

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 Teknik 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 Teknik 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

**EFIKASI PROTEKTIF VAKSIN SUBUNIT SLPS DAN VAKSIN STRAIN
RB51 PADA MENCIT (*Mus musculus*) TERHADAP INFEKSI *B. abortus*
ISOLAT LAPANG**

Saiful Anis

Medic Veteriner Muda, Balai Besar Veteriner Maros

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efikasi protektif vaksin subunit *smooth Brucella abortus* lipopolysaccharide (SLPS) dan vaksin *B. abortus* RB51 pada mencit BALB/c terhadap infeksi *B. abortus*. Dua puluh delapan mencit *Mus musculus* divaksinasi dengan vaksin subunit *Brucella* SLPS, vaksin *Brucella* SRB51 dan satu kelompok sebagai kontrol. Uji tantang dilakukan pada 30 hari pasca vaksinasi menggunakan *B. abortus* isolat lapang Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan dengan menginjeksikan suspensi *B. abortus* secara intra peritonial. 15 hari pasca uji tantang, mencit dibunuh dan organ limpa diambil secara aseptis untuk dilakukan penghitungan koloni. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, vaksin subunit *Brucella* SLPS dengan adjuvant $Al(OH)_3$ dan montanide dapat menginduksi tingkat proteksi yang cukup kuat terhadap uji tantang menggunakan isolate *B. abortus* virulent pada mencit, dengan unit proteksi yang lebih rendah dibandingkan dengan yang diinduksi oleh vaksin *Brucella* RB51. Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka disarankan perlu dilakukan formulasi vaksin subunit yang bersifat polyvalent dengan menggabungkan SLPS dengan beberapa antigen yang mampu menginduksi sel T dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada hewan ruminansia kecil untuk benar-benar mengetahui potensi vaksin subunit *Brucella* SLPS montanide dan vaksin subunit *Brucella* SLPS $Al(OH)_3$ pada hospes alaminya.

Kata kunci: *Brucella abortus*, sLPS, vaksin subunit, efikasi protektif.

This study was conducted to evaluate the protective efficacy of *Brucella abortus* smooth lipopolysaccharide (SLPS) as a subunit vaccine and *B. abortus* strain RB51 vaccine against *B. abortus* infection in BALB / c mice. Twenty-eight mice vaccinated with *Brucella* SLPS subunit vaccines, *Brucella* SRB51 vaccine and one group as a control. Immunized mice and controls mice were challenged with virulent *B. abortus* 30 days post-vaccination. The number of bacteria in spleen at 15 days postchallenge were determined. The results showed that, *Brucella* SLPS subunit vaccine with adjuvant $Al(OH)_3$ and Montanide can induce a strong enough level of protection against challenge test using *B. abortus* virulent isolates in mice, although the protection unit lower than those induced by the *Brucella* RB51 vaccine. Based on these results it is suggested should be done subunit vaccine formulation that is polyvalent with SLPS combine with some antigens are able to induce T cell and the need to conduct further research on small ruminant animals to really know the potential of *Brucella* subunit vaccines with Montanide and $Al(OH)_3$ as adjuvant in its natural host.

Key words: *Brucella abortus*, sLPS, subunit vaccine, protective efficacy.

PENDAHULUAN

Brucellosis merupakan salah satu penyakit zoonosis bacterial disebabkan oleh genus *Brucella* yang paling sering menyerang manusia. Bakteri ini merupakan organisme intraseluler

fakultatif, Gram negative dan tidak membentuk spora. Berdasarkan variasi antigennya dan hospes utamanya, *Brucella* dapat dikelompokkan ke dalam tujuh spesies yaitu: *Brucella melitensis* (pada domba dan kambing), *B. suis* (babi), *B. abortus* (sapi), *B. ovis* (domba), *B. canis* (anjing), *B. neotomae* (rodensia) dan *B. maris* (mamalia laut) (OIE, 2009; Grillo *et.al.*, 2012).

Brucella abortus dapat menginduksi terjadinya abortus secara spontan pada sapi sehingga menimbulkan kerugian ekonomi, oleh karena itu diperlukan upaya pengendalian dan pemberantasan. Pendalian brucellosis di daerah endemis dilakukan melalui vaksinasi, untuk meminimalisir kerugian ekonomi yang disebabkan oleh abortus, infertilitas, anak yang lemah dan penurunan produksi susu (Avila-Calderón *et al.*, 2013).

LPS merupakan bagian terbesar dari struktur *outer membrane* bakteri Gram negative. LPS merupakan *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) yang paling banyak diteliti dari *Brucella*. LPS bersifat sebagai imunostimulan sangat berpotensi sebagai kandidat vaksin subunit (Simborio *et.al.*, 2014).

Pengenalan keberadaan LPS oleh sel seperti monosit dan makrofag telah berkembang selama berabad abad memungkinkan hospes mamalia mengenali dengan cepat dan memberikan reaksi terhadap infeksi oleh bakteri Gram negatif. Respon cepat bawaan terhadap LPS ditandai dengan keterlibatan pelepasan mediator proinflamasi, seperti TNF- α , IFN γ , IL-2, IL-6, IL-12 dan IL-1 β , pada lokasi infeksi dengan tingkat moderat yang akan menguntungkan hospes dengan timbulnya inflamasi dan diikuti dengan priming sistem imun untuk mengeliminasi organisme penyerang (Cardoso *et al.*, 2006).

IFN γ mengaktifkan bactericidal machinery dari makrofag, meningkatkan ekspresi antigen-presenting dan sebagai molekul costimulatory pada APC, menstimulasi CTL-mediated cytotoxicity dan meningkatkan potensi kematian makrofag yang terinfeksi melalui apoptosis (Baldwin dan Goenka, 2006).

LPS *Brucella* juga memiliki kemampuan untuk membangkitkan sekresi IL-2. IL-2 adalah glycoprotein yang pada awalnya dikenal dengan T cell growth factor (TCGF). Interleukin ini terutama disekresi oleh sel T helper teraktivasi, bertindak sebagai growth factor/aktivator bagi sel T, sel NK dan sel B serta membantu perkembangan dari sel-sel lymphokine-activated killer (LAK). Oleh karena itu IL-2 memegang peranan penting dalam mengatur respon imunologis baik seluler ataupun humoral. Ikatan IL-2 ke reseptor IL-2 pada limfosit T menyebabkan

proliferasi sel, peningkatan sekresi limfokin dan penguatan ekspresi molekul MHC II (Shaikh, 2011; Golding et al., 2001; Jiang and Baldwin, 1993).

Lymphocyte B mengatur respon imunitas humoral pada *adaptive immunity*, ditandai dengan produksi antigen-spesifik antibodi. Selain efek netralisasi, antibodi bertindak sebagai opsonin yang memfasilitasi fagositosis bakteri oleh APCs, komplemen aktif dan meningkatkan antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) oleh makrofag, neutrophil dan sel NK. Pada keadaan tertentu, sel B mempresentasikan antigen yang dapat mengaktivasi imunitas seluler (Baldwin dan Goenka, 2006).

Meskipun peranan dari imunitas humoral terhadap infeksi bakteri intraseluler adalah terbatas dan tidak protektif, opsonisasi yang dimediasi oleh antibodi (oleh immunoglobulin IgM, IgG1, IgG2a dan IgG3) meningkatkan fagositosis bakteri pada tingkat infeksi awal infeksi *Brucella* yang berdampak terhadap kelanjutan infeksi intraseluler *Brucella* (Baldwin dan Goenka, 2006). Dari sudut pandang klinis, deteksi antibodi terhadap Br-LPS secara umum digunakan untuk diagnosa brucellosis pada hewan ternak dan manusia (Al Dahouk et al., 2003).

Sekresi dari mediator proinflamasi, seperti $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-6, IL-12 dan IL-1 β , pada lokasi infeksi dengan tingkat moderat yang akan menguntungkan hospes dengan timbulnya inflamasi dan diikuti dengan priming sistem imun untuk mengeliminasi organisme penyerang, hal ini dapat dievaluasi dengan kuantifikasi *B. abortus* pada organ limpa dari hospes (Cardoso et al., 2006).

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi penelitian: isolat isolat lapang *B. abortus* diperoleh dari Balai Besar Veteriner Maros, vaksin RB51, vaksin subunit LPS *Brucella* dengan adjuvant $\text{Al}(\text{OH})_3$ (SLPS $\text{Al}(\text{OH})_3$) dan vaksin subunit LPS *Brucella* dengan adjuvant Montanide (SLPS montanide), mencit (*Mus musculus*) BALB/C, PBS steril, di ethyl ether, crystal violet 0.05%, hydrogen peroxide 3%, dryslide-oxidase, lead acetate paper, methanol, thionin, thionin blue, safranin O, basic fuchsin, sheep Blood Agar, MacConkey Agar, Nutrient Agar, Urea broth/ slope, Serum Dextros Agar *microplate* dan slope, Dextrose Agar Base.

Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data.

28 ekor mencit (*Mus musculus*) dikelompokkan dalam empat kelompok dengan tiap kelompok terdiri atas tujuh ekor mencit.

Kelompok I sebagai kontrol diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml NaCl fisiologis steril; kelompok II diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml SLPS $\text{Al}(\text{OH})_3$ (kandungan SLPS 10 μg); kelompok III diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml SLPS montanide (kandungan SLPS 10 μg); dan kelompok IV diinjeksi subkutaneus dengan 0,1 ml vaksin RB51 mengandung 10^5 CFU (OIE, 2009).

Ujiantang dilakukan pada 30 hari pasca vaksinasi menggunakan *B. abortus* isolat lapang Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan dengan menginjeksikan suspensi *B. abortus* yang mengandung 2×10^5 organisme sebanyak 0,1 ml secara intra peritoneal. 15 hari pasca ujiantang, mencit dibunuh dan organ limpa diambil secara aseptis untuk dilakukan penghitungan koloni.

Evaluasi efikasi protektif

Efikasi protektif vaksin diukur melalui kuantifikasi bakteri yang diisolasi pada limpa mencit pasca dilakukan ujiantang. Ujiantang dilakukan 30 hari pasca vaksinasi menggunakan menggunakan isolat lapang *B. abortus* dari Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan, konsentrasi mikroorganisme 10^5 CFU/mencit. Mencit dibunuh 15 hari setelah ujiantang, secara dislokasi servikal, limpa mereka diambil secara aseptis, limpa kemudian dimaserasi dan dilarutkan dengan NaCl fisiologis dengan perbandingan 1/10, dari larutan limpa tersebut dilakukan pengenceran pada tingkat 10-1, 10-2 dan 10-3. Isolasi dilakukan dengan menginokulasikan 0,2 ml larutan tiap pengenceran pada media trypticase soy agar secara duplo, kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO_2 10% selama 3 sampai 7 hari.

Penghitungan jumlah koloni yang terbentuk (colony forming unit/ CFU) hanya dilakukan pada plate dengan jumlah koloni antara 30-300 CFU. Nilai rata-rata dari dua ulangan pada tiap-tiap pengenceran ini dianggap sebagai rata-rata jumlah CFU *B. abortus* tiap mencit. Jumlah rata-rata CFU *B. abortus* per limpa kemudian dicatat sebagai X dan kemudian dinyatakan sebagai Y, setelah ditransformasi menggunakan formula: $Y = \log (X/\log X)$. Imunogenitas vaksin dinyatakan dengan rata-rata Y dan standard deviasi (SD), sedangkan efikasi protektif diperoleh dengan jalan melakukan pengurangan rata-rata Y kelompok perlakuan dengan rata-rata Y kelompok kontrol. Validitas eksperimen masuk dalam kriteria memuaskan apabila: i) respon mencit yang tidak divaksinasi vaksin (rata-rata Y) paling tidak 4,5; ii) respon mencit yang divaksinasi vaksin referensi kurang dari 2,5; dan iii) nilai SD setiap perlakuan kurang dari 0,8 (OIE, 2009; Grillo et.al., 2012; Al Mariri and Abbady, 2013; Goel et al., 2013; Jain et al., 2014).

Analisis Data

Data eksperimental yang diperoleh dianalisa menggunakan ANOVA *single factor* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan, kemudian dilanjutkan dengan *Least Significant Different* (OIE, 2009; Grillo *et.al.*, 2012; Jain *et al.*, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat efikasi protektif ditentukan dengan nilai *colony forming unit B. abortus* pada limpa *Mus musculus*. Vaksinasi menggunakan RB51 menghasilkan tingkat efikasi protektif yang lebih tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan dengan penggunaan vaksin lainnya, dengan nilai log 10 unit proteksi mencapai 1,82. Perbandingan tingkat efikasi protektif pada tiga kelompok lainnya yaitu SLPS Montanide, SLPS Al(OH)₃ dan kontrol juga ditemukan perbedaan yang nyata ($p < 0,01$) secara berurutan.

Tabel 1. Log (CFU/ log CFU) *B. abortus* pada limpa *Mus musculus*

Kelompok	Vaksin	Log (CFU/ log CFU) <i>B. abortus</i> pada limpa (rata-rata $\pm$ SD)	Nilai Unit Proteksi
1	NaCl fisiologis	4,73 ^a $\pm$ 0.01	—
2	SLPS Al(OH) ₃	3.37 ^b $\pm$ 0.01	1.37
3	SLPS Montanide	3.24 ^c $\pm$ 0.03	1.50
4	RB51	2.92 ^d $\pm$ 0.03	1,82

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,01$)

Hasil evaluasi tingkat efikasi protektif vaksin yang dilakukan pada penelitian ini memperkuat teori tentang peran utama imunitas seluler, terutama diperankan oleh IFN γ dalam resistensi terhadap infeksi *B. abortus*. Tingkat sekresi IFN γ berkorelasi positif dengan *bacterial clearance* pada limpa mencit. Terdapat perbedaan yang sangat signifikan tingkat colony forming unit pada limpa mencit pasca uji tantang menggunakan isolate *B. abortus* virulen antara vaksinasi menggunakan RB51, SLPS montanide, SLPS Al(OH)₃ dan kontrol, secara berurutan. Hasil serupa juga dijumpai pada penelitian Pasquali *et.al.* (2001) yang menyatakan responses proteksi yang diinduksi oleh vaksinasi menggunakan vaksin *B. abortus* RB51 lebih didasarkan pada *cell-mediated immunity* dan antibodi memegang peranan minor.

Peran utama sel T dalam imunitas terhadap *Brucella* adalah sekresi IFN γ , untuk mengaktivasi fungsi bakterisidal makrofag dan aktivitas sel T sitotoksik, demikian pula dengan

IgG2a dan IgG3 *isotype switching* (Ko and Splitter, 2003; Skendros and Boura, 2013). Pentingnya IFN γ dalam proteksi terhadap infeksi *Brucella* didukung oleh penelitian menggunakan mencit BALB/c dan C57BL/6 IFN $\gamma^{-/-}$ yang diinfeksi dengan *B. abortus* strain 2308, mencit terinfeksi ini mengalami kematian enam minggu pasca infeksi (Murphy *et.al.*, 2001).

Berdasarkan hasil evaluasi respon isotype IgG, dapat disimpulkan bahwa peran respon imun humoral atau antibodi dalam proteksi terhadap infeksi *Brucella* adalah moderat. Vaksin berbasis SLPS dengan dua adjuvant yang berbeda mampu menginduksi sel B untuk memproduksi titer IgG yang tinggi. Hasil analisa isotype IgG, bahkan menempatkan vaksin subunit montanide sebagai vaksin yang memiliki kemampuan terbaik dalam menginduksi sekresi IgG2a, hal ini sekaligus memberikan bukti bahwa adjuvant montanide dapat menginduksi respon imun seluler. Namun demikian walaupun mampu menginduksi sel B untuk memproduksi IgG yang tinggi, efikasi protektifnya tidak sebaik RB51.

Hasil dari beberapa penelitian tentang imunisasi pasif menggunakan antibodi menunjukkan signifikansi imunitas humoral dalam murine brucellosis, sebagai contoh, imunisasi pasif menggunakan serum yang mengandung antibodi anti-LPS terhadap mencit dapat memproteksi terhadap uji tantang *B. abortus* virulen (Montaraz and Winter, 1986; Araya *et.al.*, 1989; Winter *et. al.*, 1989). Penelitian lain tentang imunisasi pasif antibodi monoclonal spesifik-O-polysaccharida *B. abortus* (IgG2a) dapat mengurangi infeksi bacterial pada mencit atau memproteksi mencit dari infeksi *B. abortus* (Phillips *et.al.*, 1989; Charachon *et.al.*, 1997). IgG2a dan IgG3 adalah isotype antibodi dominan yang terdeteksi dari mencit terinfeksi, serupa pada hospes alami, membuktikan bahwa respon imun sel Th1 terhadap infeksi *Brucella* juga terlibat (Elzer *et.al.*, 1994; Ko and Splitter, 2003; Deenick 2005).

Opsonisasi dan kemungkinan bersama dengan penguatan *intracellular killing*, dianggap prinsip utama mekanisme proteksi yang diperankan oleh antibodi terhadap infeksi terhadap infeksi *Brucella*. Meskipun di dalam beberapa laporan penelitian tentang adanya peran dari imunitas humoral dalam resistensi terhadap brucellosis, namun kemampuan antibodi untuk melindungi hospes masih tampak sebagai kontroversi, sebagai contoh *B. abortus* RB51 strain yang tidak memiliki O-polysaccharida masih dapat memberikan proteksi terbaik sebagai strain vaksin, hal ini mengindikasikan bahwa proteksi imun kemungkinan tidak melibatkan antibodi spesifik-O-polysaccharida (Schurig *et.al.*, 1991; Pasquali *et.al.*, 2001). juga pada bovine

brucellosis, konsentrasi IgG yang tinggi selama infeksi aktif akan mencegah *extracellular bacterial lysis* yang dimediasi oleh komplemen dan menyebabkan fagositosis bacterial, yang memungkinkan terjadinya infeksi intraselular dan memperpanjang daya hidup bakteri (Hoffmann and Houle, 1995).

KESIMPULAN

Tingkat efikasi protektif vaksin subunit SLPS montanide dan SLPS Al(OH)₃ berbeda sangat nyata dibandingkan dengan kontrol, namun belum mampu menyamai tingkat efikasi protektif vaksin *live attenuated* RB51.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mariri, A. and A. Q. Abbady. 2013. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy in mice of a DNA vaccine encoding SP41 from *Brucella melitensis*. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7(4):329-337.
- Al Dahouk, S., Tomaso H., Nockler K., Neubauer H. and Frangoulidis D. 2003. Laboratory-based diagnosis of brucellosis – a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clin. Lab.* 49:577–589.
- Araya, L. N., P. H. Elzer, G. E. Rowe, F. M. Enright and A. J. Winter. 1989. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.* 143:3330–3337.
- Avila-Calderón, E.D. , A. L. Merino, N. Sriranganathan, S. M. Boyle and A. Contreras-Rodríguez. 2013. Review Article: A History of the Development of *Brucella* Vaccines. Hindawi Publishing Corporation. BioMed. Res. Inter.
- Baldwin, C.L. and R. Goenka. 2006. Host immune responses to the intracellular bacterium *Brucella*: does the bacterium instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit. Rev. Immunol.* 26: 407–442.
- Cardoso, P. G., G. C. Macedo, V. Azevedo and S. C. Oliveira. 2006. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *J. Microbial Cell Factories.* 5:13.
- Deenick, E. K., J. Hasbold and P. D. Hodgkin. 2005. Decision Criteria for Resolving Isotype Switching Conflicts by B cells. *Eur. J. Immunol.* 35: 2949–2955.
- Elzer, P. H, R. H. Jacobson, K. H. Nielsen, J. T. Douglas and A. J. Winter. 1994. BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted polyclonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes. *Immunol. Lett.* 42: 145–150.
- Golding, B., D. E. Scotta, O. Scharf, L. Y. Huang, M. Zaitseva, C. Lapham, N. Ellera and H. Golding. 2001. Immunity and Protection Against *Brucella abortus*. *J. Microb. Infect.* 3: 43-48

- Goel, D., V Rajendranb, P. C. Ghosh and R Bhatnagar. 2013. Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent *Brucella abortus* 544. *Vaccine* 31: 1231– 1237. www.elsevier.com/locate/vaccine.
- Grilló, M.J., J.M. Blasco, J.P. Gorvel, I. Moriyón and E. Moreno. 2004. What have we learned from brucellosis in the mouse model?. *Veterinary Research*.43: 29. <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/29>.
- Hoffmann, E. M. and J. J. Houle. 1995. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. *Crit. Rev. Microbiol.* 21: 153–163.
- Jain, S., P. Afley, S.K. Dohre, N. Saxena and S. Kumar. 2014. Evaluation of Immunogenicity and Protective Efficacy of Plasmid DNA Vaccine Encoding Ribosomal Protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/C Mice. *J. Vacc.* 32: 4537-4542. www.elsevier.com/locate/vaccine.
- Ko, J. and A.G. Splitter. 2003. Molecular Host-Patogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1): 65–78.
- Montaraz, J. A. and A. J. Winter. 1986. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 53: 245–251.
- Murphy, E. A, J. Sathiyaseelan, M. A. Parent, B. Zou and C. L. Baldwin. 2001. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology* 103: 511–518.
- OIE. 2009. Bovine Brucellosis. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health Chapter 2.4.3.
- Pasquali, P., R. Adone, L. C. Gasbarre, C. Pistola and F. Ciuhini. 2001. Mouse Cytokine Profiles Associated with *Brucella abortus* RB51 Vaccination or *B. abortus* 2308 Infection. *J. Infect and Immun.* 69(10): 6541-6544.
- Phillips, M., B. L. Deyoe and P. C. Canning. 1989. Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella* O-antigen. *Am. J. Vet. Res.* 50:2158–2161.
- Simborio, H.L.T., A. W. B. Reyes, H. T. Hop, L. T. Arayan, W. Min, H.J. Lee, H. H. Chang and S. Kim. 2014. Strategies for the development of an effective vaccine against Brucellosis. *J. Prev. Vet. Med.* Vol. 38(2): 53-60. <http://dx.doi.org/10.13041/jpvm.2014.38.2.53>
- Skendros, P. and P. Boura. 2013. Immunity to Brucellosis. *Rev. sci. tech. Off. int.*
- Winter, A. J., J. R. Duncan, C. G. Santisteban, J. T. Douglas and L. G. Adams. 1989. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.* 57:3438 – 3444.