

EVALUACION SEROLOGICA DE LA VACUNA RUGOSA *rfbK* DE *Brucella abortus*, EN UN HATO DE BOVINOS CON BRUCELOSIS^a

Juan Luis Pérez Pérez^b
Efrén Díaz Aparicio^{c,d}
Rafael Pérez González^e
Garry L. Adams^f
Francisco Suárez Güemes^d

RESUMEN.

Pérez P.J.L., Díaz A.E., Pérez G.R., Adams G.L., Suárez G.F. *Tec. Pecu. Méx.* 1999;37(2)1-9. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inducida por la vacuna *rfbK* de *Brucella abortus* cepa rugosa mutante por transposición, en un hato con brucelosis. La vacuna se aplicó por vía subcutánea y a la dosis de 1×10^9 unidades formadoras de colonias por ml, a 16 becerras negativas a brucelosis. Se tomaron muestras para análisis serológicos hasta los 10 meses posvacunación y después de dos años, para las pruebas con antígenos lisos, pruebas de ELISA y aglutinación lenta en tubo con antígeno rugoso. La inmunidad celular se determinó a los 12 meses posvacunación con un extracto proteico de *Brucella*. En las pruebas con antígeno rugoso se observó que el mayor título de anticuerpos se presentó a los 30 días posvacunación, manteniéndose hasta 90 días posvacunación, y fue decreciendo hasta los 10 meses. El 100% del grupo vacunado no presentó reacción a las pruebas serológicas con antígeno liso. El total de los animales vacunados reaccionó al brucelergeno; en el grupo control negativo no hubo reacción de tipo celular.

PALABRAS CLAVE: Brucelosis, Bovinos, Vacunas rugosas, *rfbkK*

INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad que genera grandes pérdidas y en la salud

pública numéricamente hablando, es la zoonosis más importante del país (1).

a Recibido el 12 de abril de 1999 y aceptado para su publicación el 18 de enero de 2000.

b Este trabajo forma parte de la tesis de licenciatura del primer autor.

c Proyecto Brucelosis. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. SAGAR.

d Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

e Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

f College of Veterinary Medicine. Texas A&M University

Tradicionalmente la inmunización del ganado bovino en México se ha realizado con la cepa 19, sin embargo, actualmente se ha utilizado preferentemente la cepa rugosa RB51. Acerca de la cepa 19 se han señalado experiencias con la dosis reducida, encontrando que la vacunación induce una protección efectiva al ganado y no ocasiona abortos en más del 1% de los animales vacunados (2). Bajo condiciones experimentales, la inmunización del ganado vacuno con cepa 19 protege aproximadamente al 70% de los animales contra un desafío con una dosis de cepas

Correspondencia: Efrén Díaz Aparicio Proyecto Brucelosis. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria. INIEAP. SAGAR. Apartado Postal 41-682, México, 11001, DF.

virulentas de *B. abortus* (3). Bajo condiciones de campo, la cepa 19 produce una protección ocasionalmente superior al 70% (2).

La cepa 19 induce permanencia de aglutininas en suero y leche, y puede dar resultados falsos positivos, ya que los anticuerpos son la base para las pruebas serológicas que comúnmente se emplean en el diagnóstico de la brucelosis, y por lo tanto, interfiere con el diagnóstico de la enfermedad. Los anticuerpos que se detectan para realizar el diagnóstico son principalmente dirigidos contra la cadena O, la cual se encuentra en las brucelas lisas. Además de los problemas de diagnóstico causados por la seroconversión de los animales vacunados, la cepa 19 presenta otras características indeseables, como su capacidad de infectar a los humanos y ocasionar una infección persistente en algunos de los animales vacunados (4,5).

Hace años, se inició la evaluación de varias mutantes derivadas de *B. abortus*; un criterio de selección fue encontrar una mutante carente de la cadena O, que debía sobrevivir dentro del animal por unas pocas semanas posinoculación, y que la falta de síntesis de cadena O por la mutante debía evitar la seroconversión. Una de estas cepas mutantes es la RB51, obtenida a partir de varios pases de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, en medios de cultivo conteniendo antibióticos. La RB51 es altamente atenuada y estable *in vivo*; diversos pases hechos en ratones y rumiantes demostraron que no había reversión hacia la morfología lisa; este hecho fue comprobado en estudios *in vitro* (6).

A través del método de mutagénesis por transposición, se ha establecido un sistema para definir factores de virulencia y para desarrollar cepas avirulentas de *Brucella*, al usar el transposón Tn5 y anticuerpos monoclonales anti-cadena O se han producido una serie de mutantes de *B. abortus* a partir de la cepa 19 y cepa 2308, las cuales se escogieron por ensayos de sobrevivencia en macrófagos *in vitro* (7). De estas cepas mutantes no lisas, algunas tienen la característica de presentar infección residual en el bazo de ratones, lo cual es similar a la cepa 19, pero no producen reacción cruzada con los anticuerpos anti-cadena O (7).

Estudios en macrófagos de bovinos, demostraron que estas dos cepas mutantes sobreviven intracelularmente de manera similar a la cepa 19, y en estudios *in vitro*, no se encontró reversión a la virulencia o a la morfología lisa; de forma similar en estudios realizados en animales de laboratorio, no se ha revelado reversión a la virulencia (8). Una de estas cepas mutantes, es la *rfbK*, la cual fue desarrollada y evaluada en la Universidad de Texas A&M, donde fue inoculada en ganado vacuno bajo condiciones de laboratorio, quedando demostrada su capacidad inmunogénica ante posteriores desafíos, además de no presentar reacción cruzada en las pruebas serológicas convencionales (8).

Los transposones son elementos compuestos móviles, que contienen secuencias de inserción apareadas que colindan con otras regiones genéticas; las secuencias de inserción son segmentos cortos de DNA, de unos 1000 nucleótidos,

que se pueden integrar en sitios específicos en el genoma. Las secuencias de inserción se encuentran tanto en el DNA del cromosoma como en el del plásmido, así como en ciertos bacteriófagos. Si el sitio de inserción para un elemento de transposición está dentro de un gen bacteriano, la inserción del transposón dará por resultado la pérdida de la continuidad lineal del gen, dando lugar a una mutación; la selección de células resistentes a los antibióticos después de la transposición, se puede usar para el aislamiento de una amplia variedad de mutantes (9).

El objetivo de este trabajo fue evaluar, en becerras Holstein de un hato con problemas de brucelosis, la protección conferida por la vacunación de *B. abortus* con la cepa rugosa *rfbK*.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron 16 becerras de la raza Holstein con una edad entre cuatro y seis meses de edad, las cuales resultaron negativas a la prueba de tarjeta; dichos animales pertenecían a un establo localizado en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Este hato dedicado a la producción de leche y sus derivados, contaba con 90 bovinos, de los cuales 35 estaban en producción y el resto eran el reemplazo del hato en sus diferentes etapas. El establo se encuentra localizado en una zona endémica de brucelosis, y al iniciar el experimento existía una prevalencia del 8%. Los bovinos vacunados convivieron constantemente con el resto del hato durante la realización del trabajo, y se

mantuvieron en las mismas condiciones de estabulación como se tenían antes de la vacunación.

Muestreo. Las becerras fueron evaluadas mediante las pruebas serológicas de tarjeta y rivanol el día 0, para comprobar que no poseían anticuerpos contra la brucelosis y posteriormente fueron vacunadas. Se realizaron muestreos serológicos a los 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 300 días posvacunación. Debido a que no podían dejarse bovinos lecheros sin vacunar, el grupo control negativo constó de 10 bovinos machos productores de carne, negativos a brucelosis, que estaban en las mismas instalaciones.

Dos años después de la vacunación se realizó otro muestreo serológico, y se determinó la condición reproductiva de las vacas, vacunadas como becerras.

Preparación de la vacuna. En medio de agar brucela (Bioxon), se sembró la cepa *rfbK* a partir de un cultivo madre, se incubó en condiciones de 5-10% de CO₂ por 48 horas a 37°C y se cosechó con una solución amortiguadora de fosfatos con un pH de 7.2. Posteriormente se realizó el recuento de gérmenes viables a través del método de Miles y Misra (10); con este método y la medición de la transmitancia de la suspensión bacteriana, se realizaron los cambios necesarios para ajustarla a una concentración de 1 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (ufc) por ml. Obtenida la concentración requerida, se efectuaron pruebas de inspección: tinción de las placas con cristal violeta, prueba de aglutinación con acriflavina, además de la prueba de ausencia de gérmenes

contaminantes y el recuento de gérmenes viables (10).

Vacunación. El inóculo fue elaborado el mismo día de la vacunación, se mantuvo en refrigeración durante el traslado y se aplicó a las becerras por vía subcutánea, en la región axilar, a dosis de 1×10^9 ufc/ml.

Pruebas diagnósticas. Para la realización de las pruebas serodiagnósticas para detectar anticuerpos contra brucelas lisas de tarjeta y rivanol, se emplearon los antígenos comerciales elaborados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (10). Para la prueba de ELISA Indirecto, se utilizó un antígeno rugoso con células completas irradiadas. El paquete celular se obtuvo a partir de inoculación de un cultivo madre de la cepa mutante rugosa de *B. abortus*, en botellas de Roux que se incubaron por 48 h a 37°C. Las bacterias fueron cosechadas con solución salina, y se realizó el ajuste al 4% de concentración celular, siendo irradiadas a una dosis de 1.0 megarads en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (11). La prueba de ELISA se realizó sobre microplacas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano; tras una titulación previa, se empleó la dilución del antígeno de 1:64, en solución amortiguadora de carbonatos (0.06 M, pH de 9.6). La adsorción del antígeno se consiguió incubándolos por 24 h a 37°C y posteriores lavados con solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.05%, se sellaron las placas y se guardaron a 4°C (12), como conjugado se utilizó proteína G con peroxidasa (Pierce, USA), la lectura se realizó a 405 nanómetros en un lector de ELISA (Sigma, USA).

Para obtener la dilución óptima del antígeno rugoso para la prueba de ELISA, se realizaron varias diluciones hasta encontrar las que presentaron una diferencia de dos desviaciones estándar, entre sueros control positivos y sueros control negativos; utilizándose para la prueba de ELISA Indirecto, las siguientes diluciones: 1:200 de los sueros, 1:64 del antígeno y 1:2000 del conjugado. Para la prueba en tubo, el antígeno fue diluido 1:100.

Para la aglutinación lenta en tubo, se preparó el antígeno de células completas a partir de un cultivo madre de la cepa mutante rugosa de *B. abortus*, a una concentración de 4.5%, y a una dilución 1:100 en solución salina fenolada al 0.5% que se refrigeró a 4°C por 72 horas para su "maduración" (10).

La prueba de intradermorreacción, se aplicó a los 16 animales vacunados, a los 10 animales no vacunados y como control positivo a tres bovinos positivos al aislamiento, a los 12 meses después de ser aplicada la vacunación. Se utilizó brucellergeno OCB (Lote No. 26 N151, Rhône Mérieux, Lyon, Francia), preparado a partir de *B. melitensis* B115, el producto contenía 2,000 unidades de proteína/ml y 0.1 mg/ml de timerosal sódico en 0.15 M NaCl. Se rasuró una área de 3 x 3 cm en el cuello del animal, se realizó una medición inicial del grosor de la piel, utilizando un calibrador vernier, se administró intradérmicamente 0.1 ml de antígeno, y se realizaron revisiones a las 24, 48 y 72 h posinoculación; la lectura definitiva se realizó a las 72 h. La prueba se consideró positiva cuando el grosor de la piel

aumentó por lo menos 20% sobre el valor medido antes de la inoculación (13).

Se previó que en caso de encontrar positivos a serología para brucelas lisas, se les realizaría un estudio bacteriológico a partir de leche, exudado vaginal y abortos. Las muestras se sembraron en medio de Farrell y se identificaron utilizando las pruebas rutinarias (10).

RESULTADOS

Estudio bacteriológico. Se realizó en nueve vacas positivas a serología en el muestreo inicial, previo a la vacunación, consiguiendo aislar cepas de seis vacas, identificándose como cepa de campo de *B. abortus* biotipo 1. Teniendo como base los aislamientos, la prevalencia del hato fue de 8.33%.

Debido a que durante todo el seguimiento, ningún animal del grupo experimental resultó positivo a las pruebas serológicas

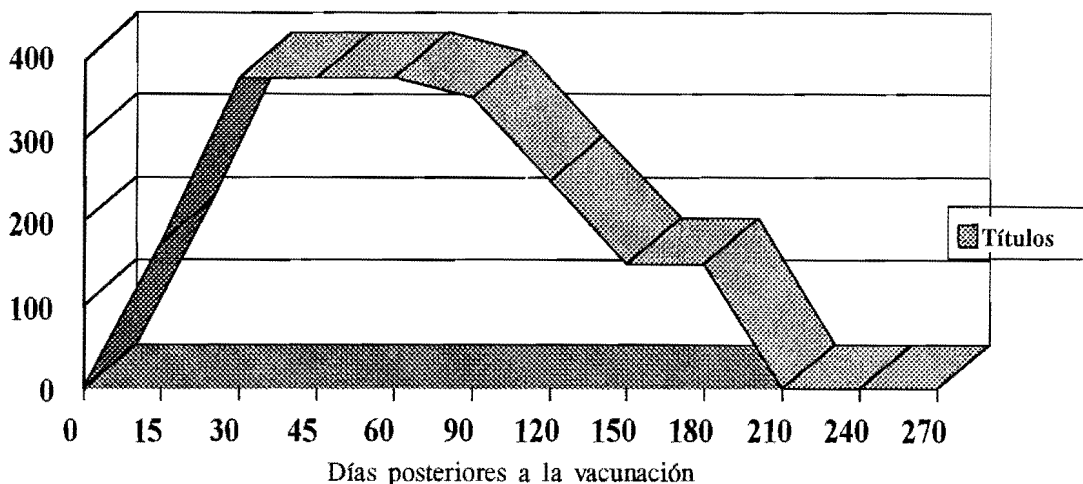
utilizadas para detectar a las brucelas lisas, no hubo necesidad de intentar el aislamiento bacteriológico.

Estudio serológico. Las pruebas de brucelas lisas de tarjeta y rivanol, resultaron negativas en los grupos vacunado y control.

En la prueba de tubo, el grupo vacunado presentó un ascenso paulatino de los títulos, alcanzándose los títulos más altos, entre 1:100 y 1:200, a los 30 días posvacunación, manteniéndose en esta forma hasta los 90 días; posteriormente, se inicia un descenso gradual de la curva, detectándose anticuerpos sólo en la dilución 1:25, a los 9 meses posvacunación (Figura 1).

En la prueba de ELISA, se presentó una elevación gradual de los valores de la densidad óptica, obteniéndose los mayores valores a los 30 días posvacunación, manteniéndose los valores en forma elevada hasta los 120 días, para posteriormente

Figura 1.- Promedio de títulos en la prueba de aglutinación en tubo con antígeno rugoso, en becerras vacunadas con *Brucella abortus rfbK*



presentar un decremento gradual de las lecturas, registrando a los nueve meses valores aún mayores que la lectura previa a la vacunación (Figura 2).

A los 12 meses posvacunación, la prueba intradérmica en los animales vacunados, presentó un 100% de positivos. Los tres bovinos con aislamiento de *B. abortus* dieron respuesta al alérgeno y los animales negativos no presentaron reacción apreciable a la lectura.

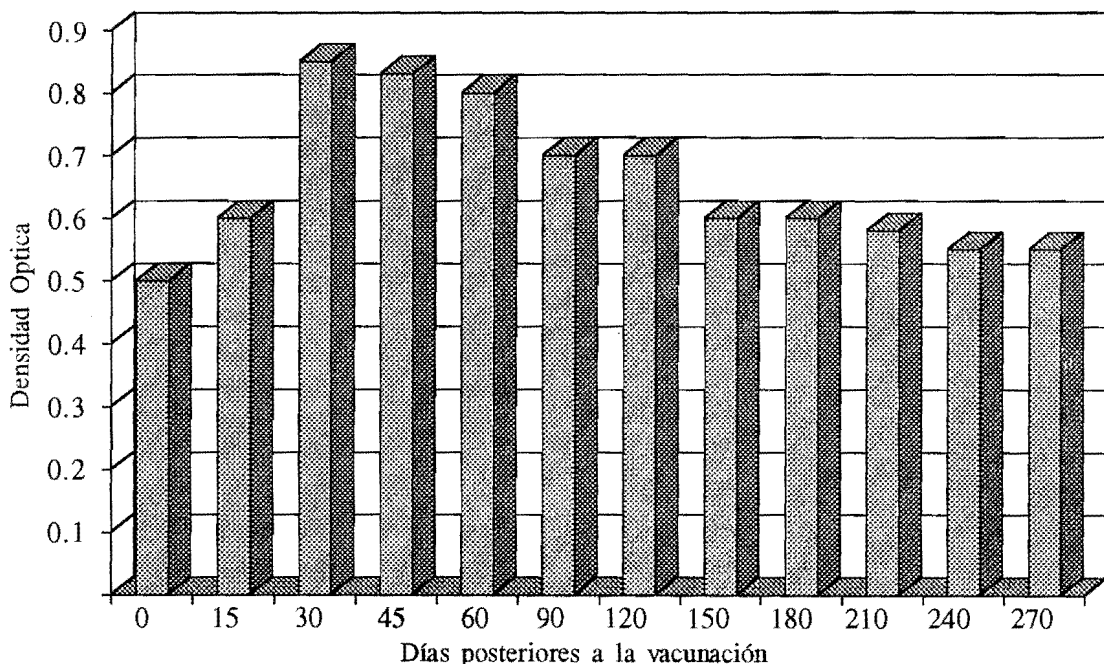
DISCUSION

Una de las ventajas de las vacunas rugosas de *B. abortus*, es que puedan inducir una protección adecuada al ganado vacuno contra la infección, y que, además, los

anticuerpos puedan ser diferenciados de la respuesta inducida por las cepas virulentas de campo de *B. Abortus*, en las pruebas serológicas normales usadas para el diagnóstico, para que no existan problemas en los diagnósticos posvacunales (14).

La corta sobrevivencia de esta cepa en los bovinos, puede explicarse porque el lipopolisacárido "S" (smooth o liso), presente en el género *Brucella*, es un factor de sobrevivencia al proceso de fagocitosis; un estudio refiere una reducción de la virulencia en las cepas mutantes rugosas *in vitro*, evaluando las cepas *B. abortus* 2308, mutante rugosa RB51, cepa 19 y dos mutantes por transposición derivadas de la cepa 19 (14). De esta forma, la vacuna rugosa es destruida poco tiempo

Figura 2.- Valores promedio de densidad óptica de las pruebas de ELISA indirecto con antígeno rugoso, en becerras vacunadas con *Brucella abortus* rfbK.



después de su inoculación, sin inducir anticuerpos que interfieran en las pruebas oficiales para el diagnóstico de la brucelosis bovina y resultando menos virulenta.

En la vacunación con la cepa mutante rugosa por transposición, los anticuerpos específicos para las estructuras superficiales del microorganismo, como son el lipopolisacárido y proteínas de membrana externa, pueden ser detectados a través de pruebas como el ELISA Indirecto y la aglutinación en tubo empleando, como antígeno cultivos inactivados de la cepa vacunal (14,15).

Con base en los resultados de este trabajo, se observó en ambas pruebas, que la cima de títulos de anticuerpos se presentó a las cuatro semanas posvacunación, decreciendo los títulos hasta casi desaparecer a los 300 días. Esto se asemeja a los resultados obtenidos al inocular 24 novillas de 10 meses de edad con varias cepas mutantes de *B. abortus*, donde al cuantificar los títulos de anticuerpos con la prueba de aglutinación en tubo, se detectó el mayor título a las cuatro semanas posvacunación (14).

En este trabajo la prueba de intradermorreacción obtuvo un 100% de positivos en el grupo vacunado, lo que da indicios de una respuesta inmune celular que tiene un papel muy importante en la protección.

Los resultados de este trabajo son similares a los encontrados al vacunar a 24 novillas a los diez meses de edad, con las cepas de *B. abortus* 19, RB51 y dos mutantes por transposición, donde aplicaron al ganado

la brucelinización, antes y después de la vacunación, obteniendo sólo reactividad cutánea a la brucelina después de la vacunación, y siendo las novillas libres de evidencia serológica contra *Brucella* (13). Así mismo otros autores al evaluar la prueba de intradermorreacción en ganado vacuno positivo, negativo y sospechoso, junto con las pruebas de fijación del complemento, aglutinación en tubo y anillo en leche, la encuentran como una prueba con alta sensibilidad y especificidad (16).

En los resultados de este trabajo, se observó un comportamiento en la prueba de aglutinación lenta en tubo, parecido al producido por la vacunación con cepa 19 (14), teniendo en consideración que en este trabajo se utilizó un antígeno rugoso; además se observa que el descenso de anticuerpos es similar con ambas vacunas.

Los sueros de los animales vacunados con la vacuna *rfbK* no presentaron reacción alguna en las pruebas rutinarias para el diagnóstico de las brucelas lisas en el transcurso del estudio, por lo que se deduce que la vacunación con la cepa rugosa mutante no induce anticuerpos que interfieran en el diagnóstico. El hecho de que no se presentaron animales positivos, también indica que esta vacuna indujo una respuesta inmune adecuada, confirmando protección a los animales vacunados; cabe mencionar que dichos animales estuvieron en un desafío natural de la enfermedad, como se demuestra por el hecho de que se logró aislar el microorganismo a partir de muestras de leche de seis animales pertenecientes al hato, e identificarlo como una cepa de campo, por lo que el grupo vacunado estuvo ante un elevado riesgo de

infección por el microorganismo. Además todos estos animales quedaron gestantes y parieron normalmente, sin ningún caso de aborto. El que los animales sin vacunación, no presentaran anticuerpos en la prueba para brucelas lisas, indica que no se infectaron, y esto puede ser debido a que por ser machos, presentan una susceptibilidad menor a la brucelosis que las hembras.

Además, el grupo de animales no vacunados fue muy reducido, debido a que las características de la explotación, no permitieron tener más animales sin vacunar, y esto reduce notablemente la oportunidad de que se infectaran.

Estos resultados se asemejan a los encontrados, por Cheville *et al.* (14) quienes vacunaron ganado vacuno adulto con la cepa rugosa RB51 utilizando las vías subcutánea y conjuntival y posteriormente desafiándolos con la cepa virulenta 2308, obteniendo que sólo dos de los 20 animales vacunados, abortaron después del desafío, con la diferencia de que el desafío se dio en forma natural, ya que la enfermedad era endémica en el hato al que pertenecían los animales (17).

En otro estudio, se vacunaron 24 novillas Polled Hereford de 10 meses de edad, utilizando las cepas de *B. abortus*, 19, RB51 y dos mutantes por transposición derivadas de la cepa 19, así como seis animales control; posteriormente fueron desafiadas al quinto mes de gestación con la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*. Se observó que todas las novillas fueron negativas después de la vacunación con las cepas rugosas a la serología diagnóstica convencional. Para todas las cepas

utilizadas, se obtuvo la cima de títulos de anticuerpos a las cuatro semanas posvacunación; todas las novillas vacunadas con RB51 fueron protegidas contra el aborto y parieron normalmente crías sanas y no se aisló la cepa de desafío; en el grupo control de todos los animales que abortaron (60%) se consiguieron aislamientos, y las novillas control que no abortaron, no tuvieron evidencia serológica ni cultivo de la cepa de desafío posterior al parto. De las vacas inoculadas con las dos mutantes por transposición de la cepa vacunal 19, lograron aislar microorganismos a partir de nódulos linfáticos; a través de la prueba de identificación del DNA cromosomal descubrieron que se trataba de las cepas originales utilizadas en la vacunación (14).

La vacunación del ganado vacuno utilizando cepas mutantes rugosas de *B. abortus*, reúne características valiosas para solventar el problema de diagnóstico presente por la vacuna actual; a pesar de que la mayoría de los estudios se refieren a la cepa rugosa RB51, la cepa *rfbK* mutante por transposición da resultados similares a la RB51 y presenta la característica de tener una mutación fija y conocida, por lo que se debe considerar como otra opción a estudiar para encontrar la vacuna ideal.

SEROLOGICAL EVALUATION IN A BOVINE HERD WITH BRUCELLOSIS, VACCINATED WITH *rfbK* BRUCELLA ABORTUS

SUMMARY

Pérez PJJ, Díaz AE, Pérez GR, Adams GL, Suárez GF. *Tec. Pecu. Méx.* 1999;37(2)1-9. It was evaluated the immune response induced by the *Brucella*

abortus rfbK, transposon mutant strain, rough vaccine in a dairy herd with confirmed *Brucella abortus* infection and the presence of abortions. Sixteen serologically negative, Holstein-Friesian calves, 4 to 6 months of age, were vaccinated subcutaneously with 1×10^9 colony forming units. Blood samples were collected for monthly serology during 10 months and at 24 months after vaccination. For the detection of antibodies against smooth strain antigens, the card and rivanol tests were used. For detection of antibodies against rough strain antigens, an experimental ELISA and tube agglutination tests were developed using the *rfbK* rough vaccine strain as an antigen. Cell mediated immunity was evaluated 12 months after vaccination using a commercially available protein derivative from *Brucella* in an intradermal test. The highest antibody titers detected against rough antigens occurred from day 30 to day 90 after vaccination. All cattle remained serologically negative when smooth strain antigen was used. All animals in the vaccinated group had positive skin test reactions to the protein derivative of *Brucella*, while none of the non-vaccinated controls were positive.

KEY WORDS: Brucellosis, Bovine, Rough vaccine, *rfbK*.

REFERENCIAS

1. Campos LH. La Salud Animal en México. Informe Anual de la Dirección General de Salud Animal, D.G.S.A, SARH, México, 1994:26.
2. Nicoletti P. The effects of adult cattle vaccination with strain 19 on the incidence of Brucellosis in dairy herds in Florida and Puerto Rico. Proceedings of the 83rd Annual Meeting. US Animal Health Association. Florida USA. 1976:83.
3. Nicoletti P. Vaccination against *Brucella*. In: Alan R. (ed) Bacterial vaccines. Liss Inc, USA. 1990:147.
4. Díaz R, Jones LM, Leons D, Wilson JB. Surface antigens of smooth *Brucellae*. J. Bact. 1968; 96:893.
5. Schurig GG, Pringle AT, Breese JR. Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus* infected cattle. Infec. Immun. 1981;34:1000.
6. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhram D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *B. abortus*. Vet. Microbiol. 1991;28:171.
7. Allen CA, Adams L, Fitch TA. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. Infec Immun. 1998; 6:1008.
8. Adams L. Advances in Brucellosis Research. Edit. Texas A&M. University Press. 1989:432
9. Brock D, Thomas M, Michael T. Microbiología. Ed. Prentice USA, 1993:284.
10. Alton GG. Techniques for the Brucellosis laboratory. *Inst. Nat. de la Recherche Agronomique*, París. 1988:86
11. Alfonseca SE, Díaz AE, Hernández AL, Velázquez QF, Suárez GF. Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en cabras. Vet. Mex. 1995;26:52.
12. Díaz AE. Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina. [Tesis Doctoral], Universidad de Navarra, España. 1993:84.
13. Bercovich Z, Ter Laak EA. 1990. An evaluation of delayed-type hypersensitivity test for diagnosing brucellosis in individual cattle: a field study. Vet. Microbiol. 1990;22:241.
14. Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM. Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *B. abortus*. Am. J. Vet. Res. 1993;54:91.
15. Price RE, Templeton T, Adams LG. Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 1990;26:353.
16. Blasco JM, Marín C., Jiménez de Bagüés M, Barberán M, Hernández A, Molina L, Velasco J, Díaz R, Moriyón I. Evaluation of allergic and serological test for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. J. Clin. Microbiology. 1994;32(8):1835.
17. Cheville NF, Jensen AE, Halling SM, Tatum FM, Morfitt D, Henuager SG, Frerichs W, Schurig G. Bacterial survival, lymph node changes, and immunological responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *B. abortus*. Am. J. Vet. Res. 1992;53:1881.