

Vacuna Brucella abortus RB51: pasado, presente y futuro

VACUNA RB51 DE BRUCELLA ABORTUS: PASADO, PRESENTE Y FUTURO

Prof. Dr. Gerhardt G. Schurig.

Académico Correspondiente Extranjero

18 de junio de 2008

Virginia -Maryland Regional College of Veterinary Medicine,

Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, USA.

Y discurso de presentación a cargo del Académico de Número Excmo. Sr. D. Elías Fernando Rodríguez Ferri

Excmo. Señor Presidente,

Excmos. Señores Académicos,

Señoras y Señores:

La Brucelosis es una enfermedad infecciosa capaz de afectar a varias especies animales, salvajes y domésticas. Algunas especies de *Brucella* se asocian específicamente a determinados hospedadores, como *B. abortus* que afecta principalmente al bovino y *B. melitensis* que afecta principalmente al ovino y caprino. Por otro lado, la Brucelosis es una zoonosis, dado que diversas especies de *Brucella* spp. pueden afectar al hombre. La naturaleza de respuesta inmunitaria protectora, así como la patogénesis de la Brucelosis están estrechamente relacionadas con el hecho de que *Brucella* es un parásito intracelular facultativo (1).

Brucella es una bacteria Gram-negativa que puede presentar en cultivo una morfología lisa o rugosa, presentando además en algunos casos un fenotipo mucoso (2). La morfología lisa de las colonias puede convertirse espontáneamente en rugosa y en algunos casos, la morfología rugosa puede revertir al fenotipo liso. La morfología lisa o rugosa está asociada a la composición y localización de la molécula de lipopolisacárido (LPS) de rana de *Brucella*. Los organismos lisos poseen un LPS conteniendo una cadena de polisacárido "O" constituido por un homopolímero de perosamina, mientras que los organismos rugosos carecen de dicha cadena en su molécula de LPS (3, 4). Recientemente, se ha determinado claramente que las cepas rugosas pueden tener cadena-O en su LPS pero esta no se localiza en la superficie de la membrana citoplasmática (5). La cadena "O" juega un papel esencial en el diagnóstico serológico dado que es un antígeno inmunodominante capaz de inducir la producción de anticuerpos en animales expuestos a *Brucellas* de morfología lisa. La mayor parte de las pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de la infección de *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* se basan en dicha inmunodominancia por lo que detectan anticuerpos frente a la cadena "O". El LPS puede presentar un papel esencial en el proceso

de desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo celular (CMI) pero los mecanismos involucrados en dicha respuesta no han sido aún claramente definidos.

La prevención de la infección y por tanto, de la enfermedad, puede conseguirse mediante la vacunación. En general, la inducción de una respuesta inmune protectora duradera frente a parásitos intracelulares facultativos, requiere el uso de vacunas vivas o en algunos casos, la administración de múltiples dosis de antígenos protectivos junto a adyuvantes que favorezcan el mecanismo de CMI. Los mayores éxitos de vacunación en Brucelosis se han conseguido empleando vacunas atenuadas vivas derivadas de *Brucella* spp, como la cepa 19 de *B. abortus* o la cepa Rev 1 de *B. melitensis*, las cuales constituyen los ejos clásicos usados en la protección frente a *B. abortus* y *B. melitensis* respectivamente y actualmente usados en todo el mundo. En 1999, la cepa RB51 de *B. abortus* fue oficialmente introducida para prevenir la infección frente a *B. abortus* en ganado bovino debido a sus múltiples ventajas respecto a la cepa 19. Actualmente es usada en diversos países de todo el mundo, donde se ha comprobado que si se utiliza adecuadamente junto a políticas de diagnóstico y sacrificio, permite erradicar la enfermedad mucho más rápidamente que usando la vacuna tradicional con la cepa 19 de *B. abortus*. Por otro lado, el mayor problema asociado a la cepa 19 es la presencia en su superficie celular de la cadena "O" en el LPS que explica la aparición y persistencia de anticuerpos séricos después de la administración de la vacuna. Estos anticuerpos son detectados en las pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de la Brucelosis y suponen el mayor problema asociado con la vacunación empleando la cepa 19, dado que estos anticuerpos no permiten distinguir entre animales enfermos y vacunados. La aparición y persistencia de estos anticuerpos depende de la dosis, la edad a la vacunación y la ruta de administración (7). Estos problemas se evitan completamente usando la cepa RB51. Asimismo, la cepa 19, aunque se considera atenuada, posee un considerable grado de virulencia. La vacunación con la cepa Rev 1 produce problemas similares.

Por tanto, una mejor vacuna debería no inducir anticuerpos anti-"O", manteniendo por tanto los animales seronegativos después de la inmunización. Idealmente, debería ser menos virulenta que las cepas existentes y debería poder usarse en animales de cualquier edad y si se necesita, en múltiples dosis. Además, debería inducir protección frente a múltiples *Brucella* spp. La cepa RB51 cumple todos estos requisitos a excepción de la protección frente a múltiples especies de *Brucella*.

El hecho de que la cepa 45/20 de *B. abortus*, una cepa rugosa pero altamente inestable con una pequeña o nula capacidad de inducir anticuerpos anti cadena "O", pudiera inducir una protección significativa frente a la infección por *B. abortus*, indicó que los organismos rugosos podían inducir una respuesta inmunitaria protectora, sin los problemas asociados al diagnóstico previamente descritos. Por tanto, la clave era encontrar un mutante rugoso, esencialmente carente de la cadena O, estable y suficientemente atenuado. La atenuación debía ser lo suficientemente equilibrada para permitir una colonización durante unas pocas horas, necesarias para inducir la respuesta de CMI. La respuesta fue la cepa RB51, una cepa vacunal con dichas características obtenida a partir de la cepa 2308 de *B. abortus* y conseguida por el autor (8). La sigla "R" se refiere a su carácter rugoso y "B" a *Brucella*. 51 no se refiere al número de pases para seleccionar la cepa RB51, sino a la nomenclatura internacional del laboratorio usada en el momento del descubrimiento. La cepa rugosa RB51 resultó carente de la cadena "O", siendo muy estable después de múltiples pases in vitro e in vivo a través de varias especies animales (8, 9).

Debido a su falta esencial de la cadena "O", no induce anticuerpos anti- "O" detectables mediante las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de la Brucelosis independientemente de la edad, dosis y la frecuencia de las administraciones. La cepa RB51 está atenuada como indican los estudios realizados en ratones, cobayas, cabras y vacuno, donde es eliminada en un periodo relativamente corto de tiempo y presenta un muy reducido o nulo carácter abortigénico (8,10,11,12). Por otro lado, posee un carácter protectivo similar o mejor al inducido por la cepa 19 (13,14,15,16). En el modelo murino, se indica que la inmunidad protectora inducida por la cepa RB51 es de carácter únicamente celular, dado que la transferencia pasiva de anticuerpos inducidos por RB51 no induce protección, mientras que sí lo induce la transferencia adoptiva de células T (17, 18). Por lo tanto, parece que la vacunación con RB51 induce de forma específica la destrucción de los macrófagos infectados por parte de las células T citotóxicas. El vacuno gestante puede ser vacunado de forma segura por vía subcutánea con 10⁹ células de RB51 sin inducir abortos o placentitis (10). Finalmente, la naturaleza exacta de la mutación no se comprende de forma completa, a pesar de que RB51 posee una excelente estabilidad. RB51 posee una alteración en el gen *wboA* (5) y en varios genes más aún por definir, relacionados con el montaje y transporte intracelular de la molécula de LPS.

Se sabe que la inmunidad inducida por las vacunas puede colapsarse si la infección con una cepa virulenta se intenta, por lo que la eficacia de la vacuna se reduce si la carga infectiva se intenta. Para evitar este riesgo potencial existente en establos muy infectados, se desarrolló un método para mejorar la eficacia de RB51 sin afectar sus características básicas definidas anteriormente. Ha nacido el concepto de sobre-expresión homóloga para la mejora de la inmunidad protectora. La sobre-expresión homóloga es la sobre-expresión de antígenos por parte de la cepa vacunal con el fin de inducir una mayor y más efectiva respuesta inmunitaria frente al organismo infeccioso. Esto puede ser conseguido introduciendo un plásmido dentro de la cepa RB51 con el gen que codifica para el antígeno sobre expresado, junto a unos promotores adecuados. Nosotros probamos este concepto mediante la sobre expresión del antígeno Cu/Zn SOD (super-óxido-dismutasa). En ratón se ha observado claramente que la sobre-expresión de Cu/Zn SOD determina una mejor protección frente a la infección experimental por *B. abortus* indicando que la sobre-expresión homóloga puede producir una mejor vacuna RB51 (19). Se ha observado posteriormente en estudios comparativos usando el gen *whoA* que RB51 podría sobre-expresar LPS liso (LPS con cadena "O") localizándose en el citoplasma sin convertirse en lisa y sin cambiar su atenuación (5). Posteriores experimentos de protección realizados en ratón con la cepa RB51 sobre-expresando conjuntamente los antígenos SOD y "O" mostraron que esta cepa puede generar una protección altamente significativa frente a la infección por *B. abortus*, igual o mejor que la inducida por Rev1, contra la infección con *B. melitensis* (20). Esto muestra que una vacuna RB51 con una efectividad mejorada frente a la infección por *B. abortus* y capaz de proteger significativamente frente a la infección por *B. melitensis*, podría estar disponible para proteger a bovinos, caprinos y posiblemente ovinos frente a la infección por *B. abortus* y *B. melitensis* sin introducir resultados positivos en la serología y permaneciendo altamente atenuado. Esta nueva cepa de RB51 puede construirse con plásmidos sin marcadores de resistencia a antibióticos.

Dicha vacuna, está siendo actualmente probada en vacuno y caprino y podría estar disponible comercialmente en un futuro próximo. Finalmente también puede desarrollarse

mediante la expresión heteróloga de antígenos en la cepa RB51 capaz de inducir una fuerte protección frente a diversas especies de *Brucella* y capaz de proteger frente a otras enfermedades no relacionadas (21). La construcción de una vacuna RB51 frente a *N. caninum* es una demostración de esto (22). Actualmente se están desarrollando vacunas RB51 similares capaces de proteger frente a tuberculosis y paratuberculosis.

Referencias

1. Cheers, C. 1984. *Dev. Biol. Stand.* 56:237
2. Meyer, E.M. 1990. In: *Animal Brucellosis*. K. Nielson & J.R. Duncan, editors. CRC Press. 1-17.
3. Caroff, M. et al. 1984. *Infect. Im.* 46:384.
4. Moreno, E. et al. 1984. *Infect. Im.* 43:779.
5. Veapalli, R. et al. 2000. *Infect. Im.* 68:3927-3932
6. Diaz, R. et al. 1995. *Jn. Bacteriol.* 96:893-901
7. Nicoletti, P. 1990. In: *Animal Brucellosis*. K. Nielson & J.R. Duncan, editors. CRC Press 284-296.
8. Scig, G.G. 1991. *Vet. Microbiol.* 28:171-188.
9. Colby, L. 1997. MS Thesis. Virginia Tech, Blacksburg VA.
10. Palmer RM et al. 1997. *Am. J. Vet. Res.* 58:472-477.
11. Roop, R.M. et al. 1995. *Res. Vet. Science.* 51:359-363.
12. Zambrano, A. J. et al. 1995. *Archivos de Medicina Veterinaria*.
13. Cheville, N. F. et al. 1993. *Amer. Jn. Vet. Research.* 53:1881-1888.
14. Cheville, N.F. et al. 1996. *Amer. Jn. Vet Research.* 57:1153-1156.
15. Lord, VR. et al. 1998. *Am. J. Vet. Res.* 59:1016-1020
16. Poester, FP. et al. 2006. *Vaccine* 24:5327-5334
17. Bagchi, T. 1990. M. S. Thesis, Virginia Tech, Blacksburg, VA. 24061
18. Jimenez de Bas, M. P. et al. 1994. *Infect. Im.* : 62:4990-4996.
19. Veapalli, R. et al. 2000. *Infect. Im.* : 68:3286-3289
20. Veapalli, R. 2004. *Vet Micro.* : 102:237-245.
21. Vemulapalli, R. et al. 2000. *Infect. Immun.* 68:3290-3296
22. Veapalli, R. et al. 2007. *Vet. Parasitology* : 148:219-230.

PRESENTACIÓN DEL DR GERHARDT G. SCHURIG ACADÉMICO CORRESPONDIENTE EXTRANJERO

Excmo. Sr. D. Elías F. Rodríguez Ferri Académico de Número

Excmo. Sr. Presidente

Señoras y Señores Académicos

Señoras y Señores

Constituye para mí un honor, en nombre de la Real Academia de Ciencias Veterinarias, proceder a la presentación del Dr. Gerbhardt G. Schurig en su toma de posesión como Académico Correspondiente Extranjero de esta Docta Institución. El Dr. Schurig es una personalidad internacionalmente reconocida, que ha dedicado su vida al trabajo e investigación en aquello que más y mejor sabe hacer: el estudio de las enfermedades infecciosas animales. Por esta razón, entre otras, su incorporación a la Real Academia de Ciencias Veterinarias constituye un acierto que enriquece su nómina y para este Académico la oportunidad de presentar sus múltiples méritos personales, académicos y científicos, si quiera sea brevemente.

El Dr. Gerbhardt G. Schurig nació un día de diciembre, allá por mediados del siglo pasado, en Santiago, una de las urbes más populosas de América Latina y el corazón de Chile. Seguro que desde su casa natal podía divisarse en su niñez, como ahora, las impresionantes cumbres de los Andes próximos y desde allí se gestaron muchos de los proyectos e ilusiones que la vida le ha ido permitiendo cumplir paso a paso en distintas etapas de su existencia.

Toda su etapa de formación transcurrió en su Chile natal. En 1970 se licenció y obtuvo el Grado en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de Santiago, una de las más antiguas de América. La Escuela de Veterinaria de Santiago fue creada en 1898 por iniciativa del Ejército (Escuela Militar de Veterinaria) solo 5 años después del nacimiento de la Escuela de Veterinaria de Buenos Aires, la más antigua de Sudamérica. Después de Buenos Aires, México, Guelph y Cornell, es la Escuela de Veterinaria más antigua de América (la 5ª más antigua).

Su vocación universitaria por la docencia e investigación es ciertamente precoz pues sin pérdida de tiempo, se vincula desde el mismo momento de su licenciatura a tal actividad en una carrera que nunca abandonará. Docencia e Investigación han constituido desde el principio, el eje de su vida profesional y el elemento consustancial con su actividad personal.

Recién licenciado y después de un corto periodo de 2 años en el que desempeñó el puesto de Profesor Ayudante de Fisiología con tareas de docencia e investigación, inspector veterinario de carnes y algunas ocupaciones como clínico de pequeños animales (en guardias nocturnas), el Dr. Schurig inició su periplo norteamericano del que ya no se ha desvinculado jamás. En la actualidad posee la doble nacionalidad.

Tras una estancia como Ayudante de Investigación en la Universidad de Cornell, en Nueva York (1971-76), donde obtiene el Doctorado en Inmunología y Bacteriología Patogénica, se traslada al Departamento de Ciencia Veterinaria de la Universidad de Wisconsin (Madison) donde permaneció por espacio de 4 años (1978-82), hasta que es propuesto primero como Profesor Ayudante y Asociado después, de Medicina Veterinaria, en el Departamento de Ciencia Veterinaria de la Universidad de Virginia, en Blacksburg, en lo que sería su destino definitivo. Ya nunca abandonará esta pequeña localidad universitaria, asiento del Virginia Polytechnic Institute and State University, mejor conocido como Virginia Tech, un complejo universitario al más puro estilo americano, que tiene en sus departamentos de Agricultura, Forestal y Medicina Veterinaria, una de sus señas de identidad mejor conocidas. Virginia Tech saltó en abril del pasado año a las primeras páginas de los medios de comunicación por el trágico suceso que costó la vida a más de 30 personas en la jornada más aciaga de su corta historia.

En 1984 fue nombrado Profesor Asociado y Jefe del Departamento de Biología Veterinaria y Ciencias Clínicas en el que permaneció hasta 1986, al ser nombrado Profesor y Jefe del nuevo Departamento de Biociencias Veterinarias. En 1987 fue designado Director del Centro para la Medicina Molecular y Enfermedades Infecciosas, que mantuvo hasta 1996 en que se incorporó como Director del Programa Internacional de su 'Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine' a la que sigue permaneciendo fiel y, asimismo, Director del Centro colaborador de la OMS para la Educación Veterinaria y Salud Pública. En 2001 fue nombrado Decano Adjunto para Investigación y Estudios de Grado y, finalmente, desde 2004 es Decano del prestigioso centro americano al que ha dedicado 30 años de su vida.

No cabe duda que los recursos de prevención inmune en las enfermedades infecciosas de los animales han representado siempre un motivo de atracción especial para nuestro Académico, como lo prueba su trabajo doctoral basado en la utilización de inmunización sistémica para la erradicación de la vibriosis genital bovina, un problema muy importante de su Chile natal y otros lugares de Sudamérica.

Precisamente donde el Dr. Schurig se ha encontrado siempre más cómodo ha sido en la enseñanza de la Inmunología Veterinaria, a la que lleva dedicado ininterrumpidamente desde 1989.

La actividad académica desarrollada, especialmente entre 1978 y el presente, es continua, comprometida con la formación de los estudiantes de Veterinaria, contabilizándose no menos de 30 tipos de diferentes actividades en las que asumió responsabilidades y fue dejando huella de su trabajo. Destaca su etapa de director del Centro de Medicina Molecular y Enfermedades Infecciosas, reconvertido desde los antiguos Laboratorios de Investigación en Microbiología, al que imprimió un enorme impulso en distintos campos (virología, bacteriología-micología, inmunología, parasitología y enfermedades de las aves y los peces) convirtiéndole en la unidad de investigación más productiva de su Universidad y la mejor dotada, incluyendo una planta-laboratorio de nivel 3.

En la Universidad de Virginia, el Dr. Schurig es un destacado y activo representante en cuya estructura ha participado en numerosas comisiones (bienestar animal, radioisótopos, biotecnología, etc., así como en otras relacionadas con los estudios de grado y las encargadas de la elaboración de criterios, requisitos y política académica).

Su actividad y responsabilidades se proyectan también en el plano nacional e internacional. En el primero destacan sus participaciones como Secretario y Presidente de Proyectos, Presidente y Adjunto en reuniones, conferencias, comités, etc., en particular en relación con brucelosis, uno de los campos a los que ha dedicado atención especial y en los que ha cosechado éxitos reconocidos internacionalmente, a la vez que un reputado prestigio. En el plano internacional, igualmente, son muy destacables sus innumerables intervenciones como revisor de proyectos, consultor de la FAO (Brasil, China, etc.), coordinador de proyectos de las Naciones Unidas para América Latina, organizador de cursos internacionales (especialmente sobre brucelosis) y, en suma, invitado conferenciante por organizaciones como la FAO, OMS, PAHO en la práctica totalidad de países sudamericanos.

Un análisis breve de su actividad investigadora resulta difícil. Solamente considerando su condición de investigador principal desde 1979 supera los 25 proyectos y un montante de financiación de más de 3 millones de dólares, cifra similar a la que supone su participación como colaborador en otros 12 proyectos, principales.

Es inventor en 3 patentes relacionadas con su actividad más conocida, el desarrollo de una vacuna viva para el control de la brucelosis bovina. En 1991 en los EE.UU., el Dr. Gerhardt Schurig descubrió la cepa RB-51, un mutante rugoso de *Brucella abortus* que carece de cadenas O en el LPS a partir de la cual se produjo una vacuna viva utilizable en la inmunización de los bovinos frente a la brucelosis como parte de los programas de control y erradicación. En 1996 se aprobó su uso en los EE.UU. y en la actualidad es considerada vacuna oficial en USA, Chile y México, utilizándose también en Argentina, Venezuela y Colombia. En USA y México no se acepta otro tipo de vacuna para la vacunación de terneras o vacas adultas y la utilización de Cepa B-19 está prohibida. En el caso de México, es posible la utilización de ambas vacunas, aunque la B-19 prácticamente no se utiliza. En España ha sido utilizada con éxito, sola o conjuntamente con B-19 en los recientes brotes de brucelosis bovina en ganado extensivo en las comunidades autónomas de Extremadura y Castilla y León. La protección que brinda la RB-51, es similar a la B-19, pero no induce anticuerpos aglutinantes debido a su condición de rugosa, con lo que resuelve el problema de interferencia diagnóstica que se produce en la vacunación con cepas lisas.

Entre 1973 y el presente, el Dr. Schurig ha publicado un total de 108 artículos en revistas incluidas en el JCR (índices de impacto) de los que 78 corresponden a temática sobre brucelas y 33, se refieren específicamente a distintos aspectos de la cepa RB-51.

El Dr. Schurig ha presentado un total de 150 ponencias y comunicaciones en congresos, nacionales e internacionales en los que su presencia es requerida como aval de calidad, en todo lo que se refiere al complejo mundo de las bacterias del género *Brucella* y sus sistemas de control por inmunización.

El Dr. Schurig pertenece a múltiples sociedades científicas y profesionales. Es miembro de Asociación Escuelas de Veterinaria Americanas a cuyo comité ejecutivo pertenece desde el pasado año, de la Asociación Americana de Inmunólogos Veterinarios, de la Conferencia de Investigadores en Enfermedades Infecciosas Animales, de la Asociación Americana para el Avance de las Ciencias, de la Academia de Ciencias de Nueva York, de la Academia de Ciencias de Virginia, de la Sociedad Americana de Microbiología, de la Asociación de Sanidad Animal de los Estados Unidos y de las Asociaciones Médicas Veterinarias de Virginia y Americana. Igualmente, el Dr. Schurig es miembro de las sociedades científicas

Sigma Xi y Phi Zeta-Chi; la primera fue fundada en 1886 en los EE.UU. y está dedicada a promover la excelencia en la investigación científica y un sentido de solidaridad y colaboración entre los investigadores en todos los campos de las ciencias e ingenierías. Es, igualmente miembro de la Fraternidad Phi Zeta-Chi, una asociación multicultural muy al uso americano.

A lo largo de su vida profesional ha recibido numerosas distinciones, entre las que destaca el Premio a la Excelencia Docente de la Universidad de Virginia (College of Veterinary Medicine) en 1982, el Premio Beecham a la Excelencia en Investigación (en 1986) o la condición de Profesor Extraordinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias en la Universidad Austral de Chile, en 2002.

Podríamos resumir, para finalizar, que el Dr. Schurig, nuevo Académico de esta Real Academia de Ciencias Veterinarias, ha alcanzado plenitud como docente, gestor universitario e investigador, en base a un trabajo riguroso, científico, innovador y extremadamente rico en ideas en su permanente propósito de lograr la erradicación de enfermedades infecciosas como la brucelosis, un propósito al que se ha mantenido fiel a lo largo de su vida profesional.

Excmo. Sr. Presidente, Señoras y Señores Académicos

El Dr. Gerbhardt G. Schurig, nuestro nuevo Académico, constituye sin duda alguna un modelo en los distintos perfiles de su personalidad: docente, gestor e investigador, expresión de su condición de trabajador, estudioso del mundo de las enfermedades infecciosas y organizador de la enseñanza veterinaria. La Real Academia de Ciencias Veterinarias tiene sobrados motivos para felicitarse por este ingreso, un aval de su creciente calidad y propósitos de mejora permanente. Por mi parte, en nombre de esta prestigiosa Institución, a la que nos sentimos muy honrados en pertenecer y en el mío propio, le damos la más cordial bienvenida. Dr. Schurig, sea Vd. bienvenido a la Real Academia de Ciencias Veterinarias.

Muchas gracias

BRUCELLA ABORTUS VACCINE RB51: PAST, PRESENT AND FUTURE.

Prof. Dr. Gerhardt G. Schurig. Académico Correspondiente Extranjero Madrid (Spain) 2008-06-18

Virginia -Maryland Regional College of Veterinary Medicine,
Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, USA.

Animal Brucellosis is an infectious disease affecting various domestic and wild life animal species. Several species of *Brucella* exist which are associated with predominant hosts like *B. abortus* affecting mainly cattle and *B. melitensis* principally affecting goats and sheep. Several of the *Brucella* spp can infect humans making Brucellosis a zoonotic disease. *Brucella* is a facultative intracellular parasite; the pathogenesis of Brucellosis and the nature of the protective immune response is strongly related to this fact (1).

Brucella is a gram negative bacterium and can present itself upon culture with a smooth or rough colony morphology with some presenting a mucoid phenotype (2). It is possible for smooth colonies to spontaneously become rough and some rough *Brucella* can revert to the smooth morphology. Tightly associated with the the rough vs smooth morphology is the composition and the location of the lipopolysaccharide (LPS) molecule of *Brucella*; smooth organisms have a LPS molecules containing a polysaccharide "O" chain made from a homopolymer of perosamine while rough organisms lack this chain on their LPS molecule (3,4). Recently, it has become clear that rough strains can have O-chain as long as this chain is not on its surface (5). The O-chain plays a central role in the serological diagnosis of Brucellosis since it is an immunodominant antigen able to induce antibody responses in most animals exposed to smooth *Brucella* organism. Based on this immunodominance, most serological tests used in diagnosing an infection with *B. abortus*, *B. melitensis* or *B. suis* are based on the detection of antibodies to the O-chain (6). LPS may play a direct or indirect role in the elicitation of protective cell mediated immune (CMI) responses but the mechanisms involved remain obscure.

Prevention of infection and therefore disease, can be achieved with vaccines. As a general rule, induction of an effective, long lasting protective immune response to facultative intracellular parasites requires the use of live vaccines or in some cases the use of multiple injections of appropriate protective antigens in the presence of adjuvants which favor the development of CMI mechanisms. In Brucellosis the most successful vaccines have been those using attenuated, live derivatives of *Brucella* spp. and among those, *B. abortus* strain 19 and *B. melitensis* strain Rev 1 are classical ones which are still used worldwide to protect against infection with *B. abortus* and *B. melitensis* respectively. In 1996, *B. abortus* strain RB51 was officially introduced in the USA as the vaccine to prevent *B. abortus* infection in cattle because of its multiple advantages over strain 19. It is now being used in many countries worldwide. If used appropriately in conjunction with a test and slaughter policy, it is possible to eradicate the disease much faster than using the traditional strain 19 vaccine,

The major probwith strain 19 is the presence of LPS with an O-chain on its surface which explains the appearance and persistence of antibodies in serum following administration of this vaccine. These antibodies are detected in the serological assays used for the

diagnosis of Brucellosis and are the major prob associated with strain 19 vaccination since they prevent easy differentiation of vaccinated from infected cattle. Appearance and persistence of these antibodies depends on age, dose and route of vaccination (7); this prob is completely avoided with the use of RB51. Strain 19, although considered attenuated, has a considerable degree of virulence. Similar prob exist with vaccine *B. melitensis* strain Rev1.

An improved *Brucella* vaccine would not induce anti-O antibodies and therefore, would keep animals seronegative after immunization. Ideally, the vaccine would be less virulent than the existing vaccines, could be used in animals at any age and if needed, multiple times. Further, it should induce protection against multiple *Brucella* spp. All this was accomplished with strain RB51 except the ability to give protection against multiple *Brucella* spp.

The fact that *B. abortus* strain 45/20, a rough but highly unstable organisms with little or no ability to induce anti O-chain antibodies, could induce significant protection against infection with *B. abortus* indicated that rough organisms could be used to induce protective immune responses avoiding the diagnostic prob enunciated before. The trick was to find a rough mutant which would be essentially devoid of O-chain, be stable and also sufficiently attenuated. Attenuation still needed to allow colonization but only for a few weeks since a transient colonization is necessary to induce a protective CMI response. Strain RB51, a vaccine strain with such characteristics was originated from *B. abortus* strain 2308 by the author (8). "R" standing for "rough" and "B" for *Brucella*; 51 does not stand for the number of passages which were necessary to select strain RB51; it refers to an internal laboratory nomenclature used at the time it was derived. Strain RB51 turned out to be essentially devoid of the O-chain, its roughness being very stable after multiple passages in vitro and in vivo through various species of animals (8,9). Due to its essential lack of O-chain, it does not induce anti-O chain antibodies measurable by serological tests used in the diagnosis of Brucellosis regardless of age, dose or frequency of injections. Strain RB51 is attenuated as indicated by studies carried out in mice, guinea pigs, goats and cattle where it is cleared in a relatively short time and has no or highly reduced abortifacient characteristics (8,10,11,12). When used in single vaccination protocols its protective effect in cattle is similar or better the one induced by Strain 19 (13,14,15,16). The mouse model indicates that the protective immunity induced by strain RB51 is solely T cell mediated since passive transfer of RB51 induced antibodies does not protect while adoptive T cell transfer does (17,18). It appears that specific cytotoxic T cells able to kill *Brucella* infected macrophages are induced by vaccination with strain RB51. Pregnant, cattle can be safely vaccinated sc with 10⁹ RB51 organisms without the induction of abortions or placentitis (10). Finally, although RB51 has an excellent record of stability, the exact nature of the mutations is not fully understood. RB51 has an alteration in its *wboA* gene (5) and in some additional undefined gene(s) dealing with assembly and transport of the LPS molecule.

It is known that the immunity induced by vaccines can be overwhelmed if the challenge with a virulent strain is increased; the efficacy of a vaccine will therefore be reduced as the challenge increases. In order to overcome these this challenge potentially existing in highly infected herds, we developed a method of improving the efficacy of strain RB51 without

affecting its basic advantageous characteristics defined above. The concept of homologous over-expression for the enhancement of protective immunity was born. Homologous over-expression is the over-production of a protective antigen by the vaccine strain in order to induce a stronger and more effective immune response against the infectious organism. This can be achieved by introducing a plasmid into strain RB51 with the gene coding for the antigen to be over-expressed and appropriate promoters. We tested this concept by over-expressing Cu/Zn SOD. It was clearly demonstrated in mice that the over-expression of Cu/Zn SOD by RB51 led to better protection against challenge with *B. abortus* indicating that homologous over-expression can produce a better RB51 vaccine (19). It was later demonstrated in competition experiments using *wboA* that RB51 would over-express smooth LPS (LPS with O-chain) localized in its cytoplasm without becoming smooth and without changing its attenuation (5). Further protection experiments carried out in mice in which RB51 over-expressed SOD and O antigen together demonstrated that this strain can generate sterile immunity against *B. abortus* infection and highly significant protection, equal or better than the immunity induced by strain Rev1, against challenge with *B. melitensis* (20). This demonstrates that an RB51 vaccine with enhanced effectiveness against *B. abortus* challenge and able to significantly protect against *B. melitensis* challenge can be made available to protect cattle, goats and possibly sheep against *B. abortus* and *B. melitensis* infections without inducing positive serology and being highly attenuated. This new RB51 strain can be constructed with a plasmid with no antibiotic resistance markers (recently developed in our laboratory – unpublished). This vaccine is currently being tested in cattle and goats and may become available commercially in the near future. Finally an RB51 strain able to induce strong protection against multispecies *Brucella* and able to protect against diseases unrelated to *Brucella* can also be developed by expressing heterologous antigens in RB51 (21). A demonstration of this has been achieved by constructing an RB51 vaccine able to protect against *N. caninum* (22). Similar RB51 vaccines protecting against tuberculosis and paratuberculosis as well as other diseases are being developed.

References.

1. Cheers, C. 1984. *Dev. Biol. Stand.* 56:237
2. Meyer, E.M. 1990. In: *Animal Brucellosis*. K. Nielson & J.R. Duncan, editors. CRC Press. 1-17.
3. Caroff, M. et al. 1984. *Infect. Im.* 46:384.
4. Moreno, E. et al. 1984. *Infect. Im.* 43:779.
5. Veapalli, R. et al. 2000. *Infect. Im.* 68:3927-3932
6. Diaz, R. et al. 1995. *J. Bacteriol.* 96:893-901
7. Nicoletti, P. 1990. In: *Animal Brucellosis*. K. Nielson & J.R. Duncan, editors. CRC Press. 284-296.
8. Scig, G.G. 1991. *Vet. Microbiol.* 28:171-188.
9. Colby, L. 1997. MS Thesis. Virginia Tech, Blacksburg VA.

10. Palmer RM et al. 1997. Am. J. Vet. Res. 58:472-477.
11. Roop, R.M. et al. 1995. Res. Vet. Science. 51:359-363.
12. Zambrano, A.J. et al. 1995. Archivos de Medicina Veterinaria.
13. Cheville, N.F. et al. 1993. Amer. Jn. Vet. Research. 53:1881-1888.
14. Cheville, N.F. et al. 1996. Amer. Journ. Vet Research. 57:1153-1156.
15. Lord, VR. et al. 1998. Am. J. Vet. Res. 59:1016-1020
16. Poester, FP. et al. 2006. Vaccine 24:5327-5334
17. Bagchi, T. 1990. M.S. Thesis, Virginia Tech, Blacksburg, VA. 24061
18. Jimenez de Bas, M. P. et al. 1994. Infect. Im. 62:4990-4996.
19. Veapalli, R. et al. 2000. Infect. Im. 68:3286-3289
20. Veapalli, R. 2004. Vet Micro. 102:237-245.
21. Vemulapalli, R. et al. 2000. Infect. Immun. 68:3290-3296
22. Veapalli, R. et al. 2007. Vet. Parasitology 148:219-230.