



PUSAT VETERINER FARMA
DITJEN PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
KEMENTERIAN PERTANIAN

LAPORAN KARYA TULIS ILMIAH

**Literature Review : Apakah Vaksin Brucella S19 Masih Dapat
Diandalkan dalam Pengendalian Brucellosis di Indonesia?**

Dewi Noor Hidayati; Ida Arlita Wulandari ; Saptorini Budi Prasetyowati

LAPORAN KARYA TULIS ILMIAH



Juli 2021

Perpustakaan Pusat Veteriner Farma Surabaya

PERPUSTAKAAN PUSAT VETERINER FARMA SURABAYA	
No. Induk	: 100-111-111-111 / PVF/2021
No. Klas	:
Tgl / Tempat	:



Literature Review : Apakah Vaksin Brucella S19 Masih Dapat Diandalkan dalam Pengendalian Brucellosis di Indonesia?

Hidayati, D.N^a ; Wulandari, I.A^b ; Prasetyowati, S.B^c

^a Medik Veteriner Muda Pusat Veteriner Farma, Surabaya, Indonesia

^b Kepala Seksi Pengembangan Produk Pusat Veteriner Farma, Surabaya, Indonesia

^c Kepala Bidang Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produk Pusat Veteriner Farma, Surabaya, Indonesia

Abstrak

Tujuan review. Brucellosis merupakan salah satu penyakit strategis di Indonesia yang disebabkan oleh *B. abortus* dan *B. Suis*. Bakteri ini termasuk dalam golongan bakteri gram negatif, fakultatif intraseluler, dan memiliki faktor virulensi pada lipopolisakarida-O (LPS-O). Pemerintah Indonesia menerapkan program vaksinasi dan potong bersyarat dalam pemberantasan brucellosis di Indonesia. Vaksin yang beredar di Indonesia adalah Strain 19 yang diproduksi Pusvetma dan Strain RB-51 yang merupakan produk import. Review ini ingin mengulas sifat dan kelebihan vaksin brucella yang ada di Indonesia, khususnya tentang efektifitas dan keamanan penggunaan vaksin.

Penemuan terbaru. Kasus terbaru dilaporkan oleh CDC Amerika tentang adanya infeksi brucellosis pada manusia di Pennsylvania yang mengkonsumsi susu mentah, yang terkonfirmasi mengandung brucella strain RB-51. Karena strain ini resisten terhadap antibiotik pennicilin dan rifampin, pengobatan terhadap kasus ini memerlukan penanganan khusus.

Kesimpulan. Vaksin S19 dan vaksin RB-51 keduanya memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing yang saling melengkapi. Produk lokal S19 tidak kalah dengan produk import.

Pendahuluan

Brucellosis merupakan penyakit zoonotik yang telah menyebar di seluruh dunia. Penyakit ini muncul karena adanya domestikasi hewan yang dilakukan manusia. Kejadian brucellosis awalnya banyak terjadi di daerah Mediterania, dan sejarahnya dikaitkan dengan kampanye militer (1). Brucellosis pertama kali ditemukan di Indonesia oleh Kirschner and Kunst tahun 1915 pada sapi yang mengalami abortus di Bandung, Jawa Barat dan disepanjang pantai timur Sumatera (2). Beberapa orang kemudian dinyatakan mengalami gejala demam undulan (*undulant's fever*) atau *Malta's fever* yang merupakan manifestasi infeksi *Brucella* sp. di manusia (3).

Kajian penyakit brucellosis di Indonesia telah banyak dilakukan, seiring dengan meningkatnya kejadian abortus, gangguan reproduksi dan infertilitas pada ternak, diantaranya oleh (4, 5, 6). Istilah penyakit keluron menjadi istilah umum di Indonesia yang diartikan sebagai brucellosis (7, 8). Brucellosis menjadi salah satu penyakit hewan strategis di Indonesia (9), dengan diterbitkannya Keputusan Menteri Pertanian

No:4026/Kpts/OT.140/04/2013, yaitu penyakit yang disebabkan oleh *Brucella abortus* maupun *Brucella suis*, karena daya infeksius penyakit ini dan kerugian ekonomi yang ditimbulkannya.

Brucella abortus adalah bakteri gram negatif, masuk dalam genus *Brucella*, familia α 2-Proteobacteriaceae dan merupakan patogen coccobacilli intraseluler fakultatif (10). *Brucella sp* terkategori berdasarkan hospes yang spesifik, seperti *Brucella abortus* diisolasi dari sapi, *B. suis* diambil dari babi, *B. melitensis* diisolasi dari kambing dan domba, *B. canis* dari anjing dan *B. neotomae* dari tikus (1). Baru-baru ini ditemukan spesies baru, yaitu *B. ceti* dan *B. pinnipedialis* yang diisolasi dari jenis cetacea (jenis ikan paus) dan *pinnipedis* (hewan berkapit) (11). Outbreak brucellosis biasanya ditandai dengan terjadinya abortus pada kebuntingan trimester terakhir, kelahiran anak sapi yang lemah, dan infertilitas sapi jantan (12). Penyebaran brucellosis dapat terjadi melalui sapi betina yang tidak menunjukkan gejala klinis / asimtomatik (13), karena terkadang sapi yang pernah mengalami abortus, selanjutnya dapat menunjukkan kelahiran yang normal (10), penularan juga dapat melalui air susu. Abortus sendiri sebenarnya tidak hanya disebabkan oleh *B. abortus*. Penyakit lainnya yang memiliki gejala abortus mirip brucellosis adalah *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR), leptospirosis (14, 15), dan *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) (16). Gejala lain brucellosis kronis yang spesifik adalah "*carpal hygromas*" atau pembengkakan bagian sendi carpus (17).

Analisis Kerugian Ekonomi

Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh brucellosis mencapai 3,6 trilyun rupiah atau bernilai 1,8% dari nilai total aset ternak di Indonesia (18). Tingginya nilai kerugian ini disebabkan oleh tingkat keparahan penyakit (prevalensi), program pengendalian penyakit, dan asumsi harga yang digunakan untuk menghitung kerugian tersebut (18). Tindakan pengendalian adalah segala macam upaya yang dilakukan untuk menekan kejadian penyakit serendah-rendahnya (19). Kerugian ekonomi ini dapat ditimbulkan karena kerugian langsung dan kerugian tidak langsung. Kerugian langsung disebabkan karena penurunan produksi susu, penurunan bobot pada sapi pedaging, mortalitas dan penurunan harga ternak. Kerugian tidak langsung meliputi biaya vaksinasi, pemotongan bersyarat, biaya surveilans, biaya disinfeksi dan disposal, serta biaya KIE (18).

Kebijakan Pemerintah dalam Pengendalian Brucellosis di Indonesia

Program pengendalian brucellosis di Indonesia dilakukan dengan menetapkan prioritas di suatu wilayah dengan berdasarkan: 1) potensi daerah; 2) kepadatan ternak; 3) tingkat prevalensi ; 4) resiko penyebaran ke tempat lain; 5) kerugian ekonomi yang diakibatkan; dan 6) komitmen kepala daerah. Implementasi program diatas dilakukan dengan bertahap dan terukur waktu. Surveilans dasar dilakukan untuk mengetahui status awal suatu penyakit. dan tindakan vaksinasi dilakukan pada daerah berprevalensi >2 dan menerapkan potong bersyarat bagi ternak yang terdeteksi positif dengan uji RBT dan CFT. Pemerintah menyediakan kompensasi bagi peternak yang ternaknya dipotong bersyarat (20).

Epidemiologi Penyakit

Brucellosis dapat ditularkan melalui kontak dengan ternak sakit, kontaminasi dari hasil produk peternakan seperti susu, daging, yoghurt, dan keju yang mengandung kuman brucella. Susu mentah atau yang belum dipasteurisasi dapat menyebabkan brucellosis. Begitu pula konsumsi daging (terutama jerohan) yang setengah matang dapat pula menyebabkan brucellosis (21). Infeksi juga dapat terjadi di laboratorium yang tidak menerapkan standar biosekuriti yang memadai dalam pengujian kuman brucella, dengan cara ingesti, inhalasi, kontak kulit yang tidak sengaja dengan kuman brucella. Beberapa laporan tentang kasus brucellosis di manusia adalah sebagaimana yang pernah dilaporkan di Qatar, kasus utama brucellosis disana adalah karena konsumsi susu unta mentah (*unpasteurized*) dan kasus kedua terbanyak adalah karena konsumsi daging mentah (34).

Sejarah Pembuatan Vaksin Strain S19 oleh Pusvetma

Vaksin Brucivet diproduksi oleh Pusvetma sejak tahun 1978 – 1979, bekerja sama dengan Central Veterinary Lab. Weybridge U.K (22). Selain seed S19, Pusvetma juga mendapat seed *B. abortus* strain 99 dan strain 1119 untuk dijadikan sebagai antigen diagnostik pada pengujian RBT (*Rose Bengal Test*) dan CFT (*Complement Fixation Test*). Strain ini dipilih karena merupakan strain *B. Abortus* biovar 1 yang stabil dan dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan CO₂ independen. Di dalam kandungan vaksin ini tidak ditambahkan bahan-bahan yang bersifat mematikan atau melemahkan kuman, karena vaksin ini adalah vaksin hidup. Sebagai stabilizer dipergunakan campuran tryptone, sukrosa dan sodium glutamat. Bahan-bahan ini tidak bersifat

toksik terhadap hewan dan vaksin yang disuntikkan akan mudah diserap oleh tubuh. Sebelum dipakai vaksin terlebih dulu dilarutkan dalam larutan garam faali. Vaksin disuntikkan pada sapi betina umur 3-9 bulan.

Awal produksinya, Pusvetma mampu memproduksi 1000 vial vaksin (22). Pada tahun 1994, pemerintah menetapkan program "Pemberantasan Brucellosis" secara nasional seiring peningkatan penyakit ini. Pengendalian penyakit brucellosis menempati urutan prioritas nomor dua, sedangkan urutan pertama diprioritaskan untuk pembebasan rabies. Pusvetma berperan dalam program tersebut, dengan penambahan produksi vaksin. Berdasarkan laporan penelitian pada tahun 2003 pernah dilakukan usaha untuk pengembangan vaksin menggunakan isolat lapangan yang didapatkan dari Malang, Jawa Timur. Namun hasilnya belum sebaik menggunakan *seed* S19 (33). Laporan oleh (4) menginformasikan isolat lapangan yang didapatkan dari Sulawesi Selatan dan Papua memiliki jarak genetik yang berdekatan dengan isolat dari Switzerland, Amerika, dan isolat dari Zimbabwe (4). Perhitungan ini didasarkan pada MLVA (*Multiple Locus Variable Analysis*). Hal ini menunjukkan bahwa isolat di Indonesia merupakan hasil persebaran dari negara lain. Penelitian dan pengembangan isolat Indonesia ini perlu untuk dikaji lebih lanjut.

Kelebihan Vaksin Brucella S19

Vaksin Brucella yang umum digunakan di dunia adalah vaksin aktif yang diisolasi dari strain S19 dan strain RB51. Vaksin S19 telah digunakan lebih dari tujuh dekade (23). Vaksin ini dibuat dengan proses atenuasi natural pada tahun 1923. Vaksin S19 merupakan vaksin hidup / *live* tergolong dalam brucella biotype 1 yang mengandung mikroorganisme yang dilemahkan, stabil, koloni *smooth*, dan memiliki daya imunogenitas dan antigenisitas yang tinggi (24). Sebaliknya, vaksin RB51 dibuat dengan mempasasekan mikroorganisme secara berulang kali pada media yang mengandung rifampin sehingga menyebabkan mutasi koloni menjadi *rough*, memiliki lipopolisakarida (LPS) yang *incomplete*, karena transposisi gen IS711 pada gen *wboA* dari *B. Abortus* strain 2308 (25). Genetic drift ini menyebabkan hilangnya virulensi dan antigenesitas *B.abortus*, mutasi inilah yang menyebabkan tidak terjadinya sero-interferensi pada test serologi rutin (23), namun tidak menimbulkan daya imunogenitas yang sebaik strain S19 (26). Lipopolisakarida (LPS) pada brucella, khususnya LPS-O berperan sebagai faktor virulensi pada mikroorganisme *Brucella sp.* (27). Meskipun vaksin S19 tidak direkomendasikan untuk hewan bunting, dan hanya baik untuk

hewan muda (antara 3-9 bulan) (23), namun vaksin S19 terbukti menghasilkan imunitas yang lebih panjang dan efektif (28) dibandingkan dengan vaksin RB51.

Menurut (29) strain 19 memiliki kelebihan antara lain : (i) Strain 19 tidak memerlukan tambahan CO₂ pada saat pertumbuhannya ; (ii) Strain 19 sensitif terhadap thionin blue ; (iii) lebih sensitif terhadap penicillin ; (iv) strain 19 lebih sensitif terhadap safranin O.

Apakah Vaksin RB-51 lebih baik ?

Vaksinasi merupakan cara untuk pencegahan untuk suatu penyakit. Vaksin Brucella RB51 merupakan vaksin yang dibuat dari hasil mutasi natural *B.abortus* strain 2308, yang diisolasi tahun 1940. *Brucella abortus* strain 2308 diisolasi dari sapi yang mengalami abortus yang telah *ditreatment* oleh beberapa bakteri brucella (30). Pada tahun 2017 (31), telah dilaporkan adanya kasus *foodborne* brucellosis pada manusia yang disebabkan karena mengkonsumsi susu mentah. Hasil konfirmasi bakteri yang mengkontaminasi susu tersebut adalah strain vaksin RB51. Kasus zoonotik lainnya, juga dapat terjadi melalui jarum suntik (32). Kesulitannya adalah, karena secara serologis infeksi bakterial ini tidak terdeteksi, maka monitoring terhadap gejala dilakukan lebih intens. Strain RB51 adalah strain yang tahan terhadap rifampin dan penicillin, sehingga pengobatan terhadap brucellosis yang disebabkan strain vaksin RB51 membutuhkan antibiotik lain yang lebih kuat, seperti doxycycline. Vaksin Brucella RB-51 diproduksi oleh Colorado Co Company, USA.

Saran dan Rekomendasi penggunaan vaksin dalam pedoman pengendalian Brucella di Indonesia

Menurut buku "Road Map Pengendalian dan Penanggulangan Brucellosis" (20), pengendalian brucellosis di Indonesia, dilakukan dengan beberapa strategi berdasarkan pembagian zona / *zoning*. Klasifikasi daerah tersebut terbagi menjadi 4, yaitu: 1) daerah tersangka / daerah yang tidak diketahui prevalensinya, 2) daerah tertular berat; 3) daerah tertular ringan; dan 4) daerah bebas. Kualifikasi daerah tersebut didasarkan pada nilai prevalensi penyakit. Daerah tertular berat adalah dengan prevalensi >2, sedangkan daerah tertular ringan adalah berprevalensi <2.

Pada daerah yang tertular berat disarankan untuk dilakukan vaksinasi. Daerah-daerah tersebut adalah Flores, Timor, Sulawesi Selatan, Aceh, DKI Jakarta dan Jawa Timur. Penggunaan vaksin RB-51 secara intensif telah dilakukan pada peternakan sapi

perah di DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur. Adapun vaksin S19 disarankan digunakan untuk anak berumur 3-9 bulan dan untuk sapi pedaging (20).

Sifat dan Keunggulan Vaksin S19 dan RB-51.

	Strain 19 (pusvetma)	RB-51
Jenis Vaksin	<i>Live attenuated</i>	<i>Live attenuated</i>
Dosis dan pemakaian	Injeksi dilakukan subcutan 1 ml/ ekor	Injeksi dilakukan subcutan 2 ml/ekor
Pemberian	Sekali seumur hidup	Diulang setiap tahun
Kemasan dan harga	Tersedia dalam kemasan 10 dosis / Rp. 210.000	Tersedia dalam kemasan 5 dosis harga 425.000 (<i>blm update</i>) dan 25 dosis.
Umur Simpan	1 tahun, apabila telah dilarutkan, sebaiknya dipergunakan sebelum 1 jam di suhu ruangan.	1 tahun, sama seperti S19.
Kandungan	4-12 X 10 ¹⁰ organisme / 1 ml injeksi	1-3,4 X 10 ¹⁰ organisme/ 2 ml injeksi
Umur Hewan yang divaksin	3-9 bulan	3-12 bulan
Periode <i>withdrawl time</i> sebelum dipotong	3 minggu sebelum di potong	12 minggu sebelum dipotong
Ekskresi air susu	Jarang terjadi	Memungkinkan, dan dilaporkan ada kasus di Amerika tahun 2017'
Antibiotik resisten	Tidak memiliki resistensi terhadap antibiotik	Penicilin dan Rifampin
Imunogenesitas dan antigenesitas	Sangat baik, dibandingkan RB-51	<i>Less virulence</i> karena <i>LPS incomplete</i>
Hewan bunting	Sebaiknya tidak divaksin	Sebaiknya tidak divaksin
Kasus pada manusia	Mudah diobati dengan antibiotik .	Lebih berbahaya, karena resistensi antibiotik.
Test serologis rutin	Terjadi <i>crossreaction</i> dengan uji RBT dan CFT, karena mengandung LPS-O. <i>False</i> positif ini bisa dihilangkan dengan cara mengembangkan test serologis yang	Tidak terjadi <i>cross reaction</i> dengan uji serologis rutin, karena tidak mengandung LPS-O. Test serologi dengan ELISA dan CFT <i>base antigen</i> RB-

	menggunakan gen selain LPS-O sebagai marker untuk membedakan infeksi lapangan dan infeksi vaksin.	51 dapat menunjukkan hasil positif.
--	---	-------------------------------------

Melihat *properties* dari kedua vaksin diatas, tidaklah bijaksana apabila kita hanya mengunggulkan satu macam vaksin saja (RB-51) , dan mengabaikan vaksin yang telah ada (S-19). Amerika menggunakan vaksin RB-51 dalam rangka eradikasi brucellosis di daerahnya, pada saat prevalensi penyakitnya telah menurun. Negara endemik brucellosis, misalnya China, India dan Malaysia masih menggunakan vaksin S19, yang secara eksperimental membuktikan bahwa vaksin S19 dapat menimbulkan sistem kekebalan yang lebih panjang dan lebih baik. Indonesia masih merupakan negara endemik brucellosis dengan adanya beberapa propinsi memiliki angka prevalensi tinggi. Penggunaan vaksin S19 yang memiliki daya imunitas lebih baik dan lebih panjang, serta harga yang terjangkau dapat diandalkan untuk mengendalikan penyakit brucellosis di lapangan. Vaksinasi dengan strain 19 memang membutuhkan recording dan identifikasi yang baik sehingga tidak menimbulkan data yang bias. Namun hal ini dapat diatasi dengan melakukan edukasi dan komunikasi yang baik dengan peternak di lapangan.

Referensi

1. Mantur, B.G. and Amarnath, S.K., 2008. Brucellosis in India—a review. *Journal of biosciences*, 33(4), pp.539-547.
2. Danusantoso, H., Joseph, S.W. and Sidarta, H., 1972. A review of brucellosis in Indonesia with report of a recent case (No. NAMRU-2-TR-519). Naval Medical Research Unit No 2 Manila (Philippines).
3. Tian, M., Song, M., Yin, Y., Lian, Z., Li, Z., Hu, H., Guan, X., Cai, Y., Ding, C., Wang, S. and Li, T., 2020. Characterization of the main immunogenic proteins in *Brucella* infection for their application in diagnosis of brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, p.101462.
4. Muflihanah, H., Hatta, M., Rood, E., Scheelbeek, P., Abdoel, T.H. and Smits, H.L., 2013. Brucellosis seroprevalence in Bali cattle with reproductive failure

- in South Sulawesi and *Brucella abortus* biovar 1 genotypes in the Eastern Indonesian archipelago. *BMC Veterinary research*, 9(1), p.233.
5. Dorneles, E.M., Sriranganathan, N. and Lage, A.P., 2015. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary research*, 46(1), p.76.
 6. Gómez, L., Alvarez, F., Betancur, D. and Oñate, A., 2018. Brucellosis vaccines based on the open reading frames from genomic island 3 of *Brucella abortus*. *Vaccine*, 36(21), pp.2928-2936.
 7. Basri, C. and Sumiarto, B., 2017. Taksiran kerugian ekonomi penyakit kluron menular (brucellosis) pada populasi ternak di Indonesia. *Jurnal Veteriner*, 18(4), pp.547-556.
 8. Mathur, R. et al. (2005) Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
 9. Bahri, S. and Martindah, E. (no date) Lokakarya Nasional Ketersediaan IPTEK dalam Pengendalian Penyakit Strategis pada Ternak Ruminansia Besar Kebijakan Pengendalian Penyakit Strategis Dalam Rangka Mendukung Program Kecukupan Daging Sapi 2010.
 10. Neta, A.V.C., Mol, J.P., Xavier, M.N., Paixão, T.A., Lage, A.P. and Santos, R.L., 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, 184(2), pp.146-155.
 11. Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I. and Cloeckaert, A., 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(11), pp.2688-2693.
 12. Enright, F.M., Walker, J.V., Jeffers, G. and Deyoe, B.L., 1984. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. *American journal of veterinary research*, 45(3), pp.424-430.
 13. Wilesmith, J.W., 1978. The persistence of *Brucella abortus* infection in calves: a retrospective study of heavily infected herds. *The Veterinary Record*, 103(8), pp.149-153.
 14. Mariya, R., Srivastava, S.K. and Thangapandian, E., 2007. Seroprevalence of leptospiral antibodies in bovine. *Indian veterinary journal*, 84(5), pp.547-548.

15. Isloor, S., Renukaradhya, G.J. and Rajasekhar, M., 1998. A serological survey of bovine brucellosis in India. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 17, pp.781-785.
16. Gavier-Widén, D., Meredith, A. and Duff, J.P. eds., 2012. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. John Wiley & Sons.
17. McDermott, J.J. and Arimi, S.M., 2002. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), pp.111-134.
18. Basri, C. and Sumiarto, B., 2017. Taksiran kerugian ekonomi penyakit kluron menular (brucellosis) pada populasi ternak di Indonesia. *Jurnal Veteriner*, 18(4), pp.547-556.
19. Putra, A.A.G. *Situasi Penyakit Hewan Menular Strategis Pada Ruminansia Besar: Surveilans Dan Monitoring*. Lokakarya Nasional Ketersediaan IPTEK dalam Pengendalian Penyakit Strategis pada Ternak Ruminansia Besar.
20. Anonim. 2018. *Road Map Pengendalian dan Penanggulangan Brucellosis di Indonesia*. Direktorat Kesehatan Hewan, Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta.
21. Campus, D. H. (2008) 'Brucellosis in India – a review', 33(November), pp. 539–547.
22. Anonim. 1979. *Buletin Pusat Veterinaria Farma: Menjelang peresmian*. Surabaya.
23. Dorneles, E.M., Lima, G.K., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M.S., Martins-Filho, O.A., Sriranganathan, N., Al Qublan, H., Heinemann, M.B. and Lage, A.P., 2015. Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and revaccinated with RB51. *PloS one*, 10(9).
24. Miranda, K.L., Dorneles, E.M.S., Pauletti, R.B., Poester, F.P. and Lage, A.P., 2015. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: Evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1®) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine*, 33(4), pp.507-511.
25. Lalsiamthara, J., Kaur, G., Gogia, N., Ali, S.A., Goswami, T.K. and Chaudhuri, P., 2020. *Brucella abortus* S19 rfbD mutant is highly attenuated, DIVA enable and confers protection against virulent challenge in mice. *Biologicals*, 63, pp.62-67.

26. Mancilla, M., 2016. Smooth to rough dissociation in *Brucella*: the missing link to virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, p.98.
27. Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V. and Oliveira, S.C., 2006. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories*, 5(1), p.13.
28. Patra, B., Panigrahi, M., Ahmad, S.F., Dandapat, S., Kumar, P. and Bhushan, B., 2020. Association of bovine major histocompatibility complex class I (BoLA-A) alleles with immune response to *Brucella abortus* strain 19 in calves. *Veterinary Microbiology*, 242, p.108569.
29. Jones, L.M., Montgomery, V. and Wilson, J.B., 1965. Characteristics of carbon dioxide-independent cultures of *Brucella abortus* isolated from cattle vaccinated with strain 19. *The Journal of infectious diseases*, pp.312-320.
30. Suárez-Esquivel, M., Ruiz-Villalobos, N., Castillo-Zeledón, A., Jiménez-Rojas, C., Roop, I.I., Martin, R., Commerci, D.J., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Caswell, C.C. and Baker, K.S., 2016. *Brucella abortus* strain 2308 Wisconsin genome: importance of the definition of reference strains. *Frontiers in microbiology*, 7, p.1557.
31. Negrón, M.E., Kharod, G.A., Bower, W.A. and Walke, H., 2019. Notes from the Field: Human *Brucella abortus* RB51 Infections Caused by Consumption of Unpasteurized Domestic Dairy Products—United States, 2017–2019. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(7), p.185.
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018. *Brucellosis reference guide. Exposures, testing and prevention*. CDC; 2017 Feb.
33. Sukarso, T.W.E Suryanto, I., Rarasti, P., 2003. Laporan Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi Tahun 2003. Percobaan Pembuatan Vaksin *Brucella Abortus* Menggunakan Isolat Lokal/Strain Lapangan. Surabaya.
34. Garcell, H.G., Garcia, E.G., Pueyo, P.V., Martín, I.R., Arias, A.V. and Serrano, R.N.A., 2016. Outbreaks of brucellosis related to the consumption of unpasteurized camel milk. *Journal of infection and public health*, 9(4), pp.523-527.