

Diagnosa Veteriner

**Buletin Informasi Kesehatan Hewan &
Kesehatan Masyarakat Veteriner**

Volume 18, Nomor 1, Tahun 2019

**KEMENTERIAN PERTANIAN - DIREKTORAT JENDERAL
PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN**

BALAI BESAR VETERINER MAROS

Jl. DR. Sam Ratulangi, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan

Telp. 0411-371105, Fax. 0411-372257

E-mail: bbvetmaros@pertania.go.id, Website: www.bbvet-maros.web.id

KATA PENGANTAR

Diagnosa Veteriner Vol. 18, No. 1, Tahun 2019

Puji syukur kepada Allah, Tuhan Yang Maha Kuasa, karena berkat rahmat dan dan karunia-Nya Buletin Diagnosa Veteriner Vol. 18, No. 1, Tahun 2019 dapat diterbitkan.

Pada Buletin Diagnosa Veteriner edisi ini, pembaca dapat mengupas tentang Efikasi Protektif Vaksin Subunit SLPS dan Vaksin Strain RB51 pada Mencit (*Mus musculus*) terhadap Infeksi *B. abortus* Isolat Lapang, Studi Tingkat Penyakit Brucellosis sebagai Dasar Penentuan Aras Prevalensi dalam Program Pembebasan Brucellosis di Kabupaten Kepulauan Selayar, Status dan Prospektif Vaksin Caprine Brucellosis, Distribusi Antigen Rabies yang Menginfeksi Otak Anjing: untuk Menentukan Daerah yang Terinfeksi Rabies pada Otak dengan Histokimia “Rapid Immunohistochemical Test”, Deteksi Antigen Bovine Viral Diarrhea (BVD) dengan Tehnik Immunohistokimia pada Sistem Pencernaan Sapi Bali, Surveilans Deteksi Antigenik Classical Swine Fever berbasis risiko : Dinamika Tingkat Aras dan Faktor faktor risiko dalam Penularan pada Babi di Provinsi Sulawesi Utara Tahun 2018, Investigasi Kasus Gigitan Anjing Supek Rabies di Kecamatan Belawa Kabupaten Wajo Provinsi Sulawesi Selatan Februari 2019 dan Profil Respon Imun Pasca Vaksinasi Classical Swine Fever dalam Rangka Pembebasan di Provinsi Sulawesi Utara Tahun 2018.

Harapan kami sajian Buletin Diagnosa Veteriner edisi ini bermanfaat bagi pembaca.

Selamat membaca

Redaksi

DIAGNOSA VETERINER

Bulletin Informasi Kesehatan Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner

International Standard Serial Number (ISSN) : 0216- 1486

Volume 18

No. 1

Tahun 2019

SUSUNAN REDAKSI

Penanggung Jawab : Kepala Balai Besar Veteriner Maros

Pemimpin Redaksi : Kepala Seksi Informasi Veteriner

Editor : Kepala Bidang Pelayanan Veteriner

Drh. Dini Marmansari

Drh. Saiful Anis, M.Si.

Drh. Titis Furi Djatmikowati

Secretariat : Suryani Gesha Utami, A.Md.

Syamsuddin

DAFTAR ISI

Diagnosa Veteriner Vol. 18, No. 1, Tahun 2019

| | |
|--|------------|
| Kata Pengantar | i |
| Susunan Redaksi | ii |
| Daftar Isi | iii |
| Efikasi Protektif Vaksin Subunit SLPS dan Vaksin Strain RB51 pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) terhadap Infeksi <i>B. abortus</i> Isolat Lapang | 1 |
| Studi Tingkat Penyakit Brucellosis sebagai Dasar Penentuan Aras Prevalensi dalam Program Pembebasan Brucellosis di Kabupaten Kepulauan Selayar | 9 |
| Review Literatur: Status dan Prospektif Vaksin Caprine Brucellosis | 18 |
| Distribusi Antigen Rabies yang Menginfeksi Otak Anjing: untuk Menentukan Daerah yang Terinfeksi Rabies pada Otak dengan Histokimia “Rapid Immunohistochemical Test” | 27 |
| Deteksi Antigen Bovine Viral Diarrhea (BVD) dengan Tehnik Immunohistokimia pada Sistem Pencernaan Sapi Bali | 38 |
| Surveilans Deteksi Antigenik Classical Swine Fever berbasis risiko : Dinamika Tingkat Aras dan Faktor faktor risiko dalam Penularan pada Babi di Provinsi Sulawesi Utara Tahun 2018..... | 45 |
| Investigasi Kasus Gigitan Anjing Supek Rabies di Kecamatan Belawa Kabupaten Wajo Provinsi Sulawesi Selatan Februari 2019..... | 53 |
| Profil Respon Imun Pasca Vaksinasi Classical Swine Fever dalam Rangka Pembebasan di Provinsi Sulawesi Utara Tahun 2018..... | 71 |

Status dan Prospektif Vaksin *Caprine Brucellosis*

Saiful Anis

Medik Veteriner Muda, Balai Besar Veteriner Maros

Abstrak

Brucellosis merupakan penyakit zoonosis endemis dan tersebar luas di seluruh dunia, yang menyerang hewan dan manusia. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri yang termasuk dalam genus *Brucella*. Spesies *Brucella* memiliki hospes yang bersifat khusus, namun demikian penularan silang yang bersifat selektif dan terbatas dapat terjadi. Pada manusia brucellosis terutama disebabkan oleh *Brucella melitensis* diikuti dengan *Brucella abortus*. *Brucella melitensis* memiliki derajat virulensi yang lebih tinggi terhadap manusia dibandingkan dengan *Brucella abortus* dan menjadi penyebab pertama pada kasus brucellosis pada manusia. *Brucella melitensis* sebagai penyebab *caprine brucellosis* dan pola pemeliharaan kambing disekitar manusia merupakan sumber utama penularan brucellosis pada manusia. Berjangkitnya *caprine brucellosis* dapat dicegah dengan vaksinasi secara efektif pada populasi kambing. Telah tersedia vaksin yang efektif untuk kambing dan domba misalnya Rev.1, namun vaksin ini sangat berbahaya bagi manusia, sehingga penggunaannya tidak direkomendasikan di beberapa Negara. Pada situasi tertentu pengembangan dan percobaan beberapa vaksin telah dilakukan, baik pembuatan vaksin secara tradisional atau pengembangan tingkat lanjut. Review ini berusaha untuk meringkas dan mendiskusikan kelebihan dan kekurangan dari vaksin, sehingga dihasilkan vaksin yang aman dan efektif terhadap *Brucella melitensis*.

Keywords: Brucellosis; *Brucella melitensis*; Vaksin; Vaksinasi; Rev.1.

PENDAHULUAN

Brucellosis pada kambing terutama disebabkan oleh *B. melitensis*, meskipun pathogen ini juga dapat menyerang sapi dan ruminansia lainnya [1]. Pathogen ini memiliki tiga biovar yang berbeda [2]. *B. melitensis* merupakan spesies pertama dari genus *Brucella* yang diisolasi oleh Bruce pada tahun 1887 [3] dari limpa tentara yang mati akibat dari *Mediterranean fever* di kepulauan Malta. Penyebab penyakit ini telah menjadi misteri selama hampir 20 tahun sampai Themistocles Zammit secara tidak sengaja mendemonstrasikan penyebab zoonosis ini pada tahun 1905 melalui isolasi *B. melitensis* dari susu kambing [4]. Pada mulanya diyakini bahwa kambing bukanlah sumber utama infeksi karena kambing tidak sakit ketika diinokulasi dengan kultur *Brucella* [5]. Namun, organisme ini merupakan penyebab utama brucellosis pada manusia di seluruh dunia. Dengan demikian pencegahan brucellosis pada manusia sangat tergantung pada pencegahan dan pengendalian dari *caprine brucellosis* dan serupa dengan strategi pengendalian terhadap penyakit infeksius lainnya yaitu dilakukannya vaksinasi untuk mengendalikan brucellosis pada hewan [6]. Vaksinasi pada hewan dan pembedahan hewan terinfeksi merupakan

metode yang paling umum digunakan dalam pengendalian brucellosis pada kambing dan domba [7,8]. Satu hal yang sangat berbeda dengan pengendalian brucellosis pada hewan, sampai saat ini belum tersedia vaksin untuk manusia yang memenuhi kaidah *cost-effective* untuk eradikasi [9-11] dan untuk melindungi manusia da daerah endemis [12,13].

PEMBAHASAN

Saat in vaksin yang tesedia dan telah menunjukkan tingkat keberhasilan untuk ruminansia beasr dan kecil adalah *B. abortus* S19, Cotton stain 45, RB51 dan *B. melitensis* Rev.1 [14-16]. Vaksin *B. melitensis* strain Rev.1 merupakan vaksin yang sudah ditetapkan sebagai vaksin yang efektif untuk domba dan kambing [15,17,18]. Vaksin ini mampu memberikan proteksi untuk beberapa tahun dan tingkat protektivitasnya telah dievaluasi setelah inokulasi melalui conjunctiva dan subkutaneus pada anak-anak, domba dan orang dewasa [1,19,20]. Meskipun terjadi kontroversial dalam menghasilkan hambatan deteksi serologis pada infeksi, *shedding bacterial* yang virulen terhadap manusia [21], vaksin ini telah digunakan di beberapa negara berkembang dan beberapa negara di Eropa untuk mengendalikan brucellosis [22,23]. Beberapa negara berkembang telah berhasil melakukan eradikasi penyakit menggunakan vaksin ini, namun vaksinasi menginduksi abortus pada hewan bunting, penularan penyakit pada manusia melalui vaksin [10,21,24] dan resistensi strain Rev.1 (paling pathogen terhadap manusia) terhadap antibiotic streptomycin yang digunakan di beberapa negara untuk terapi terhadap brucellosis [10,25,26]. Lebih jauh lagi, dalam kondisi standard (misalnya dosis penuh melalui inokulasi subkutaneus pada hewan muda) dapat menimbulkan reaksi positif terhadap smooth lipopolysaccharide (sLPS) yang digunakan sebagai antigen pada uji serologis dalam waktu yang sangat lama yang akan mengkaburkan hasil diagnose pada kasus infeksi terhadap strain liar *B. melitensis* [15,27,28]. Sebagai pembanding vaksinasi dengan dosis penuh, vaksinasi *reduced dose* menimbulkan respon positif pada uji serologis yang lebih singkat dan tidak begitu kuat [29-31] dan lebih aman digunakan pada indu domba dan kambing bunting [30-35]. Oleh karena, ekskresi strain vaksin terutama pada ekskresi vaginal dan *foetal contents* selama abortus pada induk domba dan kambing bunting pasca infeksi lapangan [36-39], maka hal ini menunjukkan perlunya penekanan pada metode vaksinasi yang berbeda.

Vaksinasi menggunakan jumlah bakteri yang lebih sedikit dalam volume vaksin yang lebig sedikit pula melalui conjunctiva dapat menurunkan respon serologis dan menghasilkan tingkat protektivitas yang hampir sama dengan yang dihasilkan pada vaksinasi menggunakan dosis penuh atau *reduced dose* pada anak hewan atau hewan dewasa [19,39-43]. Jalur conjunctiva juga menurunkan tingkat aborsi dan ekskresi strain vaksin [39,41] dan kasus tersebut dapat dikurangi lebih jauh lagi dengan melakukan vaksinasi selama periode awal kebuntingan [39]. Namun demikian, dosis vaksinasi dan reimmunisasi tergantung pada umur, spesies dan status kesehatan hewan [19,20,30]. Meskipun masalah sero diagnosis dapat diselesaikan sebagian menggunakan vaksinasi jalur conjunctival pada anakan hewan dan menghindari vaksinasi pada hewan dewasa [44] namun uji serologis terhadap hewan secara individual, karakteristik sisten perkawinan pada ruminantia kecil mengakibatkan hal ini menjadi tidak realistic. Oleh karena itu,

diperlukan adanya terobosan baru dalam menghasilkan vaksin yang tidak menginterferensi uji serodiagnosis dan tidak virulen sepenuhnya terhadap manusia [26,45].

Penggunaan strain *live attenuated rough* (tidak memiliki S-LPS), *B. abortus* RB51 [48,49], strain *live rough* yang diperoleh melalui *transposon mutagenesis* dari strain *B. melitensis* 16M strain, VTRM1 [50] dan strain *B. abortus* 2308, strain RfbK [51] untuk mengatasi masalah tersebut di atas telah dilakukan namun dengan tingkat keberhasilan yang terbatas. Penggunaan target dan *transposon mutagenesis* melalui disrupsi gen *per*, *wbo A* dan juga *wbk A* (putative perosamine synthetase dan gen glycosyltransferase) untuk menghasilkan strain R mutant menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan RB51 dalam percobaan laboratoris [52-54]. *Brucella* R mutant yang tidak memiliki LPS immunodominant N-formylperosamine O-polysaccharide (O-PS) juga diuji coba untuk vaksinasi setelah proses attenuasi [15,26,45]. Meskipun demikian, hasil yang diperoleh dari vaksinasi menggunakan RB51 sangat kontroversial dan berbeda dengan yang diperoleh pada sapid an tidak efektif pada domba. Lebih jauh lagi, hal ini menimbulkan resistensi terhadap rifampin untuk terapi brucellosis [15,45].

Pada tahun 2000, vaksin yang dipersiapkan dari *Brucella melitensis* utuh yang telah dimatikan diberikan tanpa adjuvant atau dengan tambahan *Mycobacterium phlei* atau bentonite pada sapid an domba mampu menghasilkan imunitas humoral dan selular yang cukup tinggi [56]. Di China vaksin *B. melitensis* M5-90 telah digunakan pada domba dan kambing [57,58]. Namun demikian, antibody yang dihasilkan sangat sulit dibedakan menggunakan uji serologis dengan infeksi alami *Brucella*.

Vaksin DNA menggunakan gen penyandi *outer membrane protein* (OMP31) dari *Brucella melitensis* 16M juga telah dilaporkan menginduksi respon imun pada mencit [79]. Pada akhir-akhir ini juga digunakan (*membrane protein extracts*) dengan pembanding rBP26 (*rough* BP26) dilaporkan lebih sensitive dan spesifik pada pengujian ELISA untuk mendeteksi antibody terhadap *Brucella* pada domba [80]. Namun, kembali hasil vaksinasi dari kandidat tersebut belum bisa menandingi respon imun yang dihasilkan oleh vaksin S-19 or Rev.1. Vaksin *live attenuated Brucella melitensis strain Rev.1* masih menjadi vaksin terbaik di seluruh dunia untuk pencegahan brucellosis pada domba dan kambing [10,11,82].

KESIMPULAN

Berhubungan dengan tidak tersedianya vaksin dan strategi vaksinasi yang dapat digunakan secara universal, maka hal ini menyebabkan eradikasi penyakit ini sulit dilakukan [11,12]. WHO dan OIE [12] telah menyepakati bahwa vaksin strain Rev.1 harus dilanjutkan sebagai dasar pengendalian brucellosis pada ruminansia kecil, sampai vaksin baru yang berbasis strain rough dari *B. abortus* dan *B. melitensis* yang lebih aman dan efektif dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Verger JM, Grayon M, Zundel E (1995) Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine* 13(2): 191-196.

2. Bricker BJ, Halling SM (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32(11): 2660-2666.
3. Alton GG (1990) *Brucella melitensis*. In: Nielsen K, Duncan R (Eds.), *Animal brucellosis*. CRC Press, USA, pp. 383-409.
4. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine reservoir, brucellosis has continuously been a reemerging zoonosis. *Vet Res* 36(3): 313-326.
5. Pappas G, Papadimitriou P (2007) Challenges in *Brucella* bacteraemia. *Int Antimicrob Agents* 30(Suppl 1): 29-31.
6. Alton GG (1967) Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. Serological reactions in Maltese goats. *J Comp Pathol* 77(3): 327-329.
7. Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, et al. (1994a) Efficacy of different rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec* 134(16): 415-420.
8. Da Costa MR, Irache JM, Gamazo C (2012) A cellular vaccine for bovine brucellosis: A safer alternative against a worldwide disease. *Expert Rev Vaccines* 11(1): 87-95.
9. Nicoletti PL (1990) Vaccination. In: Nielsen KH, Duncan JR (Eds.), *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, USA, pp. 283-299.
10. Bastuji GB, Lasco JM, Grayon M, Verger JM (1998) *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet Res* 29(3-4): 255-274.
11. Office International des Epizooties (OIE) (2010) Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. (3rd edn), Office International des Epizooties, Paris, France, pp. 251.
12. WHO / MZCP (1998) Human and Animal Brucellosis. Report of a WHO/MZCP workshop, Damascus, Syria.
13. Zinsstag J, Schelling E, Roth F, Bonfoh B, Don de Savigny, et al. (2007) Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerg Infect Dis* 13(4): 527-531.
14. Alton GG (1968) Further studies on the duration of immunity produced in goats by the Rev-1 *Brucella melitensis* vaccine. *J Comp Pathol* 78(2): 173-178.
15. González D, Grilló MJ, De Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, et al. (2008) Brucellosis Vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. *PLoS ONE* 3(7): e2760.
16. Ebrahimi M, Nejad RB, Alamian S, Mokhberalsafa L, Abedini F, et al. (2012) Safety and efficacy of reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 vaccine in pregnant Iranian fat-tailed ewes. *Vet Ital* 48(4): 405-412.
17. Alton GG (1966) Duration of the immunity produced in goats by Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. *J Comp Pathol* 76(3): 241-253.
18. Blasco JM (1997) A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 31(3-4): 275-283.
19. Fensterbank R, Pardon P, Marly J (1985) Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *B. melitensis* Rev.1 vaccine. *Ann Rech Vet* 16(4): 351-356.
20. Ferrer DM (1998) Comparación entre métodos inmunológicos de diagnóstico de la brucellosis ovina por *Brucella melitensis* y eficacia de la inmunización de ovejas adultas con la vacuna Rev.1 por vía conjuntival. University of Murcia, Spain.

21. Blasco JM, Díaz R (1993) *Brucella melitensis* Rev1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* 342(8874): 805.
22. Garrido F (1992) Rev 1 and B-19 vaccine control in Spain. Observations on the handling and effectiveness of Rev 1 vaccine and the immune response. In: Plommet M (Ed.), *Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries*. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 223-231.
23. Banai M (2002) Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol* 90(1-4): 497-519.
24. Spink WW (1956) The nature of brucellosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, USA.
25. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 14(1): 131-140.
26. Schurig GC, Sriranganathan N, Corbel MJ (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90(1-4): 479-496.
27. Alton GG, Elberg S (1967) Rev 1 *Brucella melitensis* Vaccine. A review of ten years study. *Vet Bull* 37: 793-800.
28. MacMillan AP (1997) Investigation of the performance of the Rose Bengal plate test in the diagnosis of *Brucella melitensis* infection of sheep and goats. *World Animal Review* 89: 57-60.
29. Blasco JM, Estrada A, Mercadal M (1984) A note on adult sheep vaccination with reduced dose of *Brucella melitensis* Rev.1. *Ann Rech Vet* 15(4): 553-556.
30. Gasca A, Jiménez JM, Díaz L (1985) Experiencias sobre vacunación antibrucelar de cabras adultas con la cepa Rev.1. *BNE*, p. 33-34.
31. Henriques H, Hueston WD, Hoblet KH, Shulaw WP (1992) Field trials evaluating the safety and serologic reactions of reduced dose *Brucella melitensis* Rev.1 vaccination in adult sheep. *Prev Vet Med* 13(3): 205-215.
32. Kolar J (1984) Diagnosis and control of brucellosis in small ruminants. *Prev Vet Med* 2(1-4): 215-225.
33. Al-Khalaf SA, Mohamad BT, Nicoletti P (1992) Control of brucellosis in Kuwait by vaccination of cattle, sheep and goats with *Brucella abortus* strain 19 or *Brucella melitensis* strain Rev 1. *Trop Anim Health Prod* 24(1): 45-49.
34. Kolar J (1995) Some experience from brucellosis control with Rev.1 vaccine in a heavily infected country - Mongolia. *FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev.1 vaccine in Small Ruminants and Cattle*. CNEVA, Alfort, France, p. 21-22.
35. Uysal Y (1995) Field experience with Rev 1 vaccine in Turkey. *FAO/WHO/OIE Round Table on the use of Rev.1 vaccine in small ruminant and cattle*. CNEVA, Alfort, France.
36. Alton GG (1970) Vaccination of goats with reduced doses of Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. *Res Vet Sci* 11(1): 54-59.
37. Crowther RW, Orphanides A, Polydorou K (1977) Vaccination of adult sheep with reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev1. *Trop Anim Hlth Prod* 9(2): 85-91.
38. Fensterbank R, Pardon P, Marly J (1982) Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination of Rev.1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann Rech Vet* 13(4): 295-301.

39. Bagués MP, Marín CM, Barberán M, Blasco JM (1989) Responses of ewes to *B. melitensis* Rev.1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann Rech Vet* 20(2): 205-213.
40. Bagues MP, Marín CM, Blasco JM, Moriyón I, Gamazo C (1992) An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. Melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* Rev 1 vaccination. *Vet Microbiol* 30(2-3): 233-241.
41. Zundel E, Verger JM, Grayon M, Michel R (1992) Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: safety and serological responses. *Ann Rech Vet* 23(2): 177-188.
42. Díaz AE, Marín C, Alonso B, Aragón V, Perez S, et al. (1994) Evaluation of serological tests for diagnosis of *B. melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol* 32(5): 1159-1165.
43. Marin CM, Moreno E, Moriyon I, Diaz R, Blasco JM (1999) Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, Vaccines for Caprine Brucellosis: Status and Prospective 4/5 gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(2): 269-272.
44. De Frutos C, Durán FM, Leon M, Navarro A, Perales A, et al. (1994) Consideraciones sobre la epidemiología y el control de la brucellosis en pequeños rumiantes. *Proceedings Jornadas Internacionales sobre Brucelosis, Madrid*.
45. Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin CM, et al. (2004) Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res* 35(1): 1-38.
46. Xin X (1986) Orally administrable brucellosis vaccine: *B. suis* S2 vaccine. *Vaccine* 4(4): 212-216.
47. Mustafa AA, Abusowa M (1993) Field-oriented trial of the Chinese *Brucella suis* strain 2 vaccine in sheep and goats in Lybia. *Vet Res* 24(5): 422-429.
48. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, et al. (1991) Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28(2): 171-188.
49. Bagues MP, Marin CM, Barberan M, Blasco JM (1993) Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine* 11(1): 61-66.
50. Elzer P, Enright F, McQuinston, Boyle G, Schurig G (1998) Evaluation of a rough mutant of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Res Vet Sci* 64(3): 259-260.
51. Adams G, Ficht T, Allen C (1998) Derivation and evaluation of the rough rfbK brucellosis vaccine in cattle. *Foro Nacional de Brucellosis, Mexico*, pp. 141-158.
52. Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N, Bevins JS, et al. (1996) Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am J Vet Res* 57(5): 677-683.
53. Monreal D, Grillo MJ, Gonzalez D, Marin CM, de Miguel MJ, et al. (2003) Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun* 71(6): 3261-3271.

54. Mc Donagh MM, Ficht TA (2006) Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect Immun* 74(7): 4048-4057.
55. Adone R, Ciuchini F, Marianelli C, Tarantino M, Pistoia C, et al. (2005) Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 73(7): 4198-4204.
56. Ram S, Krishnappa G, Sastry KNV, Honnegowda, Ramanatha KR (2000) Evaluation of killed *Brucella melitensis* vaccine adjuvanted with bentonite clay and *Mycobacterium phlei* in cattle and sheep. *Indian Veterinary Journal* 77(3): 189-192.
57. Deqiu S, Donglou X, Jiming Y (2002) Epidemiology and control of brucellosis in China. *Vet Microbiol* 90(1-4): 165-182.
58. Zhang WY, Guo WD, Sun SH, Jiang JF, Sun HL, et al. (2010) Human brucellosis, Inner Mongolia, China. *Emerg Infect Dis* 16(12): 2001-2003.
59. Cloeckaert A, Debbbarh HSA, Vizca'ino N, Saman E, Dubary G, Zygmunt MS (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol Lett* 140(2-3): 139-144.
60. Rossetti OL, Arese AI, Boschioli ML, Cravero SL (1996) Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kDa periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J Clin Microbiol* 34(1): 165-169.
61. Salih Alj, Debbbarh H, Zygmunt MS, Dubray G, Cloeckaert A (1996) Competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev.1 vaccinated sheep. *Vet Microbiol* 53(3-4): 325-337.
62. Li Jia-Yun, Liu Y, GaoXiao-Xue, Gao X, Cai H (2014) TLR2 and TLR4 signaling pathways are required for recombinant *Brucella abortus* BCSP31-induced cytokine production, functional upregulation of mouse macrophages, and the Th1 immune response in vivo and in vitro. *Cellular and Molecular Immunology* 11: 477-494.
63. Vizca'ino N, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect Immun* 64(9): 3744-3751.
64. Cloeckaert A, Vizca'ino NJ, Paquet Y, Bowden RA, Elzer PH (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp. past, present and future. *Vet Microbiol* 90(1-4): 229-247.
65. Mediavilla P, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Marín CM, et al. (2003) Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4): 647-651.
66. Gupta VK, Kumari R, Vohra J, Singh SV, Vihan VS (2010) Comparative evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in goats. *Small Ruminant Research*. 93(2-3): 119-125.
67. Clapp B, Walters N, Thornburg T, Hoyt T, Yang X, et al. (2011) DNA vaccination of bison to brucellar antigens elicits elevated antibody and IFN- γ responses. *J Wildl Dis* 47(3): 501-510.
68. Yang X, Hudson M, Walters N, Bargatze RF, Pascual DW (2005) Selection of protective epitopes for *Brucella melitensis* by DNA vaccination. *Infect Immun* 73(11): 7297-7303.

69. Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M et al. (2004) Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* 22(21-22): 2827-2835.
70. Jacques I, Verger JM, Laroucau K, Grayon M, Vizcaino N, et al. (2007) Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by bp26 and omp31 *B. melitensis* Rev 1 deletion mutants in sheep. *Vaccine* 25(5): 794-805.
71. Grillo MJ, Marín CM, Barberán M, de Miguel MJ, Laroucau K, et al. (2009) Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 27(2): 187-191.
72. Qu Q, Wang ZJ, Zhen Q, Huang LY, Yu YQ, et al. (2009) Effect of bp26 on immune response and protective efficacy of M 5 against *Brucella melitensis* in mice. *Journal of Jilin Agricultural University* 31(4): 438-446.
73. Wang ZJ, Zhen Q, Qiao F, Wang YF, Du XY, et al. (2009) Construction of Vaccines for Caprine Brucellosis: Status and Prospective 5/5 BP26 tagged vaccine strain and development of discriminating PCR for *Brucella*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 49(3): 405-409.
74. Yang X, Walters N, Robison A, Trunkle T, Pascual DW (2007) Nasal immunization with recombinant *Brucella melitensis* bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces *B. melitensis* colonization. *Vaccine* 25(12): 2261-2268.
75. Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovskiy CA, de la Barrera S, et al. (2005a) Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun* 73(12): 8079-8088.
76. Cassataro J, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Estein SM, Bruno L, et al. (2005b) A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect Immun* 73(10): 6537-6546.
77. Pasquevich KA, Estein SM, Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, et al. (2009) Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 77(1): 436-445.
78. Liu WX, Hu S, Qiao ZJ, Chen WY, Liu LT, et al. (2011) Expression, purification, and improved antigenic specificity of a truncated recombinant bp26 protein of *Brucella melitensis* M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats. *Biotechnol Appl Biochem* 58(1): 32-38.
79. Gupta VK, Rout PK, Vihan VS (2007) Induction of Immune Response in Mice with a DNA Vaccine Encoding Outer Membrane Protein (OMP31) of *Brucella melitensis* 16M. *Res Vet Sci* 82(3): 305-313.
80. Qui J, Wang W, Wu J, Zhang H, Wang Y, et al. (2012) Characterization of Periplasmic Protein BP26 Epitopes of *Brucella melitensis* reacting with Murine Monoclonal and Sheep Antibodies. *PLoS One* 7(3): e34246.
81. Gupta VK, Radhakrishnan G, Harms J, Splitter G (2012) Invasive *Escherichia coli* vaccines expressing *Brucella melitensis* outer membrane proteins 31 or 16 or periplasmic protein BP26 confer protection in mice challenged with *B. melitensis*. *Vaccine* 30(27): 4017- 4022.

82. Blasco JM, Marin CM, de Bagues MP, Barberan M, Hernandez A, et al. (1994b) Evaluation of allergic and serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *J Clin Microbiol* 32(8): 1835-1840.