

# Producción de interferón gamma en cultivos de sangre completa en respuesta a antígenos de *Brucella abortus* en bovinos vacunados con RB51

## Production of interferon gamma in whole blood cultures in response to *Brucella abortus* antigens in RB51-vaccinated cattle

Marisela Leal-Hernández<sup>ab</sup>, Laura Jaramillo-Meza<sup>a</sup>, Laura Hernández-Andrade<sup>a</sup>, Rafael Pérez-González<sup>b</sup>, Efrén Díaz-Aparicio<sup>a</sup>, Francisco Suárez-Güemes<sup>c</sup>

### RESUMEN

Con el propósito de evaluar la capacidad inductora de la producción de interferón gama de diferentes preparaciones proteínicas, y de los lipopolisacáridos liso y rugoso de *Brucella abortus* en cultivos de sangre completa de bovinos inmunizados con RB51, se seleccionaron animales vacunados y revacunados de un hato con elevada prevalencia de la enfermedad; igualmente, un grupo de animales seronegativos de un hato control fue considerado para valorar la utilidad del ensayo. Cultivos de sangre completa de los animales se estimularon con los antígenos, y con el mitogeno concanavalina A, por un periodo de 24 h a 37 °C; posteriormente se colectaron los plasmas para evaluar el IFN-g liberado, empleando un sistema comercial de ELISA-sandwich. Los resultados expresados en índices de estimulación indican mayor capacidad inductora de la citocina para el extracto sonificado, seguida de las proteínas de citosol y las de membrana interna, para los diferentes grupos; no obstante, en el grupo de animales seropositivos revacunados a pesar de observar una respuesta significativa, ésta fue menor a la que se presentó en los grupos seronegativos, debida probablemente a un cambio en el dominio de las subpoblaciones celulares responsivas a los antígenos de *Brucella*, revelado indirectamente por la presencia de los niveles altos de anticuerpos mostrados. Así, se demuestra que la estimación del INF-g liberado luego de la estimulación *in vitro* de cultivos de sangre completa empleando un extracto sonificado de *Brucella abortus*, es de utilidad para la evaluación y seguimiento de la inmunidad celular en animales vacunados.

**PALABRAS CLAVE:** Bovinos, *Brucella abortus*, Brucelosis, Inmunidad celular, Interferón gamma, RB51.

### ABSTRACT

In order to evaluate the interferon gamma (IFN-g) induction ability of different proteic preparations and that of *Brucella abortus* smooth and rough lipopolysaccharides in whole blood cultures from RB51-immunized cattle, both vaccinated and revaccinated cattle were selected from a herd with high brucellosis prevalence. The assay was validated using a group of serologically-negative cattle from a control herd. Whole blood cultures were stimulated with the different antigens and the mitogen concanavalin A, for 24 h at 37 °C. Plasma supernatants were collected to evaluate the IFN-g released, using a commercially-available sandwich ELISA kit. Results expressed as stimulation indexes showed a higher cytokine-inducing ability for the sonicated extract followed by cytosol proteins and inner membrane protein, for the different groups. Nevertheless, even though boosted, serologically-positive animals showed a significant response lower than that observed in the serologically-negative groups, probably due to a shift in the prevalence of *B. abortus* antigen-responsive cell subpopulations, indirectly revealed by the presence of high antibody levels. Therefore, the usefulness of estimating IFN-g release after the *in vitro* stimulation of whole blood cultures with a sonicated *B. abortus* extract for the evaluation and follow up of cellular immunity in vaccinated cows was demonstrated.

**KEY WORDS:** Cattle, *Brucella abortus*, Brucellosis, Cellular Immunity, Interferon gamma, RB51.

Recibido el 8 de agosto de 2006 y aceptado para su publicación el 15 de diciembre de 2006.

<sup>a</sup> CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Federal México-Toluca, Km 15.5, Cuajimalpa, DF, 05110, México. teléfono / fax: + 52/55.55.70.40.73 jaramillo.laura@inifap.gob.mx Correspondencia al 2° autor.

<sup>b</sup> Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>c</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano, que afecta una gran variedad de mamíferos domésticos y silvestres; se considera una de las zoonosis más importantes debido a su amplia distribución geográfica y a las graves pérdidas que produce a la industria pecuaria, como consecuencia de los efectos negativos que se observan en los procesos productivos y reproductivos de los animales domésticos<sup>(1,2)</sup>. Los programas de control consideran la vacunación como una herramienta viable para reducir las incidencias de la enfermedad, junto con la identificación y eliminación de los animales infectados<sup>(3)</sup>. A este respecto, en los últimos años, se ha promovido más el uso de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* que el de la vacuna S19, por las ventajas que presenta para la identificación de animales infectados. Debido a ello existe interés en estudiar sus atributos en diferentes escenarios, dentro de los que se contemplan la revacunación en zonas de alta prevalencia.

La RB51 es una mutante que deriva de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, carece de la cadena O del LPS lo cual le confiere un fenotipo rugoso<sup>(4)</sup>. La rugosidad de esta cepa se debe a la irrupción del gen *wboA* en el elemento de inserción IS711, el gen codifica para la enzima glicosil-transferasa, que es esencial en cepas lisas virulentas de *B. abortus* para la biosíntesis del antígeno O<sup>(5)</sup>. Debido a estas condiciones, la RB51 no induce la formación de anticuerpos que reaccionen a las pruebas de diagnóstico oficial, siendo posible la diferenciación entre animales vacunados e infectados<sup>(6,7)</sup>.

La resistencia a patógenos intracelulares facultativos como *Brucella*, depende primordialmente de la inducción de una inmunidad específica mediada por células<sup>(8,9)</sup>. Estudios realizados en ratón muestran que la vacuna induce una respuesta celular significativa, que se caracteriza por la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2)<sup>(10,11)</sup>, citocinas que favorecen la diferenciación y activación de varias poblaciones celulares, incluyendo linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores, macrófagos y células NK; células

## INTRODUCTION

Brucellosis is an infectious, contagious disease that affects a broad variety of domestic and wild mammals caused by bacteria of the *Brucella* genus. Brucellosis is considered as a major zoonosis due to its wide geographic distribution, associated with major losses in animal agriculture, as a result of its negative effects in the productive and reproductive processes among domestic animals<sup>(1,2)</sup>. In addition to identifying and eliminating infected animals, brucellosis control programs consider vaccination as a viable tool aiming to reduce disease incidence<sup>(3)</sup>. In recent years, the use of the *B. abortus* RB51 vaccine has been promoted more than the S19 vaccine, since it allows for the discrimination between infected and vaccinated animals. Therefore, interest exists in studying RB51 vaccine attributes under different scenarios, including revaccination in high prevalence areas.

RB51 is a mutant derived from the *B. abortus* 2308 virulent strain, lacking the lipopolysaccharide (LPS) O chain. This determines its rough phenotype<sup>(4)</sup>. The roughness of this strain is due to the irruption of the *wboA* gene at insertion site IS711. The gene codes for the glycosyl transferase enzyme which is essential in smooth, virulent *B. abortus* strains for the biosynthesis of the O antigen<sup>(5)</sup>. This is why the RB51 strain does not induce the production of antibodies reactive to the official diagnostic tests, thus allowing for the discrimination between vaccinated and infected animals<sup>(6,7)</sup>.

Animal resistance to facultative, intracellular pathogens such as *B. abortus* depends mainly on the induction of specific, cell-mediated immunity<sup>(8,9)</sup>. Murine studies show that the vaccine induces a significant cell response characterized by the production of both interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and interleukin 2 (IL-2)<sup>(10,11)</sup>, cytokines that allow for the differentiation and activation of several cell populations including cytotoxic T lymphocytes, helper T lymphocytes, macrophages, and natural killer (NK) cells. These cell populations work in a coordinated manner towards intracellular infection control or elimination<sup>(12,13)</sup>.

que actúan de manera coordinada para controlar o eliminar la infección por el microorganismo intracelular<sup>(12,13)</sup>.

El IFN-g es crucial durante las fases tempranas de la infección, debido a que su actividad se dirige fundamentalmente a los fagocitos mononucleares, en los cuales se incrementa la actividad fagocítica y bactericida; favoreciendo el procesamiento y presentación antigénica, con el propósito de promover el aumento en la producción de citocinas que estimulan la inflamación, la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II<sup>(14)</sup>.

Mediante pruebas de hipersensibilidad tardía en bovinos, se ha mostrado que la vacuna induce una respuesta celular eficiente<sup>(15)</sup>. Sin embargo, existe interés por determinar cuáles son los antígenos de la bacteria relacionados con el desarrollo de la respuesta inmune celular, esencialmente por medio de la producción de IFN-g, inducido por la estimulación *in vitro* de células sensibilizadas a los antígenos de la bacteria. En consecuencia, la finalidad del trabajo fue evaluar y comparar la capacidad inductora de IFN-g de diferentes preparaciones proteínicas, y de los lipopolisacáridos liso y rugoso de *B. abortus*, en cultivos de sangre completa de bovinos vacunados con la cepa RB51.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño experimental*

Se trabajó con 19 vacas Holstein, divididas en cuatro grupos de cinco vacas cada uno, exceptuando el grupo control que quedó integrado de cuatro animales: grupo A, constituido por vacas seropositivas a las pruebas serológicas convencionales, prueba de tarjeta al 8% y rivanol, las cuales fueron revacunadas tres meses antes con  $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ 2 ml con la vacuna RB51; grupo B, estuvo constituido por animales seronegativos a las pruebas serológicas mencionadas, y revacunados a la misma dosis y tiempo que las del grupo A; grupo C, integrado por animales seronegativos y vacunados por primera vez con la vacuna RB51 con la dosis vaca

IFN-g is crucial during the early stages of infection, since its activity mainly focuses mononuclear phagocytes, by increasing their phagocytic/bactericidal activity. This promotes antigen processing/presentation resulting in increased production of cytokines that stimulate inflammation, nitric oxide (NO) production, and the expression of Class II major histocompatibility complex (MHC)<sup>(14)</sup>.

Using delayed hypersensitivity tests in cattle, the vaccine has shown to induce an efficient cell response<sup>(15)</sup>. Nevertheless, interest exists in determining which bacterial antigens are related with the development of the cellular immune response, basically by the production of IFN-g induced by the *in vitro* stimulation of bacterial antigen-sensitized cells. The purpose of this research was to evaluate and compare the IFN-g inducing ability of different proteic preparations and that of smooth and rough *B. abortus* LPS in whole blood cultures from RB51 strain-vaccinated cattle.

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental design*

Nineteen (19) Holstein cows were assigned to three 5-cow treatment groups, and one 4-cow control group. Group A included cows positive to conventional serological tests (8% card, and rivanol), revaccinated 3 mo earlier with the RB51 vaccine containing  $3 \times 10^9$  colony-forming units (CFU) / 2 ml. Group B included animals negative to conventional serological tests, boosted with the same dose and at the same time as Group A. Group C included serologically-negative cows primed with the RB51 vaccine at the cow dose ( $3 \times 10^{10}$  CFU / 2 ml). Group D included serologically-negative, non-vaccinated cows (non treated controls). Animals in groups A and B were belonged to a high brucellosis prevalence herd. Animals in groups C and D belonged to herds subjected to a brucellosis control program.

### *Antigens used for in vitro stimulation*

*B. abortus* preparations used for culture stimulation included outer membrane protein (OMP), inner membrane protein (IMP) sonicated bacterial extract

( $3 \times 10^{10}$  UFC/ 2 ml); mientras que, el grupo D, se integró con animales seronegativos no vacunados (sin tratamiento). Los animales de los grupos A y B, pertenecían a un hato con elevada prevalencia de brucelosis; mientras que los animales de los grupos C y D se localizaban en hatos con un programa de control de la enfermedad.

#### *Antígenos empleados para la estimulación in vitro*

Las preparaciones de *Brucella* que serían utilizados para la estimulación de los cultivos fueron: proteínas de membrana externa (PME), proteínas de membrana interna (PMI), extracto de la bacteria sonicada (S), citosol (C) y el lipopolisacárido (LPS) rugoso, obtenidos de *Brucella abortus* RB51; además se evaluó el LPS liso obtenido de *B. abortus* cepa-19.

#### *Obtención de proteínas de membranas externa, interna y citosol*

Las fracciones subcelulares se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Salas-Tellez *et al.*<sup>(16)</sup>, para lo cual, se cultivó la cepa RB51 de *B. abortus* en placas de agar *Brucella* (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) a 37 °C durante 48 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10 %. Posteriormente, se inactivó con formalina bufferada al 4 % durante 24 h. La suspensión se centrifugó a 12,000 xg por 15 min a 4 °C y se lavó dos veces con buffer de HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazin-N'-[2-ácido etansulfónico]) (Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri; USA) 10 mM pH 7.2. Enseguida, el paquete celular se resuspendió en buffer de Hepes con inhibidores de proteasas: PMSF 0.1 M (fluoruro de fenilmetilsul-fonilo ó fluoruro de  $\alpha$ -toluensulfonilo), PHMB 0.1M (p-hidroxibenzoato de mercurio) y 3 % de EDTA (ácido etilendiaminotetracético). La bacteria se sonicó efectuando ciclos de 10 pulsaciones/10 seg en un Vibra-cell (Sonics, Newtown, Connecticut, USA), los restos celulares se removieron por centrifugación a 8,000 xg por 30 min. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 120,000 xg por 1 h a 4 °C; este nuevo sobrenadante contenía las proteínas citoplasmáticas y el paquete celular las proteínas totales de membrana. Éstas últimas se resuspendieron en HEPES 10 mM con

(S), cytosol (C), and the rough lipopolysaccharide (LPS), all obtained from *B. abortus* RB51 strain. In addition, the smooth LPS from *B. abortus* 19 strain was evaluated.

#### *OMP, IMP, and cytosol separations*

Subcellular fractions were obtained following the method described by Salas-Tellez *et al.*<sup>(16)</sup>. For this purpose, the RB51 strain of *B. abortus* was cultured in *Brucella* agar plates (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) at 37 °C for 48 h, under a 10 % CO<sub>2</sub> atmosphere. The bacterium was then killed with 4 % buffered formalin for 24 h. Suspension was centrifuged at 12,000 xg for 15 min at 4 °C and washed twice with 10 mM N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanolsulfonic acid] (HEPES) buffer (Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri; USA), pH 7.2. Packed cells were immediately re-suspended in HEPES buffer with protease inhibitors, i.e. 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) or  $\alpha$ -toluenesulfonyl fluoride; 0.1M mercury p-hydroxybenzoate (PHMB); and 3 % ethylenediamino tetraacetic acid (EDTA). Bacterial suspension was sonicated using 10 pulsations/10 sec cycles using a Vibra-cell (Sonics, Newtown, Connecticut, USA). Cell debris were removed by centrifugation at 8,000 xg for 30 min. Supernatant was centrifuged at 120,000 xg for 1 h at 4 °C. The new supernatant contained cytosol proteins while the cell package contained total membrane proteins. Total membrane proteins were re-suspended in 10 mM HEPES with 1% sodium N-lauryl-sarcosine under constant stirring for 30 min at 37 °C. The mix was centrifuged at 120,000 xg for 1 h at 4 °C in order to separate OMP from IMP, the latter remaining in the supernatant. Cold ethanol was added separately to the preparations corresponding to each fraction in order to precipitate the proteins at 4 °C overnight. Preparations were then centrifuged at 12,000 xg for 20 min. Protein sediment was allowed to air dry and stored frozen until used. Protein concentration was determined by Bradford's method<sup>(17)</sup>.

#### *Obtaining smooth and rough B. abortus LPS*

The LPS from *B. abortus* 19 and RB51 strains were obtained separately using the method described

N-lauril-Sarcocina de sodio al 1 %, permaneciendo en agitación durante 30 min a 37 °C. La mezcla se centrifugó a 120,000 xg por 1 h a 4 °C para separar las PME de las PMI que se encontraban en el sobrenadante. De manera separada se adicionó etanol frío a las preparaciones correspondientes de cada fracción, para precipitar las proteínas a 4 °C durante toda la noche, después se centrifugó a 12,000 xg por 20 min. El sedimento de proteína se dejó secar por aire y se almacenó en congelación hasta su empleo. La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford<sup>(17)</sup>.

#### *Obtención de LPS liso y rugoso de Brucella abortus*

El LPS de las cepas 19 y RB51 de *B. abortus* se obtuvo separadamente de acuerdo al método descrito por Díaz *et al*<sup>(18)</sup>. Las bacterias se cultivaron en caldo *Brucella* a 37 °C por 48 h en una atmósfera del 10 % de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se inactivaron con formalina bufferada al 4 % durante 24 h; posteriormente los cultivos inactivados se centrifugaron a 6,000 xg durante 20 min, el paquete celular se pesó y lavó con PBS estéril, se suspendió en la misma solución y se metió en autoclave a 121 °C por 15 min, enseguida se centrifugó 10,000 xg por 30 min. Se precipitó el sobrenadante con 3 vol de etanol frío por 24 h, manteniéndose en refrigeración con agitación. El precipitado obtenido se centrifugó a 4,000 xg por 20 min a 4 °C, y se disolvió en agua destilada, para ser dializado. Finalmente se cuantificó empleando la prueba del lisado de limulus de amebocito (QCL-100 Chromogenic limulus amebocyte-lysate; Bio-Whittaker, East Rutherford, New Jersey, USA).

#### *Obtención de extracto crudo total de células completas*

El extracto crudo total se obtuvo a partir de la cepa RB51 de *B. abortus* por sonicación, luego de inactivarla, lavarla y suspenderla en buffer de Hepes con inhibidores de proteasas.

#### *Análisis electroforético de las fracciones subcelulares y LPS*

El análisis de las fracciones subcelulares y lipopolisacáridos se realizó en geles de poliacrilamida en

by Díaz *et al*<sup>(18)</sup>. Bacteria were first cultured in *Brucella* broth at 37 °C for 48 h, under a 10 % CO<sub>2</sub> atmosphere. Cultures were killed with 4 % buffered formalin for 24 h, and centrifuged at 6,000 xg for 20 min. Packed cells were weighed and washed using sterile phosphate buffer solution (PBS), suspended in the same solution and autoclaved at 121 °C for 15 min, then immediately centrifuged at 10,000 xg for 30 min. Supernatant was precipitated with 3 volumes of cold ethanol for 24 h under stirred refrigeration. The precipitate was centrifuged at 4,000 xg for 20 min at 4 °C, and dissolved in distilled water to be dialyzed. Finally, this material was quantified using the Limulus amebocyte lysate test (QCL-100 Chromogenic Limulus amebocyte-lysate; Bio-Whittaker, East Rutherford, New Jersey, USA).

#### *Obtaining whole cell total crude extract*

The total crude extract was obtained from *B. abortus* RB21 strain by sonication following bacterial inactivation, washing and suspension in protease inhibitor-containing HEPES buffer.

#### *Electrophoretic analysis of subcellular fractions and LPS*

The analysis of subcellular fractions and LPS was performed on polyacrylamide gels in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE)<sup>(19)</sup>. A 5% concentrating gel and a 12.5% separating acrylamide gel were used. Electrophoresis was run at 30 mA using a running buffer (Tris-glycine, 0.1% SDS, pH 8.3). Gels were stained with silver nitrate. Alcian blue fixation and periodic acid oxidation were also used for the LPS<sup>(20,21)</sup>.

#### *Sampling*

Blood samples were obtained from animals in the different treatment groups in order to perform conventional *B. abortus* diagnostic serological tests. New samples were obtained 2 weeks later in heparin-containing tubes for the *in vitro* stimulation using the different *B. abortus* subcellular fractions and LPS, considering each of the antigens and concentrations to be assayed in order to determine the best antigen to be used for cell stimulation and

presencia de SDS al 0.1 % (SDS-PAGE)<sup>(19)</sup>, empleando un gel concentrador al 5 % y un gel separador al 12.5 % de acrilamida. Los corrimientos se efectuaron a 30 mA usando un buffer de corrimiento (Tris-glicina, SDS 0.1 %, pH 8.3). Los geles se tiñeron con nitrato de plata, empleando además la fijación con azul de alciano y la oxidación por ácido periódico para los lipopolisacáridos<sup>(20,21)</sup>.

#### *Obtención de muestras*

Los animales de los diferentes grupos se sangraron para efectuar las pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de *Brucella*; dos semanas después, se sangraron nuevamente empleando tubos con heparina, para llevar a cabo la estimulación *in vitro* con las diferentes fracciones subcelulares y lipopolisacáridos de *Brucella*; considerando cada uno de los antígenos y concentraciones a ensayar, a fin de determinar cuál sería el mejor antígeno para la estimulación de las células en la prueba y concentración óptima; como control de estimulación se empleó el mitógeno concanavalina A.

#### *Cultivos de sangre completa*

La sangre total heparinizada se distribuyó en placas de 24 pozos NUNC, Dinamarca), dentro de las primeras horas de muestreo, a razón de 1.5 ml de sangre en los diferentes pozos, tomando en cuenta cada antígeno y concentración a ensayar. Las concentraciones empleadas de las PME, PMI, extracto sonificado, y citosol fueron de 10, 5 y 2.5 mg/ml; en el caso de los LPS-L y del LPS-R fue de 15, 10 y 5 ng por pozo. Como control positivo de estimulación se empleó la concanavalina A y se dejó un pozo sin estimular como control comparativo. Los cultivos se incubaron en cámara húmeda en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C por 24 h; posteriormente las placas se centrifugaron a 1,200 xg por 5 min, para coleccionar los plasmas de los diferentes pozos, en los cuales se evaluó la producción de IFN-g inducida por el estímulo antigénico, mediante un ensayo inmunoenzimático empleando un sistema comercial (Bovigam CSL Veterinary, Australia).

#### *Ensayo inmunoenzimático*

EL ensayo se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, brevemente, 100

its optimum concentration for the test. The mitogen concanavalin A was used as a stimulation control.

#### *Whole blood cultures*

Within a few hours of sampling, heparinized whole blood samples were distributed into 24 well plates (NUNC, Dinamarca), at the rate of 1.5/well, taking into account each antigen and each concentration to be assayed. OMP, IMP, sonicated extract, and cytosol concentrations were 10, 5, and 2.5 mg/ml. Concentrations of LPS-S and LPS-R were 15, 10, and 5 ng/well. Concanavalin A was used as a positive stimulation control. In addition, a non-stimulated well was used as a comparison control. Cultures were incubated in a humid, 5% CO<sub>2</sub> chamber at 37 °C for 24 h. Plates were then centrifuged at 1,200 xg for 5 min, in order to collect the plasma from the wells in which antigen-induced IFN-g production was evaluated using a commercially-available immunoenzymatic assay (Bovigam CSL Veterinary, Australia).

#### *Immunoenzymatic assay*

The assay was performed following manufacturer's specifications. Briefly, 100 ml of each plasma sample collected and diluted (1:2) were added in duplicate to the corresponding micro-titration wells, sensitized with the first bovine IFN-g specific monoclonal antibody. Plates were incubated for 1 h then exhaustively washed. One hundred (100) ml of the second peroxidase-conjugated monoclonal were added. Plates were incubated again for 1 h then washed to discard unbound conjugate. The enzyme substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the chromogen tetramethylbenzidine (TMB) were finally added. Plates were incubated for 30 min then the reaction was stopped. Plates were read using a Bio-Tek ELISA reader with a 450 nm filter. Results were expressed as stimulation indexes obtained by dividing mean stimulated sample optical density (OD) values by the mean non-stimulated control OD value<sup>(22)</sup>.

#### *Statistical analysis*

IFN-g production among antigens, concentrations and groups was compared using a variance analysis. Significant differences were established considering a value of  $P \leq 0.01$ .

ml de cada uno de los plasmas colectados diluidos 1:2, se adicionaron por duplicado a los pozos respectivos de las placas de microtitulación sensibilizadas con el primer anticuerpo monoclonal específico para el IFN-g bovino; después de una incubación de 1 h y un lavado exhaustivo, se adicionaron 100 ml del segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa, incubándose nuevamente por 1 h; posteriormente las placas se lavaron para eliminar el conjugado no ligado y finalmente se adicionó el sustrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el cromógeno tetrametilbencidina (TMB), incubándose por 30 min antes de detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector de ELISA marca Bio-Tek, empleando un filtro de 450 nm. Los resultados se expresaron en índices de estimulación, obtenidos al dividir la media del valor de las densidades ópticas (DO) de la muestra estimulada, entre la media del valor de la DO del control sin estimular<sup>(22)</sup>.

#### Análisis estadístico

La comparación de la producción de IFN-g entre antígenos, concentraciones y grupos, se realizó por medio de un análisis de varianza, donde valores de  $P \leq 0.01$ , fueron considerados para establecer diferencias significativas.

### RESULTADOS

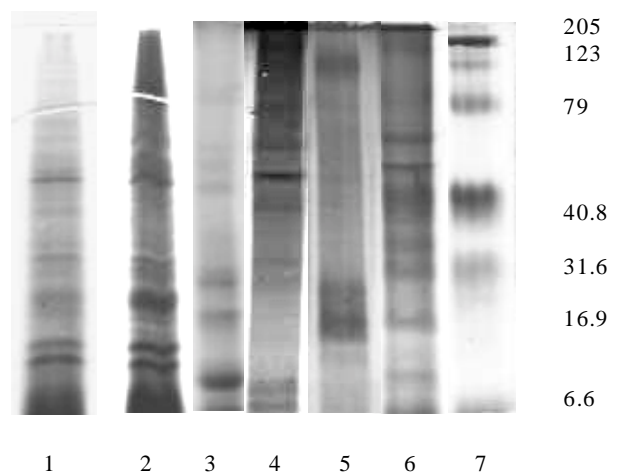
El análisis electroforético de las fracciones subcelulares obtenidas mostró la diferencia y características esperadas una de otra; dentro de ellas, el extracto sonificado constituyó la mezcla más compleja, con un mayor número de proteínas comprendidas en el rango de 240 a 12 kDa, siendo principalmente observables las de 160, 90, 65, 57, 42, 38, 36, 34, 27 y 10 kDa (Figura 1). La fracción que sigue en complejidad es la citoplasmática con bandas principales de 89, 38, 34, 36, 31, 27, 25, 19 y 10 kDa, mientras que la fracción correspondiente a las proteínas de membrana externa derivadas de la cepa vacunal, mostró bandas de 94, 36 a 38, 27 a 25, 19 y 16.5 kDa, siendo las bandas de 94, y de 27 a 25 las más intensamente teñidas. La fracción correspondiente a proteínas de membrana interna,

### RESULTS

The electrophoretic analysis of subcellular fractions showed the expected traits and differences among each other. Within themselves, the sonicated extract was the most complex preparation, with the highest number of proteins within the range of 240 to 12 kDa. The most observable proteins were those with 160, 90, 65, 57, 42, 38, 36, 34, 27, and 10 kDa (Figure 1). The following fraction in terms of its complexity was the cytosol fraction with major bands of 89, 38, 34, 36, 31, 27, 25, 19, and 10 kDa. The vaccine strain-derived OMP fraction included bands of 94, 36 to 38, 27 to 25, 19, and 16.5 kDa, the most intensively-stained bands being that of 94 kDa, and those of 27 to 25 kDa. The IMP fraction showed minor number and concentration of proteins, within the range of 84 and 12 kDa, the most visible ones being those with

Figura 1. Análisis electroforético en SDS-PAGE al 11.5 % de las diferentes preparaciones proteínicas y del lipopolisacárido liso y rugoso obtenidos de *Brucella abortus*

Figure 1. 11.5% SDS-PAGE electrophoresis of the various *Brucella abortus* protein preparations, and smooth and rough lipopolysaccharides



Lane 1, rough LPS; Lane 2, smooth LPS; Lane 3, inner membrane proteins; Lane 4, cytosol; Lane 5, outer membrane proteins; Lane 6, sonicated extract; Lane 7, molecular weight markers.

mostró un menor número y concentración de proteínas, comprendidas en el rango de los 84 y 12 kDa, siendo mayormente visibles las de 30, 25 y 12 kDa. Por otro lado, el análisis electroforético del LPS liso obtenido de la cepa 19 muestra, como era de esperarse, asociación con la cadena O y presencia de varias proteínas, sobre todo una de 26 kDa y un doblete de 15 a 18 kDa. Mientras que en el análisis del LPS rugoso, fue evidente la carencia de la cadena O, y también fueron observables algunas bandas de proteínas, y dentro de ellas, el doblete de 15 a 18 kDa, que también se observó en el LPS liso.

En cuanto a los resultados de inducción de IFN-g en los cultivos estimulados con las diferentes preparaciones proteicas y lipopolisacáridos, la mayor capacidad inductora de la citocina en cuestión se observó en los cultivos estimulados con el extracto sonicado de la cepa RB51 de *B. abortus* en los diferentes grupos revacunados comparando con el grupo sin vacunar, presentando una diferencia significativa con respecto a los otros antígenos, independiente de la concentración ensayada,  $P < 0.01$  (Figura 2).

Después del extracto sonicado, las PMI y el citosol fueron los antígenos que siguieron en capacidad para inducir la producción de IFN-g, en tanto que, la inducción de esta citocina por ambos lipopolisacáridos fue significativa para el LPS rugoso en el grupo vacunado por primera vez, pero no para los otros grupos revacunados; mientras que, con el LPS liso no hubo una diferencia importante al compararla con el grupo testigo ( $P > 0.01$ ), grupo en el cual no se observó producción significativa con alguno de los antígenos.

De acuerdo a los índices de estimulación observados entre grupos tratados, la mayor producción de IFN-g se presentó en los grupos B y C, con los diferentes antígenos proteicos, siendo superior no obstante en los cultivos estimulados con el extracto sonicado. Estos grupos corresponden a animales seronegativos revacunados y vacunados, respectivamente, sin manifestarse diferencias notables entre uno y otro con los antígenos evaluados. En relación al grupo seropositivo, el nivel de producción de

30, 25, and 12 kDa. On the other hand, the electrophoretic analysis of the 19 strain smooth LPS showed an association with the O chain and the presence of several proteins, mainly one of 26 kDa, and a 15-18 kDa duplette, as expected. As far as the Rough LPS analysis is concerned, the absence of the O chain was evident, but some observable protein bands were present, including the 15-18 kDa duplette which was also observed in the smooth LPS.

Regarding IFN-g induction in the cultures stimulated with different protein preparations and LPS, the highest inducing ability of the cytokine in question was observed among cultures stimulated with *B. abortus* RB51 strain sonicated extract in the different revaccinated cow groups, as compared with the non vaccinated group. Significant ( $P < 0.01$ ) differences were observed in all other antigens, regardless of the concentrations assayed (Figure 2).

After the sonicated extract, IMP and cytosol were the antigens that followed in terms of their ability to induce the production of IFN-g, while the induction of this cytokine by both LPS was significant for the rough LPS in the group of first time-vaccinated (i.e. primed) cows, but not so for the other revaccinated (i.e. boosted) groups. No significant ( $P > 0.01$ ) difference was observed with the smooth LPS when compared with the control group, where no significant IFN-g production was observed with any of the antigens.

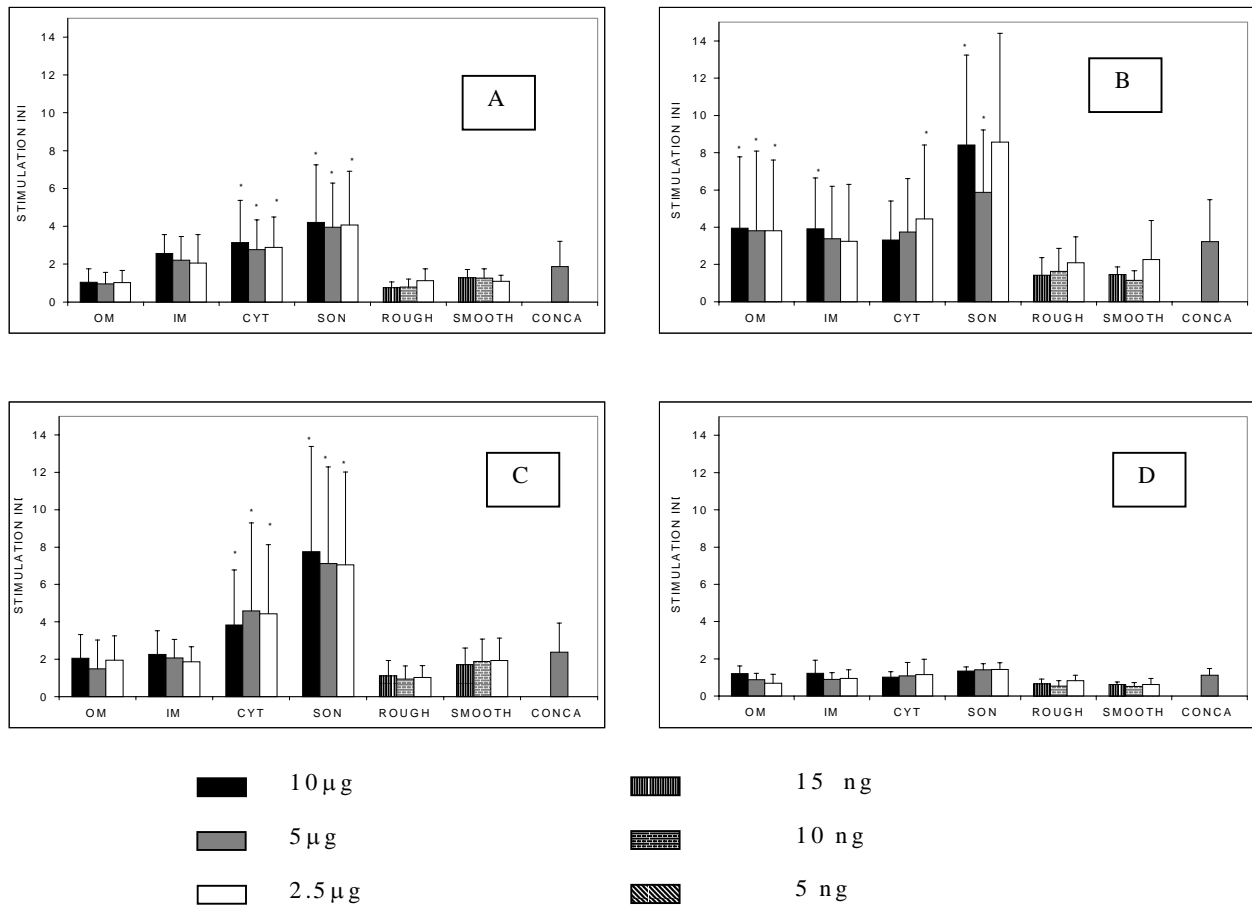
In agreement with the stimulation indexes observed among treatment groups, the highest INF-g production level was observed in groups B and C with the different protein antigens, but such production was higher in the sonicated extract-stimulated cultures. These groups corresponded to serologically-negative, boosted and primed animals, respectively. No remarkable differences were observed among these groups with the antigens evaluated. Generally, IFN-g production in the serologically-positive group was lower than that in the serologically-negative groups. This suggests that the presence of antibodies downregulates IFN-g production, as observed in group A with the different antigens.



## PRODUCCIÓN DE INTERFERON GAMMA

Figura 2. Índices de producción de IFN g, en cultivos de sangre completa estimulados con los diferentes antígenos de *Brucella abortus* en los grupos de estudio evaluado mediante un sistema de ELISA sándwich

Figure 2. IFN $\gamma$  production indexes in whole blood cultures stimulated with the different *Brucella abortus* antigens in study groups, evaluated using a sandwich ELISA kit



**A)** serologically-positive, revaccinated cows (n=5); **B)** serologically-negative, revaccinated cows in a herd with high brucellosis prevalence (n=5); **C)** serologically-negative cows in a herd under brucellosis control phase (n=5); **D)** negative control group (n=4) (\* $P$ <0.01).

manera general, es menor al que se registró en los grupos seronegativos; lo cual sugiere que la presencia de anticuerpos tiene un efecto regulador negativo en la producción de IFN-g, tal como se observa con los diferentes antígenos en el grupo A.

### DISCUSIÓN

La resistencia a la brucelosis depende del desarrollo eficiente de una inmunidad celular, que se caracteriza por la producción significativa de IFN-g por

### DISCUSSION

Animal resistance to brucellosis depends on the efficient development of cellular immunity, characterized by the significant production of IFN-g by Th1 type CD $^4$  T cells, and cytotoxic T cells. The evaluation of this cytokine is a parameter that allows for determining the level of cellular immunity evocation and variations in the face of an infectious process or as a response to vaccine application. Nevertheless, the *in vitro* induction of IFN-g can

parte de las células T CD<sup>4</sup> tipo Th1 y de las células T citotóxicas. Debido a ello, la evaluación de la citocina es un parámetro que permite determinar el grado de evocación y variaciones de la inmunidad celular ante un proceso infeccioso, o como respuesta a la aplicación de una vacuna. No obstante, la inducción *in vitro* de la citocina en cuestión puede estar influida por el tipo de antígeno empleado en la estimulación; como consecuencia del escenario referido, se evaluó la capacidad inductora de diferentes fracciones subcelulares de *B. abortus* y de los LPS de naturaleza lisa y rugosa, los cuales han mostrado su relevancia en la patogenicidad de la bacteria e inducción de la inmunidad. Al respecto, se ha reconocido que la cadena O del LPS es la estructura antigénica más expuesta de esta bacteria, y que juega un papel determinante en la sobrevivencia intracelular; además, es un componente inmunodominante que induce la producción de anticuerpos específicos en animales infectados<sup>(23,24)</sup>.

En relación a los antígenos relevantes de naturaleza proteica de la bacteria se han descrito proteínas de membrana externa, proteínas citoplasmáticas y proteínas de choque térmico. Dentro de las primeras se incluyen aquéllas que se relacionan con la biosíntesis de la envoltura celular, con peso molecular entre 88 a 94 kDa, las cuales son parte del Grupo I de los tres que constituyen a las proteínas de membrana externa de la bacteria; mientras que, el Grupo II es equivalente a las porinas de otras bacterias Gram negativas, como Omp 2, OmpC y OmpF, con pesos moleculares entre 35 a 40 kDa; finalmente, dentro del Grupo III se reconocen proteínas de 25 a 30 kDa que interactúan fuertemente con el LPS<sup>(25,26,27)</sup>. Estos tres grupos de proteínas de membrana externa son reconocidos por el sistema inmune durante el curso de la infección<sup>(28)</sup>. Entre las proteínas citoplasmáticas de importancia destacan la proteína superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa, que ayudan a detoxificar el ambiente bacteriano, actuando sobre el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generado al interior del macrófago después de la fagocitosis de la bacteria<sup>(14)</sup>. De igual modo, se ha observado que la expresión de estas enzimas favorece la permanencia de *Brucella* en el interior

be influenced by the type of antigen used in the stimulation. With this in mind, the IFN-g induction ability of different *B. abortus* subcellular fractions, and smooth and rough LPS –which have shown to be relevant for both bacterial pathogenicity and immunity induction– was evaluated. The LPS O chain has been recognized as the most exposed antigenic structure of this bacterium, playing a determinant role in its intracellular survival. In addition, the O chain is an immunodominant component that induces the production of specific antibodies by infected animals<sup>(23,24)</sup>.

As far as bacterial relevant protein antigens are concerned, OMP, cytosol proteins, and thermal shock proteins have been described. The most important OMPs include those related with cell envelope biosynthesis with a molecular weight of 88 to 94 kDa, which are members of Group I within the three groups that constitute bacterial OMPs. Group II is equivalent to the porines found in other Gram negative bacteria, such as Omp 2, OmpC, and OmpF, with molecular weights between 35 and 40 kDa. Finally, Group III includes proteins in the 25 to 30 kDa range that interact strongly with the LPS<sup>(25,26,27)</sup>. These three OMP groups are recognized by the immune system during the course of infection<sup>(28)</sup>. Important cytoplasm proteins include Cu/Zn super oxide dismutase (SOD) and catalase, that aid in the detoxification of the bacterial environment, acting on the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produced inside the macrophage once bacteria have been phagocytized<sup>(14)</sup>. Likewise, the expression of these enzymes has been shown to promote the permanence of *Brucella* inside the phagocyte. On the other hand, the *in vitro* stimulation of T cells sensitized with whole blood is a method that has shown to be simple and versatile when used in the evaluation and follow up of cellular immunity against different diseases, through IFN-g evaluation using the unarguably adequate, specific antigen.

Our results showed that the immunization with the RB51 strain induced the significant production of IFN-g in both primed and boosted animals. Nevertheless, the *in vitro* production of IFN-g was related with the complexity of the antigen used for

del fagocito. Por otro lado, la estimulación *in vitro* de células T sensibilizadas empleando sangre completa es un método que ha mostrado su sencillez y versatilidad para emplearse en la evaluación y seguimiento de la inmunidad celular hacia diferentes enfermedades, por medio de la evaluación de IFN-g, utilizando indiscutiblemente el antígeno específico adecuado.

De acuerdo a los resultados, la inmunización con RB51 indujo una producción significativa de IFN-g en animales vacunados y revacunados. No obstante, la producción de la citocina *in vitro* estuvo relacionada con la complejidad del antígeno empleado en la estimulación, siendo así que la mayor producción se observó con el extracto total de la bacteria. Mientras que, su inducción a pesar de ser significativa y sin dejar de ser específica, fue menor con las fracciones subcelulares menos complejas, considerando los cultivos sin estimular de cada uno de los grupos. Lo cual, señala que el empleo de mezclas complejas para la estimulación *in vitro*, favorece el llamado y proliferación de un mayor número de células sensibilizadas específicas a los antígenos de *Brucella*. Por otro lado, el LPS no mostró un efecto relevante en la producción del interferón, contrario a lo que otros investigadores han formulado al considerarlo un activador inespecífico<sup>(10)</sup>. Esto fortalece el hecho de que la respuesta que se observa con los otros antígenos evaluados es debida a la estimulación de clonas específicas a antígenos proteicos, y no un efecto activador inespecífico del LPS. A este respecto, se ha señalado que desde el punto de vista de evaluación de la inmunidad celular, la respuesta blastogénica frente a antígenos polisacáridicos como son la cadena O y el LPS-L, es muy baja, ello puede interpretarse como que sólo un bajo porcentaje de la población linfocítica presenta especificidad por este tipo de antígenos<sup>(22)</sup>.

Considerando el comportamiento del grupo de animales revacunados positivos a las pruebas serológicas, se observó una disminución en su capacidad de respuesta a la producción IFN-g con los diferentes antígenos ensayados, al compararla con la respuesta observada en los grupos vacunados y revacunados seronegativos; tal hecho puede estar

the stimulation. The highest IFN-g production was obtained when the total bacterial extract was used. IFN-g induction was lower when less complex subcellular fractions were used, yet such production was significant and specific, considering the non-stimulated cultures from each group. This emphasizes that using the complex mixes for *in vitro* stimulation enhances the recruitment and proliferation of a larger amount of *Brucella* antigen-specific sensitized cells. On the other hand, LPS showed no relevant effect on the production of IFN-g, contrary to other publications<sup>(10)</sup> that have considered LPS as non-specific activators. This supports the fact that the response observed with the other antigens evaluated is due to the stimulation of specific clones to protein antigens, and not to a non-specific LPS activating effect. On this regard, it has been published that from the cellular immunity evaluation stand point, the blastogenic response to polysaccharide antigens such as the O chain and smooth LPS is very low. This can be interpreted in terms that only a low percentage of the lymphoid population shows specificity for this type of antigens<sup>(22)</sup>.

A reduced response ability in the production of IFN-g was observed in the group of serologically-positive, revaccinated animals with the different antigens tested, when compared with the response observed in both the first-vaccinated groups and the boosted, serologically-negative cows. This fact can be related with a shift in the prevalence of antigen-responsive cell subpopulations as a result of the established infection, promoting the presence of IL-4- and IL-5-producing cells. IL-4 and IL-5 are cytokines that inhibit the production of IFN-g and promote the production of important amounts of *B. abortus*-specific antibodies, as observed in this particular group<sup>(12,13,14)</sup>.

No dependence of the production of IFN-g on antigen concentration was observed in any of the subcellular preparations evaluated in the system, among the cultures from the different animal groups used in this research, since IFN-g production levels were similar for all three concentrations analyzed with each of the antigens. IFN-g evaluation is a useful parameter and –together with antibody

relacionado con un cambio en el predominio de subpoblaciones celulares responsivas a los antígenos como consecuencia de la infección establecida, favoreciéndose la presencia de células productoras de IL-4 e IL-5, citocinas que inhiben la producción de IFN-g y favorecen la producción de cantidades importantes de anticuerpos específicos a la bacteria, como se observó en este grupo<sup>(12,13,14)</sup>.

No se observó dependencia en la producción de IFN-g con la concentración de antígeno, para ninguna de las preparaciones subcelulares evaluadas en el sistema, en los cultivos de los diferentes grupos de animales en estudio; ya que los niveles de producción fueron similares entre las tres concentraciones ensayadas para cada uno de los antígenos. La evaluación de IFN-g es un parámetro útil que junto con la medición de anticuerpos ayuda a definir y monitorear la respuesta inmune de los animales hacia la bacteria, permitiendo determinar su orientación y grado de respuesta inmune Th1 o Th2, debe considerarse para tal propósito y no como herramienta de diagnóstico aislada, donde su utilidad puede mostrarse limitada, sobre todo en animales infectados por *Brucella abortus* cuando los niveles de anticuerpos son elevados.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se concluye que el extracto sonificado fue la preparación antigénica más conveniente para la estimulación *in vitro* de células T sensibilizadas, con el propósito de evaluar la respuesta inmune celular, por medio de la producción de IFN-g, permitiendo así determinar que la producción de la citocina en el sistema fue debida a una estimulación antigénica específica por parte de los linfocitos T sensibilizados como consecuencia del proceso de vacunación, y no una producción inespecífica por células NK.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con recursos de los proyectos 31642-B y 31164-B del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

measure aids in the definition and monitoring of animal immune response to *B. abortus*, thus allowing for the determination of both immunity orientation and the level of Th1 or Th2 immune response. IFN-g evaluation should be considered only for such purpose and not as an independent diagnostic tool, since its usefulness can be limited for this purpose, mainly in *B. abortus*-infected animals with high antibody levels.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

It is concluded that the sonicated extract was the most convenient antigenic preparation for the *in vitro* stimulation of sensitized T cells, aiming to evaluate the cellular immune response by measuring the production of IFN-g. This allowed us to determine that the production of IFN-g in the system was due to specific antigen stimulation of sensitized T cells as a result of the vaccination process, and not to the non-specific production of NK cells.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financed with the resources from projects 31642-B and 31164-B, Mexico's National Science and Technology Council (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT).

*End of english version*

---

## LITERATURA CITADA

1. Norma Oficial Mexicana de Emergencia, NOM- EM- 011-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la brucelosis de los animales. 01-23-95.
2. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín informativo de epidemiología. Brucelosis, una enfermedad actual. SNVE, SSA. 1998;15:2.
3. Blasco JM. Profilaxis médica de la brucelosis en los rumiantes: las vacunas clásicas y las vacunas nuevas. En: Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B, editores. INIFAP-SAGARPA. México 2001:158-179.
4. Schurig GG. Vacunas contra la brucelosis: pasado presente y futuro, cepa RB51 [resumen]. 14ª Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero. CIGAL. 1998:45.
5. Vermulapalli R, He Y, Buccolo S, Boyle SM, Sriranganathan

## PRODUCCIÓN DE INTERFERON GAMMA

- N, Schurig GG. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun* 2000;68(7):3927-3932.
6. Schurig GG, Roop II RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 1991;28:171-188.
  7. Montaña SNI, Rueda LOE, Calderón PCP, Ortega A, Puentes AR, Gallego MMI, Marino JOC. Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. *Archiv Med Veter* 1998;30(2):109-123.
  8. Zhan Y, Cheers C, Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 1995;63(4):1387-1390.
  9. Zhan Y, Liu Z, and Cheers C. Tumor necrosis factor Alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect Immun* 1996;64(7):2782-2786.
  10. Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchin F. Mouse cytokine profiles associate with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *Brucella abortus* 2308. *Infect Immun* 2001;69(10):6541-6544.
  11. He Y, Vemulapalli R, Zeytun A, Schurig GG. Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect Immun* 2001;69:5502-5508.
  12. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang L, Zaitseva M, Lapham C, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microb Infect* 2001;3:43-48.
  13. Adams SG. The immune response to Brucella [on line]. [www.fao.org/livestock/agah/id/brunet\\_main/brunet/doc/bruwebsite.doc](http://www.fao.org/livestock/agah/id/brunet_main/brunet/doc/bruwebsite.doc). Accessed May 20, 2005.
  14. Aréstegui MB, Gualtier SC, Domínguez J, Scharovsky OG. El género *Brucella* y su interacción con el sistema monocuclear fagocítico. *Vet Méx* 2001; 32(2):131-139.
  15. Blasco JM, Marín C, Jiménez M, Barberán M, Hernández A, Molina L, Velasco J, Díaz R, Moriyón I. Evaluation of allergic and serological test for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep *J Clin Microbiol* 1994; 32(8):1835-1840.
  16. Salas Téllez E, Núñez del Arco A, tenorio V, Díaz-Aparicio E, De la Garza M, Suárez-Guemes F. Subcellular fractions of *Brucella ovis* distinctively induce the production of interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma in mice. *Canadian J Vet Res* 2005;69:53-57.
  17. Díaz R, Toyos J, Salvo MD, Pardo ML. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. *Ann Rech Vet* 1981; 12(1):35-9.
  18. Bradford MA. A rapid and sensible method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976;72:248-254.
  19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970;227:680-685.
  20. Tsai C, Frasch EC. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. *Annal Biochem* 1982;119:115-119.
  21. Merrill CR, Switzer RC, Van Keuren ML. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:4335-4339.
  22. Montaña SIN, Rueda LOE, Calderon PCP, Ortega A, Puentes AR, Gallego MMI, Marino JOC. Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. *Archiv Med Veter* 1998;30(2):109-123.
  23. Corbel M. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997;3:213-221.
  24. Cloeckeaert A, N Vizcaino, J Paquet, R Bowden, P Elzer. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002;90:229-47.
  25. Douglas J, E Rosenberg, H Nikaido, D Verstrete, A Winter. Porins of *Brucella* species. *Infect Immun* 1984;44:16-21.
  26. Verstrete D, Winter A. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 1984;46:182-187.
  27. Ficht T. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet Microbiol*; 2003;92:213-223.
  28. Bae J. Generation of baculovirus-*Brucella abortus* heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants, and *B. abortus* superoxide dismutase and L7/L12 recombinant proteins (Ph.D thesis). Blacksburg, Virginia, USA. Virginia Polytechnic Institute and State University 1999.

