

## Comparación de la respuesta inmune humoral y celular de las vacunas *Brucella abortus* cepa RB51 y cepa 19 en vaquillonas Hereford de Patagonia y su interferencia con el diagnóstico serológico de la enfermedad

Robles, C.<sup>1</sup>; Cabrera, R.<sup>1</sup>; Abalos, P.<sup>2</sup>; Petray, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Salud Animal – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – CC: 277 (8400) Bariloche, Argentina.  
e-mail: robles.carlos@inta.gob.ar

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; Casilla 2 Correo 15, Santiago, CHILE

**Palabras clave:** Patagonia – Bovinos – *Brucella* – Cepa RB51 – Vacuna

### RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de campo controlado donde se usaron 2 grupos homogéneos de 25 vaquillonas Hereford cada uno, de 10 meses de edad, provenientes de un establecimiento libre de brucelosis y donde nunca se había vacunado previamente contra esta enfermedad. En el día cero del estudio todos los animales fueron sangrados y vacunados subcutáneamente con vacuna comercial *Brucella abortus* cepa RB51 o cepa 19 a las dosis recomendadas. Ambos grupos de animales fueron sangrados posteriormente a los 30, 90, 210 y 360 días post vacunación. En cada oportunidad se tomaron muestras de sangre con anticoagulante (con excepción del día 90) para cultivo de linfocitos in-vitro en presencia de un antígeno citosólico de *brucella* y posterior obtención de plasma sanguíneo y muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención de suero sanguíneo. Las muestras de plasma fueron procesadas con un Elisa de captura (Bovigam<sup>™</sup>, CSL) para la detección de Interferón gamma. Las muestras de suero fueron procesadas con las técnicas del BPA y dos ELISAs, usando como antígenos para estas últimas el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) de *Brucella abortus* RB51 para la detección de anticuerpos contra cepa RB51 y el lipopolisacárido liso (LPS-L) de *Brucella abortus* 413 para detectar anticuerpos contra cepa 19. La cepa RB51 demostró una respuesta inmune humoral similar a la cepa 19. En ambos casos los picos de anticuerpos, expresados como el promedio de los Porcentajes de Positividad (PP) de cada grupo, se produjeron el día 30 post vacunación con valores de PP  $90.4 \pm ES$  de 5.5 para RB51 vs. un PP  $91.8 \pm ES$  de 4.2 para C19. La cepa RB51 también demostró una respuesta inmune celular similar a cepa 19, medida a través de la producción de interferón gamma con valores promedio de PP de  $22.1 \pm ES$  de 2.4 para cepa RB51 vs. un PP de  $20.5 \pm ES$  de 3.0 para cepa 19. La cepa RB51 no interfirió a lo largo de todo el ensayo con las técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la Brucelosis cuales son el BPA y el test de Elisa indirecto con LPS-L. Se concluye que la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 genera una respuesta inmune humoral y celular adecuada, sin interferir con las pruebas diagnósticas de rutina.

**Keywords:** Patagonia - Cattle - *Brucella* – Strain RB51 - Vaccine

### SUMMARY

**Humoral and cellular immune response to *Brucella abortus* strain RB51 and strain 19 vaccines in Hereford heifers in Patagonia and its interference with the serological diagnosis of the disease.**

A controlled field study was carried out using two homogeneous groups of 25 ten-month-old *Brucella*-free Hereford heifers originated from a farm historically free from the disease and where *Brucella* vaccination was never carried out on the farm. On day zero all the animals were bled and subcutaneously vaccinated with commercially available *Brucella abortus* SRB51 or S19 vaccines at recommended doses. Both groups were then bled at days 30, 90, 210 and 360 post vaccination. On each opportunity blood samples with anticoagulant (with the exception of day 90) for in vitro leucocytes culture in the presence of a cytosolic antigen from *brucella*, were collected and the plasma samples obtained were processed with a capture ELISA for the detection of bovine gamma interferon (Bovigam<sup>™</sup>, CSL, Australia). Blood samples without anticoagulant were collected and sera obtained were processed with BPAT and with two indirect ELISAs, using the rough lipopolisaccharide (R-LPS) of *Brucella abortus* RB51 as antigen for strain RB51 antibody detection and the smooth lipopolisaccharide (S-LPS) of *Brucella abortus* 413 for strain 19 antibody detection. Strain RB51 showed a humoral immune response similar to strain 19. In both cases, the antibody picks expressed as the average of the Percentage of Positivity (PP) of each group of animals were produced on day 30 post vaccination with values of PP  $90.4 \pm SE$  5.5 for SRB51 vs. PP  $91.8 \pm SE$  4.2 for S19. Strain RB51 vaccine also showed a cellular immune response, measured through the production of Gamma Interferon similar to the one produced by S19 with average values of PP  $22.1 \pm SE$  2.4 for SRB51 vs. PP  $20.5 \pm SE$  3.0 for S19. Strain RB51 did not interfere with the BPAT and Elisa test along the study. It is concluded that *Brucella abortus* strain RB51, generates an adequate humoral and cellular immune response without interfering with the diagnostic serological tests.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina, producida por *Brucella abortus*, es una enfermedad infecciosa crónica que se caracteriza principalmente por aborto tardío en hembras y por infertilidad temporal o permanente en machos, afectando así, en forma negativa las tasas reproductivas del rodeo (FAO/OMS, 1986; Enright, 1990; Radostitis y col., 1994).

Debido a la relevancia de esta enfermedad, por afectar tanto la salud animal como la salud pública, se realizan grandes esfuerzos a nivel mundial para lograr su control y prevención, siendo una enfermedad de comunicación obligatoria, según el nuevo código de enfermedades de animales terrestres de la OIE. (Acha y Szyfres, 1986; García Carrillo 1987; OIE, 2007).

Para intentar el control de la enfermedad en el ganado bovino se han utilizado una serie de vacunas, como la *Brucella abortus* 45/20, *Brucella abortus* cepa 19, *Brucella suis* cepa 2, *Brucella melitensis* REV I, *Brucella suis* cepa M; *Brucella abortus* cepa 104-M, etc. (García Carrillo, 1980; FAO/OMS, 1986; Nicoletti, 1990; Schurig y col. 2002). De todas ellas, la cepa 19 ha sido la más utilizada y si bien ha demostrado ser efectiva, tiene una serie de inconvenientes, siendo el más importante el de interferir con la serología diagnóstica, lo cual impide su uso en animales adultos e imposibilita la revacunación del rodeo cuando es necesario (Acha y Szyfres, 1986; Nicoletti, 1990; Schurig y col. 2002).

El hecho de no contar aún con un inmunógeno para el control de la brucelosis bovina que cumpla con los requisitos de la vacuna ideal, como serían proteger al 100% de la población vacunada, que no interfiera con el diagnóstico de la enfermedad, que pueda ser usada a

cualquier edad del animal, que no sea abortigénica, que no se excrete en leche, que proteja al animal de por vida, etc., ha hecho que se siga investigando y probando nuevas vacunas en diversos países del mundo para lograr un control rápido, efectivo y seguro de la brucelosis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño del ensayo y animales utilizados:** se trabajó con 50 hembras de raza Hereford de 10 meses de edad al inicio del estudio, distribuidas en forma homogénea, de acuerdo a sus pesos corporales, en 2 grupos de 25 animales cada uno. Los animales provenían de un establecimiento naturalmente libre de Brucelosis y donde nunca se había vacunado contra esta enfermedad. En el día cero, se tomó una muestra de sangre a todos los animales y se procedió a vacunar en forma subcutánea al grupo 1 con una dosis completa de la vacuna comercial *Brucella abortus* cepa RB51 y al grupo 2 con una dosis completa de la vacuna comercial *Brucella abortus* cepa 19. Posteriormente ambos grupos fueron sangrados los días 30, 90, 210 y 360 post-vacunación.

**Obtención y manejo de las muestras:** En cada muestreo se extrajo sangre sin anticoagulante para la obtención de suero y sangre con anticoagulante para la realización de cultivos de linfocitos in-vitro y obtención del plasma sanguíneo. Para las extracciones de sangre se utilizó un sistema comercial de tubos con vacío y agujas descartables, que aseguraron la esterilidad de las muestras tomadas y la imposibilidad de contaminación cruzada. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron mantenidas a una temperatura aproximada de

20°C y tras la formación del coágulo, se procedió a la extracción de los sueros, los cuales fueron trasvasados a tubitos tipo eppendorf y congelados a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Las muestras de sangre con anticoagulante, fueron transportadas refrigeradas al laboratorio y procesadas dentro de las 8 horas de extraídas, con excepción del día 90 en que no se pudieron procesar dentro del tiempo estipulado y debieron ser descartadas. En placas para cultivos celulares de 24 pocillos estériles, se colocó 1 ml de sangre heparinizada de cada animal por duplicado. A uno de los pocillos se le agregó 100 µl de antígeno citosólico de *Brucella abortus* (a razón de 0.4 mg de Ag por ml de PBS, pH 7.2) y al otro pocillo 100 µl de PBS pH 7.2, como control negativo. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C bajo una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5% y al día siguiente se obtuvieron los plasmas mediante centrifugación durante 10 minutos a 2500 r.p.m. Los plasmas se guardaron en tubitos tipo eppendorf en freezer a -20°C hasta su utilización.

### Técnicas diagnósticas utilizadas:

Las muestras de plasma fueron procesadas mediante un test de ELISA de captura para la detección de interferón gamma bovino (IFN $\gamma$ ). Para ello se trabajó con un Kit comercial (Bovigam<sup>tm</sup>) siguiéndose las instrucciones del laboratorio productor (CSL, Australia) para su ejecución. La totalidad de las muestras de suero de ambos grupos de animales fueron procesadas mediante las técnicas de BPA según Angus y Barton (1984) y ELISA indirecto con lipopolisacárido liso (LPS-L) de *Brucella abortus* (Nielsen y col. 1992).

Las muestras del grupo 1 (vacunados con cepa RB51) se

procesaron además con un ELISA indirecto específico para la detección de anticuerpos generados por la cepa RB51. Se utilizaron placas de poliestireno (NUNC 269620). Como antígeno se usó el lipopolisacárido rugoso de *Brucella abortus* RB51 a una concentración de 5 µg/ml en buffer carbonato 0.06M, pH 9.6, a razón de 100 µl por pocillo. Se incubó a 27°C durante la noche y al día siguiente las placas fueron congeladas a -20°C hasta su uso. Antes de usar las placas fueron descongeladas a temperatura ambiente, lavadas 3 veces con una solución bufferada de fosfatos (PBS) 0.01M conteniendo 0.05% Tween 20 a pH 7.2 (PBS-T). Inmediatamente de realizados los lavajes, se agregaron a cada placa 100 µl de los sueros controles por duplicado (Positivo fuerte, positivo débil y negativo) y 100 µl de los sueros problema, todos diluidos 1:50 en PBS-T conteniendo 0.015M de ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) y ethylene glycol bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetic acid (EGTA) y se incubaron a 27°C durante 30 minutos. Terminada la incubación, las placas fueron lavadas tres veces con PBS-T y se les agregó 100 µl por pocillo de una dilución de un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de la IgG1 de bovino (Henning & Nielsen, 1992) conjugado con peroxidasa de rábano picante y se incubó a 27°C por 30 minutos. Tras la incubación, las placas fueron lavadas nuevamente tres veces con PBS-T y se les agregó 100 µl por pocillo de una solución de sustrato/cromógeno compuesta por un buffer citrato 0.05M pH 4.5 mas 0.5 µl peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 2.5 µl de una solución 0.040M de 2,2-azino bis (3 ethylben-zothiazoline-6-sulfonic acid) diam-monium salt (ABTS).

Las placas fueron incubadas por 10 minutos a 27°C bajo agitación y se leyeron en un espectrofotómetro a 414 nm.

Los resultados, de cada suero control y sueros problema analizados en este estudio mediante ambos tests de ELISA, fueron expresados como porcentaje de positividad (PP) de la densidad producida por cada suero problema respecto a la media de la densidad óptica (DO) producida por el suero control positivo fuerte. El porcentaje de positividad para cada suero fue calculado como sigue:

$$PP = \frac{DO \text{ del suero problema}}{\text{Promedio de la DO del suero control positivo fuerte}} \times 100$$

El software utilizado para la lectura y cálculos de los tests de Elisa fue desarrollado por Walter Kelly del Animal Diseases Research Institute (ADRI), Ottawa Laboratory, Canadian Food Inspection Agency, Canada.

**Análisis estadístico:** Para determinar la existencia de diferencias estadísticas en los valores promedio de los títulos de anticuerpos e interferón gamma producidos por cada una de las vacunas en estudio, se utilizó el test de comparación de medias ( $\alpha = 0.05$ ) del programa MedCalc, Ver 9.0.1.0 (Schoojans, 2006). Para todos los valores promedio de cada grupo se calculó el correspondiente Error Estandad (ES).

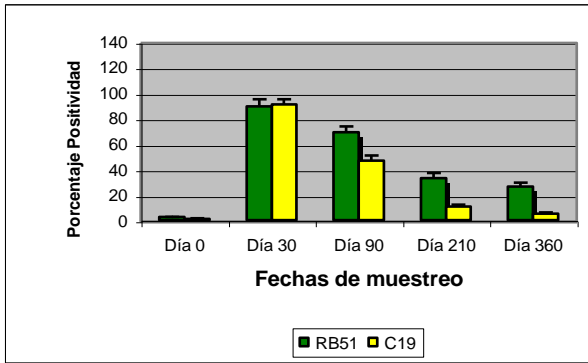
## RESULTADOS

**Respuesta inmune humoral:** La respuesta generada por la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 medida con una prueba de ELISA indirecto usando como antígeno el LPS-R de *Brucella abortus* RB51,

y la respuesta generada por la vacuna *Brucella abortus* cepa 19 medida con una prueba de ELISA indirecto usando como antígeno el LPS-L de *Brucella abortus* 413 fueron similares, como pueden observarse en el Gráfico 1. En ambos casos se detectó un pico máximo de producción de anticuerpos en el muestreo del día 30 post vacunación, cuyo promedio fue de PP 90.4 ± un ES de 5.5 para cepa RB51 y un promedio de PP 91.8 ± ES de 4.2 para cepa 19. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de anticuerpos de ambas vacunas cuando se realizó el test de comparación de medias correspondientes al pico del día 30, entre los 2 grupos de animales, arrojando un valor de t de 0.263 y un valor de p de 0.7938.

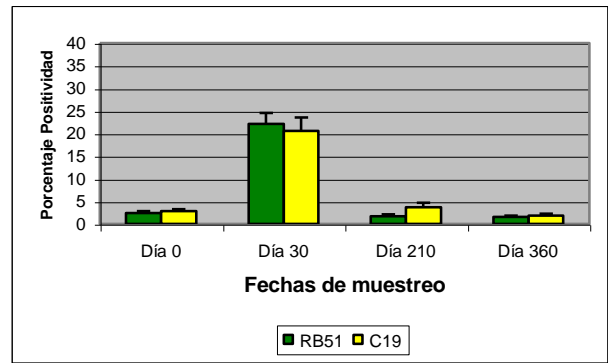
**Respuesta inmune celular:** La vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 de-mostró una respuesta inmune celular, medida a través de la producción de interferón gamma similar a la demostrada por la vacuna *Brucella abortus* cepa 19 como puede observarse en el Gráfico 2. En ambos casos se detectó un pico máximo de anticuerpos en el muestreo del día 30 post vacunación, cuyo promedio fue de PP 22.1 ± ES de 2.4 para cepa RB51 y de PP 20.5 ± ES de 3.0 para cepa 19. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de interferón gamma de ambas vacunas cuando se realizó el test de comparación de medias correspondientes al pico del día 30, entre los 2 grupos de animales, arrojando un valor de t de 0.415 y un valor de p de 0.6802.

**Gráfico 1:** Respuesta inmune humoral producida por las vacunas *Brucella abortus* Cepa RB51 y Cepa 19, medidas con sus respectivos tests de Elisa indirectos



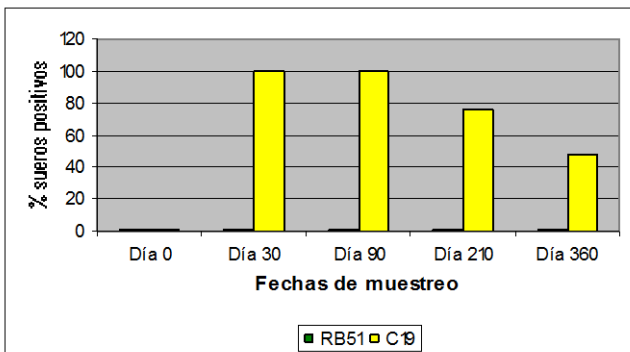
**Referencias:** Los datos graficadas corresponden a los valores promedios y error estándar de los títulos de anticuerpos de cada grupo para cada fecha de muestreo.

**Gráfico 2:** Respuesta inmune celular producida por las vacunas *Brucella abortus* Cepa RB51 y Cepa 19, medidas a través de la producción de Interferón gamma, usando un test de Elisa de captura (Bovigam™)

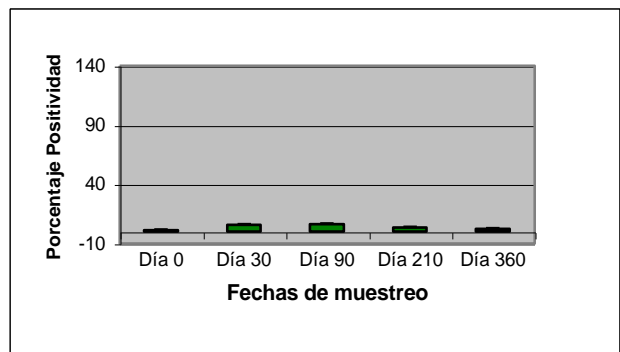


**Referencias:** Los datos graficadas corresponden a los valores promedios y error estándar de los títulos de anticuerpos de cada grupo para cada fecha de muestreo.

**Gráfico 3:** Interferencia de la respuesta inmune generadas por las vacunas *Brucella abortus* Cepa RB51 y Cepa 19 con la prueba del BPA. Nótese la falta de interferencia de la cepa RB51 con dicha técnica diagnóstica



**Gráfico 4:** Interferencia con el diagnóstico de las vacunas *Brucella abortus* Cepa RB51 y Cepa 19. La Cepa RB51 no produjo interferencia alguna con el test de Elisa indirecto con el LPS-L como antígeno, usado para el diagnóstico de la enfermedad



**Referencias:** Los datos graficadas corresponden a los valores promedios y error estándar de los títulos de anticuerpos de cada grupo para cada fecha de muestreo.

**Interferencia de la respuesta inmune humoral de ambas vacunas con la serología diagnóstica:** En el caso de las 25 vaquillonas vacunadas con la cepa 19, a los 12 meses de haber sido aplicada la vacuna, ello es a los 22 meses de edad, el 50% de las mismas seguían siendo positivas al BPA (Gráfico 3) y todas resultaron positivas al test de Elisa usando el lipopolisacárido liso como antígeno (ambas pruebas se utilizan rutinariamente para el diagnóstico de infección por *Brucella abortus*

en animales de campo). En contraposición el grupo de las 25 vaquillonas vacunadas con la cepa RB51 fueron negativas a lo largo de todo el ensayo a la prueba del BPA (Gráfico 3) y al ELISA indirecto (Gráfico 4) usando el lipopolisacárido liso como antígeno.

**DISCUSIÓN**

La vacuna *B. abortus* cepa RB51 comercial, usada a la dosis recomendada y en hembras de 10 meses de edad en adelante, generó

una respuesta inmune humoral adecuada y similar a la generada por *B. abortus* cepa 19 (ver Gráfico 1). Estos resultados están en concordancia con los trabajos de Stevens y col. (1995); Olsen y col. (1996), Olsen y col. (1997) y Olsen y col. (1999) donde usando un ensayo de dot blot, demostraron que la cepa RB51 producía una curva de anticuerpos con un pico máximo a los 30 días post vacunación para luego ir decayendo. A diferencia de los autores antes citados, en nuestro trabajo se utilizó un test de Elisa,

que consideramos posee una serie de ventajas sobre las pruebas de dot blot, cuales son su simplicidad, rapidez, medición objetiva y cuantitativa de los resultados y básicamente que se puede realizar con el mismo equipamiento y prácticamente los mismos reactivos que los tests de Elisa utilizados para el diagnóstico de rutina de la brucelosis bovina, ovina y caprina.

Por otro lado, cuando se comparó la respuesta inmune celular generada por ambas vacunas y medida a través de la producción de Interferón gamma en muestras de sangre (ver Gráfico 2), se determinó que ambas vacunas, tenían un comportamiento similar. Estos resultados también concuerdan con los reportados por Stevens y col (1995) donde si bien utilizaron otra técnica para medir la respuesta inmune celular, obtuvieron resultados similares al comparar cepa RB51 con cepa 19. Montaña y col. (1998) al evaluar en bovinos la respuesta inmune humoral y celular generadas por las vacunas vivas cepa RB51 y cepa 19 y las vacunas en base a antígenos estructurales OMP-II, OMP-II-cadena O y OMP-II-acoplado a polisacárido O, demostraron que las respuestas inmunes de las vacunas vivas (cepas RB51 y 19) eran similares entre sí, pero superiores a las vacunas formuladas en base a antígenos estructurales.

Habiendo confirmado a nivel local, a través de este estudio, que ambas vacunas producen una respuesta inmune tanto humoral como celular similares, ambas indispensables para proteger contra la infección por *Brucella* (Nicoletti y Winter, 1990), la vacuna *B. abortus* cepa RB51, demostró una ventaja importante sobre cepa 19, cual es la de no haber interferido a lo largo de todo el ensayo de 12 meses de duración, con la prueba del BPA y del Elisa indirecto, ambas técnicas

usadas para el diagnóstico de la brucelosis bovina y que concuerda con lo reportado en otros trabajos (Schurig y col. 1991; Cheville y col. 1996; Olsen y col. 1996; Samartino y col. 2000). Así, el viejo paradigma, de que en brucelosis solo se puede vacunar "una vez en la vida" debería ser reconsiderado ya que estaba basado en la imposibilidad de usar la vacuna cepa 19 varias veces en la vida del animal por su interferencia con el diagnóstico y no en la necesidad real de mantener en niveles adecuados el status inmune del animal contra la enfermedad a lo largo de toda su vida.

El hecho de que la vacuna cepa RB51, produce una respuesta inmune adecuada pero sin interferir con el diagnóstico y de que se podría aplicar también en machos (Edmonds y col, 1999), permitiría la elaboración de nuevas estrategias para mejorar y acelerar (Ramirez y col, 2002) el control de la brucelosis en los rodeos como podrían ser, entre otras: (a) vacunación de las terneras con cepa 19 y la revacunación de esas mismas terneras con cepa RB51 al momento del primer servicio, o servicios posteriores, con lo cual se refuerza por un lado la inmunidad de las hembras en el momento de mayor riesgo de infección y aborto como es la preñez y por otro lado, se lograría superar el 70% de protección inicial que se ha demostrado que confiere la cepa 19 aplicada en dosis única en terneras, (b) vacunación en los casos donde se hace imposible vacunar las terneras con cepa 19 entre los 3 y 8 meses de edad, como fija la reglamentación actual, por problemas de sequías, inundaciones, rodeos con ciclo reproductivo continuo, rodeos en campos abiertos, etc. tan comunes en las regiones extra-pampeanas (Robles, 2004). En estas situaciones esos animales podrían ser vacunados y revacunados de adultos, lográndose

de esta manera dotarlos de una inmunidad razonable y no quedar como en la actualidad susceptibles a la infección y ser potenciales generadores de nuevos focos de aborto, (c) revacunación anual de animales adultos en los casos de establecimientos con altas tasas de infección hasta lograr bajar la prevalencia a niveles controlables de un 1% o 2% (Robles, 2002) y a partir de allí iniciar la erradicación de la enfermedad en el rodeo, sumando a la vacunación, otras herramientas como el sangrado y descarte de los animales positivos a la serología diagnóstica, manejo de los potreros de parición y establecer un estricto control sobre las madres durante la gestación y el parto, a fin de detectar posibles abortos y casos de mortalidad perinatal a causa de la enfermedad, con aparte y aislamiento de los animales epidemiológicamente peligrosos, (d) revacunación de animales adultos en establecimientos donde se presentan casos de aborto por brucella, a pesar de que los animales habían sido vacunados de terneras con la cepa 19.

## CONCLUSIONES:

En base a los resultados del presente estudio, sumado a toda la evidencia generada en distintos estudios realizados en nuestro país y en otros países del mundo, respecto a la utilidad de la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 (Cheville y col., 1996; Lord y col. 1998; Samartino y col, 2000, Ramirez y col, 2002; Rivera y col., 2002, Robles y col. 2002; Poester y col, 2006) se concluye que se debería contemplar la posibilidad de usar la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 en bovinos adultos en nuestro país, en forma complementaria a la vacunación de las terneras con cepa 19, a los fines no solo de aumentar la cobertura vacunal actual, sino también de reforzar en adultos, la

inmunidad que confiere la cepa 19 aplicada a las terneras.

**Nota:** A partir de la controversia que generó la prohibición del uso de

la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 en nuestro país, sin haberse completado los 3 tipos de ensayos clínicos básicos que están indicados para evaluar la capacidad

protectora de productos biológicos de este tipo (Nicoletti, 1990), se propone se continúen los estudios de evaluación de esta vacuna para lograr su aprobación definitiva.

**AGRADECIMIENTOS:** A la Estancia Leleque y su administrador Sr. Ronnie McDonald, por facilitarnos las instalaciones y animales necesarios para el estudio; al Dr. Klaus Nielsen del Animal Disease Research Institute (Canada) por la provisión de antígenos y conjugado monoclonal; al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por la financiación del proyecto y a la International Foundation for Sciences (Suecia) e International Atomic Energy Agency (Austria) por el aporte de equipamiento.

## REFERENCIAS

1. Acha, P.N.; Szyfres, B. (1986) **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2da Edición. Organización Panamericana de la Salud, Washington, USA. 989 pag.**
2. Angus, R.D. & Barton, C.E. (1984) The production and evaluation of buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Develop. Biol Standard*, 56 : 349-356.
3. Cheville, N.; Olsen, S.; Jensen, A.; Stevens, M.; Palmer, M.; Florance, A. (1996) Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 57 :1153-1156.
4. Edmonds, M.D.; Schurig, G.G.; Samartino, L.E.; Hoyt, P.G.; Walker, J.V.; Hagijs, S.D.; Elzer, P.H. (1999) Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and pregnant heifers. *Am. J. Vet. Res.* 60 (6): 722-725.
5. Enright, F.M. (1990) The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. Pag. 301-320. En: *Animal Brucellosis*, Ed. Nielsen, K & Duncan, J.R. - CRC Press, Boca Raton, USA, 1<sup>st</sup> edition. 453 pag.
6. FAO/OMS Comité Mixto de Expertos en Brucelosis (1986) Sexto Informe. Ed. Organización Mundial de la salud, Ginebra. 149 pag.
7. Garcia Carrillo, C (1980) Comparison of *B. melitensis* REV I and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against brucellosis in cattle. *ZBL Vet Med B*, 27 :131-138.
8. Garcia Carrillo, C. (1987) La brucelosis de los animales en America y su relación con la infección humana. Office Internacional des Epizooties, Paris, Francia. 303 pag.
9. Henning, D., Nielsen, K. (1992) Cross-reactivity of monoclonal antibody to bovine immunoglobulins with immunoglobulins of other species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 34: 235-243.
- 10 Lord, V.; Schurig, G.; Cherwonogrodzky, J.; Marcano, M; Melendez, G. (1998) Field Study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am. J. Vet. Res.*, 59 (8) :1016-1019.
11. Montaña, N; Rueda, O.; Calderon, C.; Ortega, A.; Puentes, A.; Gallego, M.; Mariño, O. (1998) Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. *Arch. Med. Vet.* 30(2) : 109-121.
12. Nicoletti, P. (1990) Vaccination, pag. 283-299. En: *Animal Brucellosis*, Ed. Nielsen, K & Duncan, J.R. - CRC Press, Boca Raton, USA, 1<sup>st</sup> edition. 453 pag.
13. Nicoletti, P.; Winter, A.J. (1990) The immune response to *B. abortus*: the cell-mediated response to infections. Pag: 83-95. En: *Animal Brucellosis*, Ed. Nielsen, K & Duncan, J.R. - CRC Press, Boca Raton, USA, 1<sup>st</sup> edition. 453 pag.
14. Nielsen, K.; Gall, D.; Kelly, W.; Henning, D.; Garcia, M. (1992) Enzyme immunoassay: Application to diagnosis of Bovine brucellosis, Agriculture Canada Monograph, ISBN 0-662-19838-7.

15. **OIE** ( 2007)  
[www.oie.int/esp/maladies/es\\_classification.htm](http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm).
16. **Olsen, S.C., Evans, D., Hennager, S.G., Cheville, N.F., Stevens, M.G.** (1996) Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. J. Vet. Diagn. Invest. 8 : 451–454.
17. **Olsen, S.C.; Stevens, M.G.; Cheville, N.F.; Schurig, G.** (1997) Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. J. Vet. Diagn. Invest. 9 :363-367.
18. **Olsen, S.C.; Bricker, B.; Palmer, M.V.; Jensen, A.E.** (1999) Response of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. Res. Vet. Sci, 66:101-105.
19. **Poester, F.; Goncalves, V.; Paixao, T.; Santos, R.; Olsen, S.; Schurig, G.; Lage, A.** (2006) Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. Vaccine, 24 : 5327-5334.
20. **Radostitis, O.M.; Blood, D.C.; Gay, C.C.** (1994) Veterinary Medicine. Ed: ELBS, Bailliere Tindall, London, UK. 1763 pag.
21. **Ramirez, M.; Ernst, S.; Elvinger, F.; Rivera, A.; Rosenfeld, C.** (2002) Respuesta serológica y tiempo de saneamiento en rebaños bovinos con Brucelosis vacunados con Cepa 19 o cepa RB51. Arch. Med. Vet, 34(2) :213-220.
22. **Rivera, A.; Ramirez, M.; Lopetegui, I** (2002) Eradication of bovine brucellosis in the 10<sup>th</sup> Region de los Lagos, Chile. Vet. Microbiol, 90 :45-53.
23. **Robles, CA.; Sturzbaum, P.; Paramidani, M.; Petray, S.; Cabrera, R.** (2002) Estrategia para el control de la Brucelosis bovina en rodeos de alta prevalencia en Patagonia incluyendo el uso de la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51. Reunión Científica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. 13 al 15 de Noviembre del 2002. Villa General Belgrano, Argentina. pag. E-11.
24. **Robles, C.A.** (2004) Antecedentes y situación epidemiológica de la Brucelosis bovina en la Región Patagónica Argentina. Rev. Med. Vet. 85 (4) :148-158.
25. **Samartino, LE.; Fort, M.; Gregoret, R.; Schurig, GG.,** (2000). Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. Prev. Vet. Med., 45: 193-199.
26. **Schoojans, F.** (2006) MedCalc Ver: 9.0.1.0. – Computer Program for Statistics in Medicine. Belgium.
27. **Schurig, GG.; Roop, RM.; Bagchi, T.; Boyle, S.; Buhman, D.; Sriranganathan, N.** (1991) Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet. Microb., 28 :171-188.
28. **Schurig, G.; Sriranganathan, N.; Corbel, M.** (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet Microbiol., 90 : 479-496.
29. **Stevens, MG.; Olsen, SC.; Cheville, NF.** (1995) Comparative análisis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. Vet Immunol. and Immunopath. 44: 223-235.