muestras serológicas de las 243 cabras a los 90, 180, 270 y 360 días post-vacunación. En ambos experimentos se observó a las cabras gestantes hasta el parto, colectándose de las cabras que abortaban leche y exudado vaginal, y cuando fue posible se colectaron los fetos.

Pruebas serológicas. En el Exp 1, se realizaron las pruebas de tarjeta y rivanol⁽⁹⁾, considerándose títulos de 1:50 o mayores como positivos.

Estudio bacteriológico. Para verificar el número de unidades formadoras de colonias (ufc) que tenían las vacunas se utilizó el método de Miles y Misra⁽¹⁰⁾. En ambos experimentos, las muestras de leches, exudados vaginales y muestras de los fetos, fueron inoculadas por duplicado en placas de TSA y de Farrell⁽¹¹⁾. Las cepas aisladas fueron identificadas y biotipificadas por la metodología descrita por Alton *et al*⁽⁹⁾. Las cepas rugosas fueron identificadas por tinción con cristal violeta, la aglutinación con acriflavina y con antisuero rugoso⁽¹²⁾ y para diferenciar entre *rfbK* y RB51 se usó la prueba de sensibilidad a la rifampicina⁽¹³⁾.

Análisis estadístico. Se calcularon los riesgos relativos para la presencia de aborto para cada vacuna y grupo, mediante el programa Medcalc.

RESULTADOS

Experimento 1

Los resultados positivos a la prueba de tarjeta en las cabras vacunadas con las mutantes rugosas,

Biológicos Veterinarios México, ProNaBiVe, Mexico's National Veterinary Vaccine Manufacturing Agency) RB51 and Rev 1 vaccines were used. The *B. abortus rfbK* vaccine was graciously donated by Dr. Adams, Texas A&M University, USA. Strains were grown for 48 h at 37 °C in Trypticase Soy Agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA).

Samples. In Exp 1, serum samples were collected from all 243 goats on d 90, 180, 270, and 360 post-vaccination. In both experiments, pregnant goats were observed all the way to parturition. Milk and vaginal exudate samples were collected from all aborting goats and fetuses were also collected when possible.

Serological tests. In Exp 1, both the card test and the rivanol test⁽⁹⁾ were conducted. Titers \geq 1:50 were considered as positive.

Bacteriological study. Vaccine colony-forming units (cfu) were determined using Miles & Misra's method⁽¹⁰⁾. In both experiments, milk, vaginal exudate and fetus samples were inoculated in duplicate into both TSA and Farrell's medium plates⁽¹¹⁾. Isolates were identified and bio-typed using the methodology described by Alton *et al*⁽⁹⁾. Rough strains were identified by crystal violet staining, and acriflavin and rough anti-serum agglutination⁽¹²⁾. Discrimination between *rfbK* and RB51 was done using the rifampicin sensitivity test⁽¹³⁾.

Statistical analysis. Relative abortion risk for each vaccine and for each treatment group was calculated using the Medcalc software.

RESULTS

Experiment 1

Card test-positive results in goats vaccinated with the rough mutants were attributed to field infections. Average card test positive results in all four post-vaccination samplings (at 90, 180, 270, and 360 d) was 5.2 % (12/228) in the RB51-vaccinated group; 6.6 % (18/272) in the *rfbK*-vaccinated group; and 1.2 % (1/84) in the non-vaccinated group. Goats in groups vaccinated with the rough mutants which

fueron atribuidos a infecciones de campo. El promedio de positivos a la prueba de tarjeta en los cuatro muestreos post-vacunales (90, 180, 270 y 360 días) fue de 5.2 % (12/228) en el grupo vacunado con RB51, de 6.6 % (18/272) en el grupo con *rfbK* y de 1.2 % (1/84) en el grupo sin vacunar. Las cabras de los grupos vacunados con mutantes rugosas, que resultaron positivas a la prueba de tarjeta fueron negativas en la prueba de rivanol.

Los resultados de las pruebas serológicas para cada grupo, se presentan en la Figura 1. Las cabras del grupo vacunado con Rev 1 presentaron un 54 %

resultados positivos a la prueba de tarjeta y negativos a la prueba de rivanol.

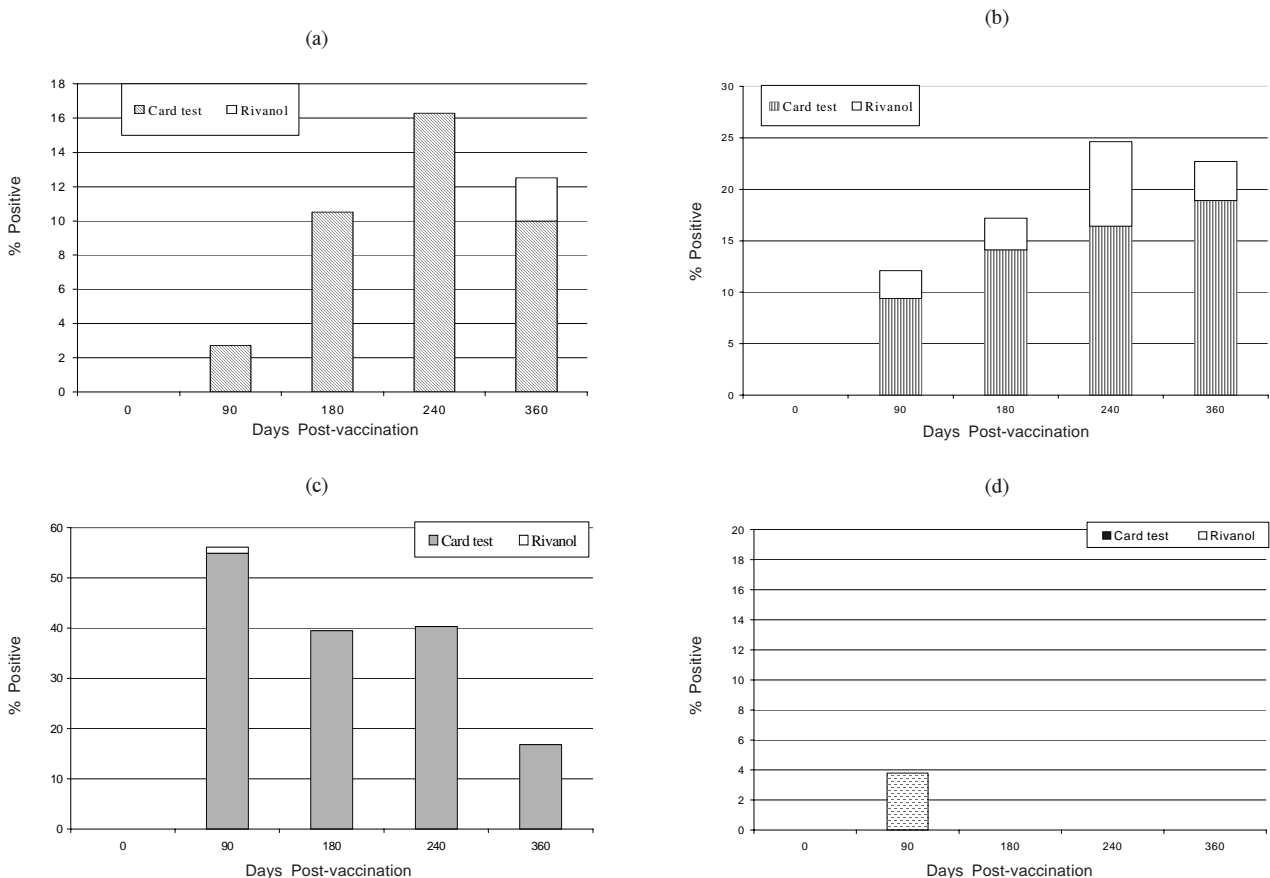
Per-group serological results are shown in Figure 1. Rev 1-vaccinated group had 54 % positive reactors at 90 d. This percentage decreased gradually down to 18 % at 360 d.

Per-group abortion rates were as follows: Rev 1: 22.2 % (10/45); *rfbK*: 35.5 % (16/45); RB51: 74.2 % (23/31); and non-vaccinated controls: 16.6 % (3/18).

Results of the relative abortion risk analysis in the vaccinated groups as compared with the non-

Figura 1. Respuesta posvacunal expresada en porcentaje de sueros positivos a la prueba de tarjeta y rivanol; (a) RB51 de *B. abortus* a dosis reducida; (b) *rfbK* de *B. abortus* a dosis reducida; (c) Rev 1 de *B. melitensis* a dosis reducida; (d) cabras sin vacunar

Figure 1. Percent positive results by both the card test and the rivanol test; a) Reduced dose of the *B. abortus* RB51 strain; (b) Reduced dose of *B. abortus rfbK* strain; (c) Reduced dose of *B. melitensis* Rev 1 strain; (d) Non-vaccinated goats



de reactores a los 90 días, este porcentaje fue gradualmente decreciendo hasta llegar al 18 % a los 360 días.

El porcentaje de abortos para el grupo vacunado con Rev 1 fue de 22.2 % (10/45), para el grupo vacunado con *rfbK* fue de 35.5 % (16/45), en el grupo de cabras inmunizadas con RB51 se encontraron 74.2 % (23/31), y en el grupo no vacunado resultaron 16.6 % (3/18).

Los resultados del análisis del riesgo relativo de la presencia de abortos, en los grupos vacunados comparados con el grupo control sin vacunar se presentan en el Cuadro 1. Se destaca que el riesgo relativo de presentar abortos en el grupo de cabras vacunadas con RB51 fue de 4.45, y disminuye en los grupos vacunados con *rfbK* que fue de 2.13 y con Rev 1 donde presentó 1.33.

El estudio bacteriológico realizado a las muestras de leche y de exudado vaginal colectadas de las cabras que abortaron, fue negativo para el aislamiento de *Brucella*, pero a partir de las muestras de un feto abortado del grupo vacunado con RB51, se logró aislar la cepa vacunal. Se utilizó la prueba de resistencia a rifampicina para confirmar que la cepa rugosa de *B. abortus* era RB51.

Experimento 2

Todas las cabras gestantes vacunadas con *rfbK* (10/10) y las del grupo sin vacunar (9/9) parieron normalmente. En el grupo de cabras vacunadas

vaccinated control group are shown in Table 1. It is important to notice that the relative risk to show abortions in the group of goats vaccinated with the RB51 strain was 4.45, and this parameter decreases down to 2.13 and 1.33 for the *rfbK* and the Rev 1 groups, respectively.

No *Brucella* was isolated during the bacteriological study performed on milk and vaginal exudate samples collected from aborted goats. Nevertheless, the vaccine strain was isolated from the samples of the aborted fetus in the RB51 vaccinated group. The rifampicin resistance test confirmed that this rough *B. abortus* isolate was actually RB51.

Experiment 2

All pregnant, *rfbK*-vaccinated goats (10/10) and those in the non-vaccinated control group (9/9) kidded normally. Eight of the 10 (8/10) goats in the RB51 group kidded normally, while one goat aborted, and the remaining one experienced dystocia, resulting in a stillbirth. The RB51 strain was isolated from the fetuses of both cases.

DISCUSSION

In the rough strain-vaccinated groups and in the non-vaccinated controls, card test- positive reactors were considered as infected, while in the Rev 1-vaccinated group, goats with positive card-test results were not considered as infected. This criterion was used since this is a rough vaccine which lacks the O lypopolysaccharide chain, yielding no post-vaccine response, therefore reactors

Cuadro 1. Resultados del análisis del riesgo relativo de la presencia de abortos, en los grupos de cabras vacunadas con RB51, *rfbK*, Rev 1 y el grupo control de cabras sin vacunar

Table 1. Relative abortion risk analysis results among goats vaccinated with the RB51, *rfbK*, or Rev 1 strains and those in the non-vaccinated control group

Vaccinated Groups	Controls 3 positive 15 negative
RB5 123 positive 8 negative	Relative risk = 4.451695% IC = 1.5521 - 12.7679
<i>rfbK</i> 16 positive 29 negative	Relative risk = 2.133395% IC = 0.7063 - 6.4434
Rev 110 positive 35 negative	Relative risk = 1.333395% IC = 0.4144 - 4.2905

Relative risk is > 1 if association is positive, i.e.: if the presence of the factor is associated with higher event occurrence.

con RB51, 8 de 10 cabras parieron normalmente, una cabra abortó y otra cabra presentó un parto distócico, en el cual la cría murió; en ambos casos se logró aislar la cepa RB51 a partir de muestras de los fetos.

DISCUSIÓN

En los grupos de cabras inmunizadas con las vacunas rugosas, así como en el grupo no vacunado, los reactores a la prueba de tarjeta se consideraron como infectados, en cambio en el grupo de cabras inmunizadas con Rev 1, las cabras con resultados positivos a la prueba de tarjeta no se consideraron infectadas; este criterio se aplica porque al ser una vacuna rugosa y carecer de la cadena O del lipopolisacárido, no existe respuesta posvacunal y los reactores son considerados infectados. En el caso de la Rev 1, al ser una cepa lisa y tener la cadena O del lipopolisacárido igual que las cepas de campo, tiene que discernirse si el animal está infectado o presenta respuesta post-vacunal que tiene una duración de hasta ocho meses, y durante este tiempo las prueba de tarjeta y rivanol no diferencian vacunados de infectados⁽¹⁴⁾.

Las cabras del grupo vacunado con RB51 presentaron 74.2 % de abortos, el cual se considera alto, en comparación con resultados de otros experimentos en los que se vacunaron cabras y borregas gestantes con RB51, donde se encontraron porcentajes de abortos menores al 10 %^(6,15). Es muy importante señalar que estos estudios se realizaron en condiciones experimentales, y los animales estaban confinados en corrales, protegidos de las condiciones climáticas adversas y con una excelente alimentación y condición corporal. En el Exp 1, se determinó el riesgo relativo de presentar abortos, siendo el grupo de cabras vacunadas con RB51 el que presentó un mayor riesgo relativo de presentar abortos (4.45), lo que coincide con los resultados del aislamiento de la cepa; en los otros grupos vacunados se presentó el riesgo relativo pero en menor grado, para las vacunas rfbK (2.13) y la Rev 1 (1.33). Aunque para bovinos existe información nacional y mayormente internacional que avala que RB51 es una cepa avirulenta y segura^(4,7), también existen reportes de aislamientos a partir

are considered as infected. In the case of Rev 1, being a smooth strain and having the same O-lipopolysaccharide chain as field strains, a separation has to be made as on whether the animal is infected or it is showing a post-vaccine response which lasts for up to 8 mo. During this time period, both the card test and the rivanol test do not discriminate between vaccinated and infected goats⁽¹⁴⁾.

Goats in the RB51-vaccinated group showed a 74.2 % abortion rate, which is considered as high when compared with results from other studies in which pregnant goats and ewes were vaccinated with the RB51 strain, yielding < 10 % abortion rates^(6,15). It is important to point out that these studies were conducted under experimental conditions and animals were pen-confined, weather protected, and had excellent levels of nutrition and body condition scores. In Exp 1, the RB51 group showed the highest relative risk of abortion (4.45), matching strain isolation results. All other vaccinated groups showed lower relative risk levels, i.e.: rfbK: 2.13, and Rev 1: 1.33. Even though domestic and mostly internationally publications exist supporting RB51 as a non virulent, safe strain for cattle^(4,7), reports also exist documenting RB51 isolation from cattle milk, fetus, and vaginal exudate samples^(16,17), as well as from human infections⁽¹⁸⁾. The lack of field strain isolation is attributed to the scarce number of abortions in the non-vaccinated group (i.e. 3 of 18 pregnant goats).

Soberón *et al*⁽⁸⁾ compared the protection of goats vaccinated with RB51 or Rev 1 against the experimental challenge with *B. melitensis*, obtaining similar results. Nevertheless, another report shows contradicting results, with protection levels of 90 % and only 33 % with Rev 1 and RB51, respectively, against the experimental challenge⁽⁵⁾, even though in both cases limited numbers of animals were used⁽¹⁵⁾.

In a field trial⁽⁹⁾, two 10-goat groups with 3 to 4 mo of pregnancy were vaccinated with either 3 x 10⁸ cfu or 1 x 10⁵ cfu RB51 respectively. None of these goats aborted, seroconverted or spread The RB51 strain in their milk or uterine fluids, even

de leche, fetos, y exudado vaginal de bovinos^(16,17), así como de infección en humanos⁽¹⁸⁾. El hecho de no lograr aislar cepas de campo se atribuye al escaso número de abortos del grupo no vacunado, que fue de 3 de 18 cabras gestantes.

Soberón *et al.*⁽⁸⁾ mencionan que al comparar RB51 con Rev 1 en cuanto a la protección conferida en cabras contra el desafío experimental con *B. melitensis*, los resultados fueron similares; sin embargo hay otro trabajo que presenta resultados contradictorios, donde la Rev 1 protege en un 90 % y la RB51 sólo en un 33 % frente al desafío experimental⁽⁵⁾, aunque el número de animales fue muy limitado en ambos casos⁽¹⁵⁾.

En un experimento realizado en condiciones naturales⁽⁹⁾, vacunaron dos grupos de 10 cabras que tenían entre 3 a 4 meses de gestación, con RB51 a dosis de 3×10^8 ufc y 1×10^5 ufc respectivamente, encontrando que ninguna de las cabras vacunadas abortó, seroconvirtió o eliminó RB51 por leche o fluidos uterinos; sin embargo, todas presentaron placentitis no granulomatosa. Por otro lado, el Idrissi *et al.*⁽¹⁹⁾ reportan que la protección otorgada por la vacunación con RB51 en borregos, contra el desafío natural con cepas de campo de *B. melitensis* fue significativamente menor que la protección conferida por la vacuna Rev 1 y que la RB51 no otorgó una efectiva protección contra el aborto.

Existen escasos reportes sobre el uso de la cepa *rfbK* en la vacunación de cabras u ovejas, los que se realizaron en situaciones controladas y no se presentaron abortos^(5,6,8,20), lo cual es diferente a lo encontrado en este trabajo donde bajo situaciones de campo se presentó un 35.5 % de ovejas que abortaron.

Referente a la Rev 1, la respuesta post-vacunal del grupo vacunado empezó a declinar a los 90 días y los positivos a rivanol fueron muy bajos, sin embargo la prueba de rivanol no ha demostrado ser una buena prueba confirmatoria en cabras vacunadas con Rev 1⁽²¹⁾. Estos resultados fueron similares a los reportados por otros investigadores^(14,22). Aunque hubo abortos en las cabras vacunadas con Rev 1, los porcentajes fueron bajos al comparar con las cabras vacunadas con mutantes

though all of them had non-granulomatous placentitis. On the other hand, el Idrissi *et al.*⁽¹⁹⁾ reported a significantly lower protection with RB51 in sheep against natural challenge with field *B. melitensis* strains as compared with that obtained with Rev 1. In addition, RB51 was not effective in the protection against abortion.

Scarce reports exist about using the *rfbK* strain in the vaccination of goats or sheep. These few reports correspond to studies performed under controlled conditions or showed no abortions^(5,6,8,20), which differs from this trial showing 35.5 % abortions among ewes under field conditions.

As far as the Rev 1 strain is concerned, the immune response in the vaccinated group started to decline at 90 d, and extremely low rivanol results were obtained. Even though, the rivanol test has shown not to serve as a good confirmation assay for Rev 1-vaccinated goats⁽²¹⁾. These results are consistent with those reported elsewhere^(14,22). When compared with rough mutant-vaccinated goats, the Rev 1-immunized goats showed lower abortion rates. Nicoletti⁽²³⁾ reported excellent protection in goats vaccinated with a reduced dose of Rev 1. Research reports from two brucellosis-endemic areas in Kuwait and Chihuahua, Mexico, mass vaccination with a reduced dose rate of Rev 1 given subcutaneously to pregnant goats resulted in minimal or no abortions, and this practice significantly decreased the incidence of brucellosis in these areas^(24,25). Díaz-Aparicio *et al.*⁽¹⁾, reported that the reduced Rev 1 dose has the ability of protecting goats in endemic zones for up to 5 yr after vaccination.

In our results, it must be remembered that even though the fact that proper goat nutrition is essential to maintain gestation –as it occurred in Group 2 animals– is well accepted, RB51 vaccination can result in problems even in goats with good body condition scores.

Regarding the use of rough vaccines in small ruminants, Moriyón *et al.*⁽¹⁵⁾, concluded that RB51 is not useful in sheep, and that information in goats is not only preliminary but also contradicting,

rugosas. Nicoletti⁽²³⁾ reporta excelentes resultados de protección vacunando cabras con dosis reducida de Rev 1. En dos investigaciones realizadas en zonas endémicas de brucelosis, en Kuwait y en Chihuahua, México, la vacunación masiva con dosis reducida de Rev 1, administrada por vía subcutánea en cabras gestantes, causó una mínima o una nula presentación de abortos, y redujo significativamente la incidencia de brucelosis en la zona^(24,25). Díaz-Aparicio *et al*⁽¹⁾, notificaron que la dosis reducida de Rev 1 tiene la capacidad de proteger a cabras en zonas endémicas hasta por cinco años posteriores a la vacunación.

Debemos considerar en nuestros resultados, que aunque es bien aceptado que en las cabras una nutrición adecuada es esencial para mantener la gestación como sucedió con los animales del grupo 2; las cabras vacunadas con RB51 pueden presentar problemas aún con una buena condición corporal.

Referente al uso de las vacunas rugosas en pequeños rumiantes, Moriyón *et al*⁽¹⁵⁾, concluyen que RB51 no es útil en ovinos, y que la evidencia en las cabras es preliminar y contradictoria, por lo que antes de poder usarse en pequeños rumiantes, debe haber una sólida evidencia de su efectividad y seguridad. Esto es confirmado por la aseveración de Blasco⁽²⁶⁾ de que aunque la RB51 no interfiere con el diagnóstico, su uso en pequeños rumiantes es inefectiva para proteger contra *B. melitensis* en cabras y ovejas.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se concluye que entre los inmunógenos evaluados en cabras, la RB51 no es una opción conveniente, ya que es causa de abortos y de mortinatos. Actualmente, la Rev 1 debe ser considerada como la mejor opción para la vacunación de cabras contra la brucelosis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Grant B/1539-3 de la International Foundation of Science y por el proyecto SEP CONACyT

so that prior to using it in small ruminants, solid evidence of its effectiveness and safety should be shown. This was confirmed by Blasco⁽²⁶⁾ who stated that even though RB51 does not interfere with diagnosis, its use is not effective in the protection of goats and sheep against *B. melitensis*.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

It is concluded that among the immunogens evaluated in goats, the RB51 strain is not a proper option, since it results in abortions and stillbirths, at this time, Rev 1 should be considered as the best option for the vaccination of goats against brucellosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financed by Grant B/1539-3 International Foundation of Science, and by the SEP CONACyT project CO245271.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. 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 and Prod 2004;36:117-121.
2. Allen AC, Adams GL, Ficht AT. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. Infec Immunol 1998;66:1008-1016.
3. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. Vet Microbiol 2002;90:19-30.
4. Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:760-764.
5. Hernández L, Ochoa D, Díaz E, Córdoba L, López M, Ontiveros C. Conferred protection for RB51 vaccine in goats, 54th Ann Brucellosis Res Conf. Nov 10-11. St. Louis. 2001.
6. Ochoa DV. Protección conferida por la vacunación con Rev 1 *Brucella melitensis*; RB51 y rfbK *Brucella abortus*, en borregas desafiadas experimentalmente con *Brucella melitensis* [tesis maestría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2002.

7. Roop RM, Jeffers G, Bagchi T, Walker J, Enright FM, Schurig GG. Experimental infection of goat fetuses in uterus, with a stable rough mutant of *Brucella abortus*. *Res Vet Sci* 1991;51:123-137.
8. 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.
9. Martínez HDI, Abeledo MA, Soto RI, Durand R, Bulnes C, Flores CR, Batalla D, Rivera EL, Vallecillo AJM, Espinosa SM, Gómez PJG, Bautista BR. Determinación de la inocuidad de la cepa RB51 de *Brucella abortus* utilizada como vacuna en caprinos *Rev Salud Anim* 2003;25:98-103.
10. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 1988.
11. Farrell ID. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci* 1974;16:280-286.
12. White PG, Wilson JB. Differentiation of smooth and non-smooth colonies of *brucellae*. *J Bacteriology* 1951;61:239-240.
13. Corbel MJ. Determination of the in vitro sensitivity of *Brucella* strains to rifampicin. *Brit Vet J* 1976;132:266-275.
14. Díaz AE, Prado FJ, Ontiveros L, Batalla D. Evaluación serológica de anticuerpos posvacunales en cabras adultas vacunadas con dosis reducida de Rev 1 *Brucella melitensis* en un área enzootica. *Téc Pecu Méx* 1984;47:137-141.
15. Moriyón UI, Grillo MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-Goñi I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Vet Res* 2004;35:1-38.
16. Herrera LE, Hernández AL, Palomares REG, Díaz AE. Study of brucellosis incidente in a bovine Dairy milk infected with *Brucella abortus*, where cattle was revaccinated with RB51. *Intern J Dairy Sci* 2007;2:50-57.
17. Leal- M, Díaz-Aparicio E, Pérez R, Hernández L, Arellano RB, Alfonseca E, Suárez GF. Protection of *Brucella abortus* RB51 vaccine in cows introduced in a herd with active brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2005;28:63-70 .
18. Ashford DA, di Pietra J, Lingappa J, Woods C, Noll H, Neville B, Weyant R, Bragg SL, Spiegel RA, Tappero J, Perkins BA. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine* 2004;22:3435-3439.
19. el Idrissi AH, Benkirane A, el Maoudi M, Bouslikhane M, Berrada J, Zerouali A. Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Rev Sci Tech* 2001;20:741-747.
20. Reyes PL, Díaz AE, Morales AF, Hernández AL, Trigo TF, Suárez GF. Evaluación serológica humoral y celular de la vacuna cepa rugosa *r/bK* de *Brucella abortus* en un rebaño de ovejas [resumen]. XXII Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, Gro. Julio 1998:19.
21. Díaz AE, Hernández AL, Ochoa DV, Blasco MJM, Suárez GF. Evaluación de la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis en caprinos, *Vet Mex* 2000;31:53-58.
22. Crespo LF. *Ovine and caprine brucellosis*. Office International des Epizooties, Paris. 1994.
23. Nicoletti PL. The eradication of brucellosis in animals. *Saudi Med J* 1993;14:288-292.
24. 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 Produc* 1999;31:135-141.
25. 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. In: Abstract of the Workshop Animal Disease Diagnostics in Latin America. San José, Costa Rica. 1990:38-45.
26. Blasco JM. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants [in press]. *Small Rum Res*.