



# Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro

## Transmission of *Brucella abortus* to female calves younger than three months of age, diagnosed by the card and radial immunodiffusion tests in two dairy herds in the state of Queretaro, Mexico

Iván Carrisoza-Urbina\* Mario Medina-Cruz\*\*  
Erika Gabriela Palomares-Reséndiz\*\*\* Efrén Díaz-Aparicio \*\*\*

---

### Abstract

Transmission of *Brucella abortus* to female calves from positive and negative cows was determined in the first week and third month of age. Two herds were used. Herd 1 consisted of 670 milking cows with a brucellosis seroprevalence of 21.6% (145/670). In this herd, groups of positive and negative cows were formed using the card and radial immunodiffusion (RID) tests with native hapten. Blood samples were taken from female calves on two occasions: at one week of age and before animals were vaccinated against *B. abortus*. Of the 22 calves from the positive group, two (9.1%) were positive in the first week of life, but no more positive calves were found at three months of age. In the group of female calves born to negative cows, there were no positive animals at one week of age, but four out of 22 were found positive with the RID test at three months of age. A prevalence rate of 13.6% of positive calves for *B. abortus* in the third month of age was calculated. Twenty milk samples were obtained from this herd and *B. abortus* was isolated from all of them (100%). Using PCR, the strains found were confirmed to be field strains and not vaccine strains. Herd 2 consisted of 1800 milking cows, participating in the National Campaign against Animal Brucellosis, that had a seroprevalence of 1.94% (35/1800) detected from January to December 2009. In this herd, 1 170 records were analyzed using the results of the card and rivanol tests obtained from female calves younger than three months of age, of which 24 (2.1%) were found positive for *B. abortus* from January 2009 to June 2010. It is concluded that the diagnosis of brucellosis is necessary in female calves born in dairies to cows that have the disease, in order to prevent positive animals from remaining in the herd. Vaccine-induced antibodies will avert disease detection, but brucellosis will later manifest itself through abortions during first pregnancies, thus perpetuating the disease in dairies

**Key words:** *BRUCELLA ABORTUS*, FEMALE CALVES, RADIAL IMMUNODIFFUSION.

### Resumen

La transmisión de *Brucella abortus* a becerras de vacas positivas y negativas se determinó a la primera semana de vida y al tercer mes de edad. Se trabajó con dos hatos: el hato 1, con 670 vacas en producción, presentaba una seroprevalencia a brucelosis de 21.6% (145/670). En este hato se formaron dos grupos: vacas positivas y vacas negativas, como resultado de las pruebas de tarjeta y de inmunodifusión radial (IDR) realizadas con hapteno nativo. Se tomaron pruebas de sangre de las vacas en dos ocasiones, a la semana de edad y antes de que los animales fueran vacunados contra *B. abortus*. De las 22 vacas del grupo positivo, 2 (9.1%) becerras resultaron positivas a la primera semana de vida, pero no se encontraron vacas positivas a los tres meses de edad. En el grupo de becerras nacidas de vacas negativas no se

---

Recibido el 19 de junio de 2013 y aceptado el 27 de noviembre de 2013.

\*Estudiante de Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

\*\*Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 8.5 Carretera Federal Tequisquiapan-Ezequiel Montes, Tequisquiapan, Querétaro, México

\*\*\*CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 15.5 Carretera Federal México-Toluca, 05110, Cuajimalpa, DF, México.

Autor para correspondencia: Efrén Díaz Aparicio email: efredia@yahoo.com, teléfono 5536180800, ext.45.

encontraron animales positivos a la semana de vida, pero a los tres meses de edad, 4 de las 22 becerras resultaron positivas con la prueba de IDR. La tasa de prevalencia de vacas positivas a *B. abortus* fue de 13.6% a los tres meses de edad. De las 20 muestras de leche obtenidas de este hato se aisló *B. abortus* (100%). Mediante PCR se confirmó que estas cepas correspondían a cepas de campo y no a cepas vacunales. El hato 2, con 1800 vacas en producción, estaba inscrito en la campaña nacional contra la brucelosis animal y presentaba una seroprevalencia de 1.94% (35/1800) detectada de enero a diciembre de 2009. Se analizaron 1 170 registros usando los resultados de las pruebas de tarjeta y rivanol aplicada en becerras menores de tres meses de edad, de las que 24 (2.1%) resultaron positivas a *B. abortus* de enero de 2009 a junio de 2010. Se concluye que es necesario realizar el diagnóstico de brucelosis en becerras nacidas en establos donde se ha presentado la enfermedad, para prevenir que permanezcan animales positivos en el hato, ya que los anticuerpos posvacunales impedirán detectar la enfermedad, pero posteriormente se manifestará mediante abortos durante la primera gestación, perpetuando así la brucelosis en el establo.

**Palabras clave:** *BRUCELLA ABORTUS*, BECERRAS, INMUNODIFUSIÓN RADIAL.

## Introduction

**B**ovine brucellosis is the cause of major economic losses due mainly to abortions in the last pregnancy trimester, decreased milk production, anticipated herd waste, birth of weak calves and birth of apparently normal calves, although positive to *Brucella abortus*. In Mexico this disease is widespread in all of the states, except for the northern area of the state of Sonora.<sup>1-3</sup>

As stated elsewhere,<sup>4</sup> the prevalence of brucellosis in Mexico in adult bovine cattle is 9%, although the frequency of infection in female calves is unknown. So far, only one author has mentioned that the incidence among female calves may range from 2.5% to 9%.<sup>5</sup>

Cows that are infected after an abortion or delivery eliminate the bacteria, which are then transmitted to other cows through contact with the placenta, vaginal discharges, fetuses and fetal liquids. The cow and its detritus thus become sources of infection.<sup>6</sup>

In a study it was found that bacterial concentration of *B. abortus* in the umbilical cords of two fetuses from different disease-positive cows was  $4.3 \times 10^9$  ufc/g and  $1.4 \times 10^{13}$  ufc/g.<sup>7</sup> These microorganisms may survive and propagate through food and water. In conditions of high humidity, low temperature and low sun intensity, *B. abortus* may remain viable during several months in water, aborted fetuses, manure, hay, work tools and clothes. It also resists desiccation in dust and soils, particularly in the presence of organic material.<sup>2,5,8,9</sup>

Even though the presence of post-partum or post-delivery signs is not frequent in brucellosis-infected bovines, most of these animals become potential carriers and continue eliminating *Brucella* in milk, colostrum and uterine discharges in succeeding deliveries.<sup>2,5,8-12</sup>

The infection seen in the uterus may remain latent in female calves during their first months of life. The animal may remain serologically negative until its first delivery, which is when it will begin to eliminate the bacterium. This is why congenital infections, or infection in the first months of life, represent significant

## Introducción

**L**a brucelosis bovina es causante de grandes pérdidas económicas debido principalmente a los abortos en el último tercio de la gestación, disminución en la producción de leche, desecho anticipado del hato, nacimiento de becerras débiles y nacimiento de becerras aparentemente normales, pero positivas a *Brucella abortus*. En México esta enfermedad se encuentra difundida en todos los estados, únicamente la parte norte del estado de Sonora se encuentra libre de ella.<sup>1-3</sup>

En México, de acuerdo con un trabajo previo,<sup>4</sup> la prevalencia de brucelosis en ganado bovino adulto es de 9%, pero se desconoce la frecuencia de la infección en becerras. A la fecha, solamente un autor cita que la incidencia en becerras puede variar desde 2.5% hasta 9%.<sup>5</sup>

Las vacas infectadas después de un aborto o de un parto eliminan la bacteria, la cual se transmite a otras vacas a través del contacto con placenta, descargas vaginales, fetos y líquidos fetales, por lo que la vaca y sus detritus se convierten en fuentes de infección.<sup>6</sup>

De acuerdo con un estudio, la concentración bacteriana de *B. abortus* en los cordones umbilicales en dos fetos de diferentes vacas positivas a la enfermedad fue de  $4.3 \times 10^9$  ufc/g y de  $1.4 \times 10^{13}$  ufc/g.<sup>7</sup> Estos organismos pueden sobrevivir y propagarse por medio de los alimentos y el agua. En condiciones de humedad alta, temperaturas bajas y de baja intensidad solar, la *B. abortus* puede permanecer viable durante meses en el agua, fetos abortados, estiércol, heno, materiales de trabajo y la ropa, pudiendo resistir la desecación en polvo y suelo, especialmente en presencia de material orgánico.<sup>2,5,8,9</sup>

En los bovinos infectados de brucelosis no es frecuente que se presenten signos después del aborto o parto, pero la mayoría de estos animales se convierten en portadores potenciales y continúan eliminando *Brucella* en la leche, calostro y en las descargas uterinas en partos posteriores.<sup>2,5,8-12</sup>

risks, since they act as reservoirs and potential sources of infection in the animal's reproductive life.<sup>13</sup>

Some studies have mentioned that in developed countries, where there is strict adherence to vaccination regulations, without the possibility of paying for compensations for the elimination of disease-resistant bovines, prevalence rates over 20% are frequently seen in dairy herds.<sup>1,14</sup>

The objective of this study was to determine the prevalence of brucellosis in female calves born to brucellosis-positive cows that had not been vaccinated against *B. abortus* within their first week of life and at three months of age, in order to compare it with that of calves born to brucellosis-negative cows. Diagnosis was established with the card and radial immunodiffusion (RID) tests with native haptén.

## Material and methods

The study was performed in the state of Querétaro from January to June 2010 in two dairy herds of Holstein cows.

Herd 1, with 670 cows in production and a brucellosis control program, had a seroprevalence of 21.6% (145/670) positive cows, diagnosed by means of the card and RID tests. Samples from the coccygeal vein were taken from 80 dry cows to obtain serum. The serum was then frozen for collective analysis. Once all the samples were collected, they were thawed at room temperature for the card and RID tests. The card test at a cell concentration of 8% was used as screening test.<sup>15</sup> RID with native haptén<sup>15</sup> was used as confirmatory test, since it makes it possible to distinguish vaccine antibodies from antibodies due to infection with *Brucella*.<sup>16,17</sup> Diagnostic tests were undertaken at the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) in Animal Microbiology of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Two blood samples were taken from the jugular vein of the female calves: the first one, on the second and seventh days of life and the second one, at 91 and 120 days of age. The latter before their complete dose vaccination with *B. abortus* strain S19. In the first 6 hours of life, all the calves were fed 4 L of non-pasteurized colostrum, regardless whether or not having been born to *Brucella*-positive or -negative cows. The animals were kept in open-air hutches until weaned, at 90 days of age on average.

Herd 2, with 1800 cows in production, was participation in the National Campaign against Animal Brucellosis promoted by the Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (NOM-041-ZOO-1995)<sup>15</sup> starting January 2009. Based on the reports issued during the cam-

La infección que se presenta en el útero puede permanecer latente en las becerras durante los primeros meses de vida; el animal puede permanecer serológicamente negativo hasta su primer parto, momento en el que comienza a eliminar la bacteria. Es por ello que las infecciones congénitas, o en los primeros meses de vida, representan riesgos relevantes debido a que actúan como reservorios y fuentes potenciales de infección en su vida reproductiva.<sup>13</sup>

Algunos estudios mencionan que en países en desarrollo, que cumplen estrictamente con las normas de vacunación y en donde no existe la posibilidad de pagar indemnizaciones por la eliminación de bovinos resistentes a la enfermedad, se presentan con alta frecuencia hatos lecheros que muestran tasas de prevalencia mayores a 20%.<sup>1,14</sup>

El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de brucelosis en becerras no vacunadas contra *B. abortus* en la primera semana de vida y al tercer mes de edad, nacidas de vacas positivas, para compararla con la de becerras nacidas de vacas negativas, empleando para su diagnóstico las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial (IDR) con haptén nativo.

## Material y métodos

El estudio se realizó en el estado de Querétaro de enero a junio de 2010 en dos hatos de bovinos lecheros de la raza Holstein.

El hato 1, con 670 vacas en producción y un programa de control de brucelosis, tenía una seroprevalencia de 21.6% (145/670) de vacas positivas, diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e IDR. Se tomaron muestras de la vena cocciógea de 80 vacas secas para la obtención de suero, el cual se congeló para realizar el análisis colectivo. Una vez reunidas todas las muestras, se descongelaron a temperatura ambiente y se llevaron a cabo las pruebas de tarjeta e IDR. La prueba de tarjeta al 8% de concentración celular se utilizó como tamiz.<sup>15</sup> La prueba de IDR con haptén nativo<sup>15</sup> se empleó como prueba confirmatoria, ya que permite la distinción entre anticuerpos vacunales y anticuerpos presentes por la infección con *Brucella*.<sup>16,17</sup> Las pruebas de diagnóstico se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) de Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Se tomaron dos muestras sanguíneas de la vena yugular de las becerras; la primera entre los días 2 y 7 de vida y la segunda entre los días 91 y 120 de edad, ésta última antes de su vacunación con dosis completa de cepa S19 de *B. abortus*. Dentro de las primeras 6 h de vida, todas las becerras fueron alimentadas con 4 L de calostro no pasteurizado, indistintamente si

pañ, a seroprevalence of 1.94% was detected in cows (35/1800) by means of the card and rivanol tests. Due to the low disease prevalence in this herd, a retrospective study was carried out, using the official registers of 1170 female calves from the campaign, which included the card and rivanol tests performed with the sera of animals younger than 3 months of age from January 2009 to June 2010.

DNA extraction from the isolates and reference strains was carried out with the phenol-chloroform method described by Sambrook *et al.*<sup>18</sup>. The extracted DNA (100 ng) was used as a mold for the PCR. To differentiate *B. abortus* strain S19 from field isolates, the initiators described by Sangari *et al.*<sup>19</sup> were used. To eliminate the possible presence of *B. abortus* strain RB51, the initiators described by Vemulapalli *et al.*<sup>20</sup> were used.

## Results

Herd 1 consisted of groups of brucellosis-positive and brucellosis-negative cows. Cows that had given birth to a live female calf were selected. In the group of positive cows, 22 female calves were born, out of which 6/22 (27.3%) were positive to the card test in their first week of life, whereas only 2/22 (9.1%) turned out to be positive using the RID test. At three months of age, these 6 same calves yielded positive with the card test and the same two yielded positive with the RID test (TABLE 1).

Likewise, 22 female calves were born to the group of negative cows, out of which 6 (27.3%) were positive to the card test in their first year of life, while none were positive to the RID test. In the third month of life, 8/22 (36.4%) calves yielded positive to the RID test (TABLE 1). Based on these results, 20 samples of milk were collected from the cooling tanks in different days, from which milk to feed the cows was obtained. The milk samples were inoculated in Farrell's agar and *Brucella* agar for isolation, and the obtained isolates were identified with biochemical tests by means of violet crystal dye and agglutination with acriflavine to determine if their phenotype was rough or smooth. DNA was extracted from the obtained isolates. The DNA from *B. abortus* strains 544, and vaccine strains RB51 and S19 (PRONABIVE), previously cultured in *Brucella* agar at 37°C for 72 h, was used as reference.

To differentiate *B. abortus* strain S19 from field strain isolates, PCR was used to amplify a 361-bp product and a product of 1063 for the remaining strains. On the other hand, to eradicate the possible presence of *B. abortus* strain RB51, a 1298-pb product was amplified, while a 456-pb product was amplified in the case of other strains.

procedían de vacas positivas o negativas a *Brucella*. Los animales fueron alojados en becerrerías de intemperie hasta su destete, en promedio, a los 90 días de edad.

El hato 2, con 1 800 vacas en producción, se encontraba inscrito en la campaña nacional contra la brucelosis en los animales, promovida por la Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (Sagarpa) (NOM-041-ZOO-1995)<sup>15</sup> a partir de enero de 2009. Con base en los informes emitidos durante la campaña, se detectó una seroprevalencia de 1.94% en vacas (35/1800) mediante las pruebas de tarjeta y rivanol. Debido a la baja prevalencia de la enfermedad en este hato, se decidió realizar un estudio retrospectivo utilizando los registros oficiales de 1 170 becerras de la campaña, que incluían las pruebas de tarjeta y rivanol llevadas a cabo con los sueros de los animales menores de 3 meses de edad desde enero de 2009 hasta junio de 2010.

La extracción de ADN de los aislados y las cepas de referencia se realizó por el método de fenolcloroformo, descrita por Sambrook *et al.*<sup>18</sup> El ADN extraído (100 ng) se utilizó como molde para la PCR. Para diferenciar la cepa S19 de *B. abortus* de los aislados de campo se utilizaron los iniciadores descritos por Sangari *et al.*<sup>19</sup>, y para eliminar la posibilidad de la presencia de la cepa de *B. abortus* RB51, se usaron los iniciadores descritos por Vemulapalli *et al.*<sup>20</sup>

## Resultados

En el hato 1 se conformaron grupos de vacas positivas y de vacas negativas; de cada uno se seleccionaron las vacas que habían parido una cría hembra viva. Así, en el grupo de vacas positivas nacieron 22 becerras, de las cuales 6/22 (27.3%) resultaron positivas a la prueba de tarjeta en la primera semana de vida, mientras que mediante la prueba de IDR sólo 2/22 (9.1%) becerras resultaron positivas. Al tercer mes de vida, las mismas 6 becerras resultaron positivas mediante la prueba de tarjeta y las mismas dos becerras salieron positivas mediante la prueba de IDR (CUADRO 1).

De manera similar, en el grupo de vacas negativas nacieron 22 becerras, de las cuales 6 (27.3%) resultaron positivas a la prueba de tarjeta en la primera semana de vida, mientras que mediante la prueba de IDR no se registró ninguna becerro positiva. Al tercer mes de vida, 8/22 (36.4%) becerras resultaron positivas a la prueba de tarjeta, mientras que sólo se encontraron 4/22 (18.2%) becerras positivas mediante la prueba de IDR (CUADRO 1). Con base en estos resultados, en diferentes días se recolectaron 20 muestras de leche de los tanques de enfriamiento, de los cuales se obtenía la leche para la alimentación de las becerras; las muestras de leche fueron inoculadas en agar Farrell y agar



**CUADRO 1**

Positividad a brucelosis en becerras de una semana y de tres meses de vida, nacidas de vacas positivas o negativas, con base en las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en un hato con seroprevalencia de 21.6% (145/670) de vacas brucelosas

Positivity to brucellosis in one-week-old and three-month-old female calves, born to disease-positive or -negative cows, based on results from the card and radial immunodiffusion tests in a herd with a seroprevalence of 21.6% (145/670) in cows with brucellosis.

Group of cows	Cows n	Calves n	Calves in the first week of life		Calves in the third month of life	
			Card	RID	Card	RID
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Positive	22	22	6 (27.3)	2 (9.1)	6 (27.3)	2 (9.1)
Negative	22	22	6 (27.3)	0 (0.0)	8 (36.4)	4 (18.2)

Isolation of *B. abortus*, identified as a field strain was obtained in 100% (20/20) of the cultured samples.

In herd 1, of 44 sampled female calves born to positive or negative mothers, 6 female calves were found to be positive to *B. abortus* using the RID test. The prevalence rate was 13.6%.

In herd 2, based on the National Campaign against Animal Brucellosis, 1170 registers were obtained of female calves of less than 3 months of age, out of which 24 yielded positive to *B. abortus* with the card and rivanol tests. This amounted to a prevalence of 20.5%. There were no results for the RID test.

## Discussion

Because high sensitivity is a characteristic of the card test, it was used as the official screening test in the National Campaign against Animal Brucellosis, legally based on NOM-041-ZOO-1995. Nevertheless, this test is not reliable to differentiate vaccine antibodies or antibodies passively acquired through colostrum from those caused by the disease.<sup>5,15,17</sup>

In a study carried out by Aparicio *et al.*,<sup>14</sup> the use of the card test, together with the RID test, was proposed as screening test to considerably improve the ability to distinguish vaccine antibodies from antibodies produced by the infection. In this study it was observed that in herd 1, the group of female calves born to *B. abortus*-positive mothers, 6 (27.3%) turned out to be positive in their first week of life and in the third month of age when using the card test, while the RID test only yielded two positive results (9.1%) in disease-positive female calves of one week of life and three months of age. It may be stipulated that the card test classified 4 calves (18.2%) as false positives with respect to the RID test.

*Brucella* para el aislamiento, y los aislados obtenidos fueron identificados por pruebas bioquímicas mediante la tinción con cristal violeta y la aglutinación con acriflavina, para determinar su fenotipo: rugoso o liso. Se realizó la extracción de ADN de los aislamientos obtenidos y se utilizó como referencia el ADN de las cepas de *B. abortus* 544 y de las cepas vacunales RB51 y S19 (PRONABIVE), que habían sido cultivadas previamente en agar *Brucella* a 37°C durante 72 h.

Para diferenciar la cepa S19 de *B. abortus* de los aislados de campo, con la PCR se amplifica un producto de 361 pb y un producto de 1063 para las demás cepas, y para eliminar la posibilidad de la presencia de la cepa de *B. abortus* RB51, se amplifica un producto de 1298 pb y un producto de 456 pb cuando se trata de cualquier otra cepa.

El aislamiento de *B. abortus*, identificado como cepa de campo, se obtuvo en el 100% (20/20) de las muestras cultivadas.

En el hato 1, de una población total de 44 becerras muestreadas, nacidas de madres positivas o negativas, en los primeros tres meses de vida se encontraron 6 becerras positivas a *B. abortus* mediante la prueba de IDR, con una tasa de prevalencia de 13.6%.

En el hato 2, con base en la campaña nacional contra la brucelosis en los animales, se obtuvieron 1 170 registros de becerras menores de 3 meses de edad, de las cuales 24 becerras resultaron positivas a *B. abortus* mediante las pruebas de tarjeta y rivanol, lo cual equivale a una prevalencia de 2.05%. No se contó con los resultados de la prueba de IDR.

## Discusión

La prueba de tarjeta se ha caracterizado por tener una alta sensibilidad, por lo que fue la prueba de tamiz ofi-

In the group of female calves born to *B. abortus*-negative mothers, 6 (27.3%) were positive in the first week of life, as were 8 (36.4%) using the card test. With the RID test, no calf yielded positive results during the first week of life, although 4 (18.2%) did so at three months of age. It may be concluded that the card test classified 6 (27.3%) and 4 (18.2%) calves as false positive in their first week of life and third month of age, respectively, when compared to the use of the RID test. The OIE<sup>2</sup> has stated that ruminants do not usually present signs after their first abortion due to *B. abortus* and that they may become potential carriers when continuing to eliminate *Brucella* through their milk and uterine discharges during subsequent births.<sup>11</sup> In a study carried out by Aparicio *et al.*<sup>14</sup> in a bovine herd with brucellosis, 6 (17.1%) out of 35 cows in production yielded positive to the RID and ELISA-competitive assays. In these cows, *B. abortus* biotype 1, field strain, was isolated in milk. Isolating the *B. abortus* field strain in from the cooling tanks where the calves obtained their feed, makes it possible to hypothesize that female calves born to negative mothers were infected when consuming non-separated and non-pasteurized milk from disease-positive mothers.

Crawford *et al.*<sup>7</sup> mention in their study that bacterial concentration in the umbilical cord of two fetuses from different *B. abortus*-positive cows was  $4.3 \times 10^9$  bacteria/g and  $1.4 \times 10^{13}$  bacteria/g, constituting a source of infection for other calves born in the same place. Another possible means of infection is through the staff in charge of deliveries, since, in the case of this herd, there were no farrowing pens, no staff and no materials for negative cows as opposed to the case of positive cows.

It might be that a larger number of calves from the disease-negative cows acquired the infection within the first three months of life, compared to the group of positive cows, which was protected by the antibodies present in the colostrum.

The diagnosis of brucellosis at early ages is not made in Mexico; therefore, calves that are born or infected during lactation go unnoticed until they reach a reproductive age, which is when all the cattle in some herds undergoes serologic testing. In other herds tests are performed in case of abortions, and there are herds in which there is no interest at all in diagnosing the disease. These are some of the circumstances that hinder the control and eradication of brucellosis.

In conclusion, it is necessary to diagnose this disease in female calves from stables where brucellosis is present, in order to prevent leaving disease-positive animals in the herd, whose infection will be concealed by post-vaccine antibodies. The infection will then manifest itself in abortions during their first pregnancy, thus perpetuating the infection in the stable.

cial de la campaña nacional contra la brucelosis en los animales y está fundamentada legalmente en la NOM-041-ZOO-1995. Sin embargo, la prueba no es confiable para diferenciar los anticuerpos vacunales o los pasivamente adquiridos por medio del calostro, de los anticuerpos causados por la enfermedad.<sup>5,15,17</sup> En un estudio realizado por Aparicio *et al.*<sup>14</sup> se menciona que utilizar una prueba diagnóstica de tamiz como la de tarjeta, aunada a la prueba de IDR, mejoraría considerablemente la capacidad de distinguir los anticuerpos vacunales de los anticuerpos causados por la infección. En este estudio, en el hato 1 se puede observar que en el grupo de becerras nacidas de madres positivas a *B. abortus*, 6 (27.3%) resultaron positivas en la primera semana de vida y al tercer mes de edad con la prueba de tarjeta, mientras que la prueba de IDR sólo dio 2 resultados positivos (9.1%) en becerras positivas de una semana de vida y también al tercer mes de edad. Se puede establecer que la prueba de tarjeta clasifica a 4 becerras (18.2%) como falsos positivos con respecto a la prueba de IDR.

En el grupo de becerras nacidas de madres negativas a *B. abortus*, 6 (27.3%) resultaron positivas en la primera semana de vida y 8 (36.4%) al tercer mes de edad con la prueba de tarjeta; con la prueba de IDR ninguna becerro resultó positiva en la primera semana de vida, pero 4 (18.2%) fueron positivas al tercer mes de edad. Se puede concluir que la prueba de tarjeta clasificó a 6 (27.3%) y 4 (18.2%) becerras como falsos positivos en la primera semana de vida y al tercer mes de edad, respectivamente, con respecto a la prueba de IDR. La OIE<sup>2</sup> menciona que los rumiantes generalmente no presentan signos después de su primer aborto por *B. abortus*, y que pueden convertirse en portadores potenciales al continuar eliminando *Brucella* en la leche y en las descargas uterinas durante los partos posteriores.<sup>11</sup> En un estudio realizado por Aparicio *et al.*<sup>14</sup> en un hato bovino con brucellosis, de 35 vacas en producción, 6 (17.1%) resultaron positivas a las pruebas de IDR y ELISA-competitivo, de estas vacas se logró el aislamiento en leche de *B. abortus* biotipo 1, cepa de campo. En el presente estudio, al lograr el aislamiento de *B. abortus* cepa de campo de los tanques de enfriamiento de donde se obtenía el alimento de las becerras, se puede plantear la hipótesis de que las becerras nacidas de madres negativas se infectaron al consumir la leche de madres positivas, que no se separaba ni se pasteurizaba.

En un estudio realizado por Crawford *et al.*<sup>7</sup> se menciona que la concentración bacteriana de los cordones umbilicales de dos fetos de diferentes vacas positivas a *B. abortus* fue de  $4.3 \times 10^9$  bacterias/g y de  $1.4 \times 10^{13}$  bacterias/g, lo cual representa una fuente de infección para otras becerras que nazcan en el mismo lugar. La otra forma de posible infección es a través del personal

This premise has been demonstrated in this study carried out in a dairy stable, where the prevalence was 21.6% and the presence of *Brucella abortus* was proved by isolating field strains. It was demonstrated that of 22 female calves born to brucellosis-positive cows, 2 calves (9.1%) were seropositive in their first week of life after being tested with a high-specificity assay such as RID. These calves yielded positive again at three months of age before being vaccinated with S19. Additionally, the 22 calves that were daughters of seropositive cows were found to be seronegative in the sampling obtained during their first week of life. However, 4 of them (18.2%) were seropositive when tested with the RID test at three months of age due to the high presence of *Brucella* in the herd.

## Acknowledgements

Special thanks to MVZ Tomás Merás Nevares for his technical support in the experimental stage of this study.

## References

1. FLORES CR. Bases científicas en el uso de vacunas contra la brucelosis. Memorias del 4º Curso internacional de medicina productiva en bovinos lecheros; 2010 abril 22-24; Juriquilla (Querétaro) México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, 2010:85-90.
2. OIE, College of Veterinary Medicine Iowa State University-The Center Food Security & Public Health 2009. Brucellosis. Serial online: año mes] [Cited: 2011 February 10]. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucellosis.pdf>.
3. HERRERA E, PALOMARES G, DÍAZ AE. Milk production increase in a dairy farm under a six-year brucellosis control program. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:296-299.
4. LÓPEZ MA, PÉREZ MAE. Seroepidemiology of brucellosis in Mexico. *Salud Pública de México* 1992; 34:230-240.
5. RADOSTITS OM, BLOOD DC, GAY CC. *Veterinary Medicine*. 10th ed. London: Balliere Tindall, 2007.
6. ENRIGHT FM, NIELSEN K, DUNCAN JR. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. Boca Raton (FL): CRC Press, 1990.
7. CRAWFORD RP, ADAMS LG, FICHT TA, TEMPLETON JW, WILLIAMS JD. Effects of stage of gestation and breed on bovine responses to vaccination with *Brucella abortus* strain 19. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199:887-891.
8. CHEVILLE NF, MCCULLOUGH DR, PAULSON LR. Brucellosis in the Greater Yellowstone Area. Washington, DC: National Research Council; 1998:25.
9. OLSEN S, TATUM F. Bovine brucellosis. *Vet Clin Food Anim Pract* 2010; 26:15-27.
10. BICKETT WD, TREVINO I. Biological risk management, an overview. 2010. Memorias del 4º Curso internacional de medicina productiva en bovinos lecheros; 2010 abril 22-24; Juriquilla (Querétaro) México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, 2010:5-13.
11. OLSEN SC, THOEN CO, CHEVILLE NF, GYLES CL, THOEN CO, PRESCOTT JF *et al.* *Brucella*. Pathogenesis que atiende los partos, ya que en ese hato no se contaba con paridero, ni con personal ni con materiales para vacas negativas, distintos del de vacas positivas. Posiblemente un mayor número de becerras en el grupo de vacas negativas adquirió la infección en los primeros tres meses de vida con respecto al grupo de las vacas positivas, que estaban protegidas por los anticuerpos presentes en el calostro. En México no se realiza el diagnóstico de brucelosis a edades tempranas, por consiguiente las becerras que nacen o que se infectan en la etapa de lactancia pasan desapercibidas hasta que llegan a la edad reproductiva, cuando se realizan pruebas serológicas a todo el ganado en algunos hatos; en otros, sólo se realizan pruebas si abortan, y hay hatos en los que no se tiene ningún interés por diagnosticar la enfermedad. Éstas son algunas de las circunstancias por las que se dificulta el control y erradicación de la brucelosis. Se concluye que: es necesario realizar el diagnóstico de esta enfermedad en las becerras de establos con presencia de brucelosis, para evitar dejar animales positivos en el hato, cuya infección se ocultará con los anticuerpos posvacunales, y se manifestará al presentar aborto durante su primera gestación, perpetuando así la infección en el establo. Esta premisa se demuestra en el presente estudio realizado en un establo lechero con una prevalencia de 21.6% y con presencia de *Brucella abortus* comprobada mediante el aislamiento de cepas de campo. En él se demostró que de 22 becerras nacidas de vacas positivas a brucelosis, 2 becerras (9.1%) resultaron seropositivas a la semana de vida usando una prueba con elevada especificidad como la IDR, las mismas becerras se volvieron a presentar positivas a los tres meses de vida antes de la vacunación con S19. Adicionalmente, en las 22 becerras hijas de vacas seronegativas se encontró que eran seronegativas en el muestreo a la semana de edad, pero 4 de ellas (18.2%) se volvieron seropositivas a la prueba de IDR a los tres meses de vida debido a la elevada presencia de *Brucella* en el hato.

## Agradecimientos

Se agradece al MVZ Tomás Merás Nevares por su apoyo técnico en la parte experimental de este estudio

- of bacterial infections of animals. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2004.
12. ROOP RM, GEE JM, ROBERTSON GT, RICHARDSON JM, NG WL, WINKLER ME. *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57:57-76.
  13. BUSTAMANTE SJ, SALAZAR HF, DÍAZ AE, MANZANO CC, PÉREZ GR, HERNÁNDEZ AL. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. *Téc Pec Méx*. 2000; 38:35-42.
  14. APARICIO BA, DÍAZ AE, HERNÁNDEZ AL, PÉREZ GR, ALFONSECA SE, SUAREZ GF. Serological and bacteriological evaluation of a bovine herd infected with brucellosis and revaccinated with a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19. *Téc Pec Méx* 2003; 41(2):129-140.
  15. DOF. "Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales" Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Diario Oficial de la Federación 20 agosto 1996.
  16. DÍAZ AE, HERNÁNDEZ AL, VALERO EG. Diagnóstico de brucelosis animal. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2001.
  17. ALTON GG, JONES LM, ANGUS RD. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: Institute National de la recherche e agronomique; 1988.
  18. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning. Laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
  19. SANGARI FJ, GARCIA-LOBO JM, AGUERO J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994b Sep 1;121(3):337-42.
  20. 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 Sep;6(5):760-4.