

VETERINARIA



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Año LXIII Vol. 38 N° 152 - 153 Julio - Diciembre de 2003

Cerro Largo 1895 - Montevideo - Uruguay - Tel-Fax (598-2) 408 6174 - 409 9458 - E-mail: smvet@adinet.com.uy

Página Web: www.smvu.com.uy

Contenido

Editorial

Artículo Original

Intoxicación por larvas *Perreyia flavipes* en bovinos y ovinos. Caracterización de la enfermedad y biología del insecto

Fernando Dutra 7

Diagnóstico

Aborto Bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE «Miguel C. Rubino», Uruguay

Easton, C.; Paullier, C.; Bañales, P. 25

Academia Nacional de Veterinaria

Informe sobre vacunas y vacunación contra *Brucelosis bovina*

Raúl Casas Olascoaga 31

Homenaje al Dr. Carlos Carlevaro 42

Instrucciones para los autores

Esta edición consta de 1600 ejemplares y se distribuye sin costo a todos los socios de la SMVU.

Los contenidos y opiniones incluidos en los artículos son responsabilidad exclusiva de los autores.

Se autoriza la reproducción parcial o total de lo editado mencionando la fuente.

Por convenio de la SMVU y Facultad de Veterinaria (16-12-1988), el Dpto. de Documentación y Biblioteca de la Fac. de Veterinaria, se realiza el canje internacional por otras publicaciones científicas.



Informe sobre vacunas y vacunación contra Brucelosis bovina

Raul Casas Olascoaga¹

Informe técnico elaborado a solicitud del Centro Médico Veterinario de San José, presentado en la Jornada sobre Brucelosis el 19/08/03 en San José. La revista VETERINARIA agradece la autorización de su publicación por parte de el autor y de el presidente del Centro Médico.

VACUNA CEPA RB51

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a información personal recibida del Dr. Steve Olsen el objetivo inicial de la investigación para la búsqueda de una nueva vacuna contra la brucelosis para reemplazar la vacuna Cepa 19, fue eliminar el problema causado por la retención de títulos serológicos generados por la vacunación de terneras con la cepa 19. En EE.UU. la edad de vacunación de terneras con cepa 19 es de 4-12 meses. El proyecto de investigación no fue diseñado para comparar la vacunación de terneras con cepa 19 y cepa RB51. Sin embargo, la cepa 19 fue usada en el inicio del proyecto como control positivo. Se obtuvieron datos limitados para ambas vacunas (n=29 y 20 animales vacunados respectivamente para cepa RB51 y Cepa 19) los cuales sugieren aproximadamente 8% menor infección en los vacunados con Cepa 19 y 3% menor tasa de abortos que con la cepa RB51. Debido al número reducido de animales utilizados en este estudio existen dudas de que la diferencia de animales que abortaron sea significativa mientras que para la tasa de infección la diferencia es significativa. El criterio de infección en el examen bacteriológico fue estricto ya que el aislamiento de una sola colonia de la cepa virulenta de desafío en el momento de la necropsia (en el momento del parto o el aborto) determinó la clasificación del animal como infectado. Es necesario destacar que en el estudio pareado, en el grupo de la RB51, con la excepción de un aborto la recuperación del número de bacterias de la cepa virulenta de desafío fue extremadamente bajo, predominan-

temente de los ganglios linfáticos que drenan el ojo. La cepa virulenta de desafío fue la cepa *Brucella abortus* 2308, administrada conjuntamente a la dosis de 1×10^7 UFC (unidades de bacterias formadoras de colonias) entre 170 y 180 días de gestación, aproximadamente 12 semanas previas a la parición.

El beneficio verdadero de la RB51 es la capacidad de permitir identificar serológicamente los animales infectados aún cuando ellos hayan sido vacunados con la cepa RB51. Sin embargo, es necesario informar que animales vacunados con la RB51 pueden seroconvertirse cuando son expuestos a las cepas virulentas de campo de *Brucella abortus*; mientras que la incidencia de los abortos será muy baja.

La vacuna *B. abortus* Cepa 19 confiere protección completa contra la infección en 65-75% de los animales vacunados y en el 25-35% restante una protección relativa. En un porcentaje superior al 95% la vacunación evita el aborto en hembras que se han infectado. El aborto constituye un alto peligro para la propagación de la infección en el rodeo afectado y en los rodeos de establecimientos vecinos, cuando no hay un aislamiento correcto entre los rodeos colindantes o hay intercambio de animales.

La vacunación con la vacuna RB51, al igual que con la vacuna Cepa 19, tiene un doble beneficio: disminuye la susceptibilidad a la infección al conferir protección inmunitaria y reduce el nivel de exposición a la infección al disminuir el número de animales excretores de *Brucella abortus* y reducir substancialmente el número de abortos en los rodeos infectados.

Tanto la vacuna RB51 como la Cepa 19 son estables y no se propagan de un animal a otro y su virulencia no aumenta por pasajes seriados en animales. La protección conferida por ambas vacunas es mediada por células.

La Cepa 19 posee cierta patogenicidad para los humanos y debe usarse con precaución para evitar la infección del operador. También han ocurrido infecciones accidentales con la cepa RB51 pero no hay conocimiento de signos adversos causados por la infección. La patogenicidad de la cepa RB51 para los humanos esta aún pendiente de determinación.

Ambas vacunas deben ser administradas bajo la responsabilidad de un veterinario.

La ventaja de la RB51 comparada con la cepa 19 es que no induce la formación de anticuerpos los cuales son detectados por las pruebas estándar de diagnóstico de brucelosis. Por lo tanto, los animales infectados pueden ser más fácilmente identificados.

La vacuna RB51 ha sido aprobada recientemente como vacuna oficial para el bovino por el Animal and Plant Health Inspection Services/ Departamento de Agricultura de Estados Unidos (APHIS/USDA).

En EE.UU. a partir de 1980, se ha usado las dosis reducidas de Cepa 19 las cuales figuran en el cuadro que precede. La dosis tradicional de Cepa 19 era muy alta: 50-60 mil millones de bacterias viables en el momento de la aprobación de la serie de vacuna y 25 mil millones hasta la fecha de expiración de la vacuna. A fin de disminuir las reacciones serológicas residuales causadas por esta alta concen-

¹Miembro Titular de la Academia Nacional de Veterinaria.

COMPARACIÓN DE DOSIS DE APLICACIÓN DE LAS VACUNAS

La comparación de las dosis de vacuna de Cepa RB51 y Cepa 19 son las siguientes:

	Bovinos jóvenes (dosis bacterias viables) Vía subcutánea	Bovinos adultos (dosis bacterias viables) Vía subcutánea
Vacuna Cepa RB51	1-3.4 x 10 ¹⁰	1-3.4 x 10 ⁹
Vacuna Cepa 19 (dosis reducida usada desde 1980)	3-10 x 10 ⁹	3-10 x 10 ⁸

tracción de células viables contenidas en la dosis de vacuna, luego de estudios experimentales en bovinos, se determinó el uso de la dosis reducida. La vacunación de las terneras con dosis reducida se estableció en 4-12 meses de edad siendo la dosis óptima de 5 mil millones de bacterias viables administrada subcutáneamente y la edad óptima de vacunación 5 meses.

En las hembras adultas la dosis reducida óptima es de 500 millones de bacterias viables por vía subcutánea.

En Uruguay, la vacuna Cepa 19 se usó únicamente a la dosis alta tradicional para la vacunación de terneras (3-8 meses de edad), desde 1964 hasta la suspensión de la vacunación a fines de 1996. La cepa 19 a dosis alta inducía inmunidad durante la vida útil de la hembra, ya que las ternera vacunadas mantenían la resistencia a la infección frente a cepas virulentas de *Brucella abortus* por siete años y probablemente por un tiempo mayor. Por lo tanto, no era necesaria la revacunación, lo cual reducía significativamente el costo de la vacunación en la vida del animal. La dosis alta induce una mayor protección pero la formación y persistencia de anticuerpos residuales se prolonga mayor tiempo cuando se vacunan animales mayores de 8 meses de edad.

En terneras de 3-8 meses de edad vacunadas con dosis alta de Cepa 19, el 90% se convierte en sero-negativas 9 meses después de la vacunación. En terneras vacunadas con Cepa 19 a edades superiores a 9

meses de edad los títulos serológicos de anticuerpos persisten por mayor tiempo. En Uruguay el uso de la dosis alta y el no cumplimiento estricto de la edad de vacunación provocó un aumento y mayor persistencia de anticuerpos residuales en las poblaciones de terneras vacunadas por encima de los 8 meses de edad.

Los datos sobre la persistencia de la inmunidad conferida por la vacunación con RB51, durante la vida útil en hembras bovinas vacunadas desde terneras, son aún limitados y deberán ser complementados mediante investigaciones experimentales futuras e informaciones de su uso en campo.

En EE.UU. se ha sustituido gradualmente la vacuna Cepa 19 por la Vacuna RB51 que actualmente es la vacuna oficial.

VACUNACIÓN DE ANIMALES ADULTOS

La vacunación del rodeo de hembras adultas (vaquillonas y vacas) se puede aplicar selectivamente para la prevención y control de la brucelosis bovina.

La vacunación de hembras adultas en establecimientos infectados o en establecimientos sometidos a alto riesgo de infección debe combinarse con pruebas serológicas previas a la vacunación para la identificación y eliminación por sacrificio de los animales infectados. Las hembras no reaccionantes en las pruebas serológicas estándar corrientes serán vacu-

nadas con vacuna RB51. Durante el acto de la vacunación las hembras adultas deben ser identificadas en forma permanente ya sea por tatuaje o por la aplicación de caravanas.

En cada establecimiento infectado debe aplicarse un Plan de Saneamiento preparado y ejecutado según lo establecido en el Artículo 16° por el Poder Ejecutivo en el Decreto del 22 de Enero de 1998 sobre Programa de Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis en todo el territorio nacional. La vacunación debe ser autorizada por la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG /MGAP).

Un inconveniente importante de la vacunación de hembras adultas es el estado de preñez.

La vacunación de hembras en estado avanzado de preñez podría causar aborto. A medida que avanza el período de gestación la administración de vacuna ofrece mayores peligros de causar abortos. Por lo tanto, es aconsejable vacunar las hembras serológicamente negativas antes del servicio. Cuando el plan de control de la brucelosis en el establecimiento lo establezca, los animales preñados se vacunarán preferentemente en el inicio de la gestación, en el cual el peligro de aborto es muy bajo.

En rodeos con infección activa y creciente la vacunación de hembras preñadas puede ser conveniente y oportuna para disminuir y/o evitar la serie de abortos que suele causar la brucelosis.

La vacunación del rodeo de hembras adultas induce protección inmediata contra la brucelosis ya que los animales obtienen inmunidad 3-4 semanas después de la vacunación, lo cual acelera el proceso de control de la enfermedad.

En los establecimientos infectados, la vacunación de adultos disminuirá la diseminación de la infección dentro del rodeo a medida que los animales reaccionantes infectados se eliminen con destino al sacrificio en matadero/ frigorífico habilitado oficialmente por los servicios veterinarios de DGSG/MGAP. Los animales confirmados como reaccionantes deben ser marcados a fuego con la letra B (brucelosis). El procedimiento de pruebas serológicas en serie permite la remoción de los animales infectados del rodeo y la vacunación ofrece protección a los animales libres de infección.

Otra ventaja importante de la vacunación de adultos es el beneficio derivado de la protección contra el aborto en muy alto porcentaje de las hembras preñadas. Esta protección contra el aborto ofrece tres ventajas importantes: un mayor procreo de terneros, una menor aparición de animales infectados y una importante disminución de las fuentes de infección por *Brucella abortus* virulenta. El resultado será que progresivamente habrá menor número de animales reaccionantes removidos con destino al sacrificio sanitario. En establecimientos de alto riesgo de infección – libres de infección pero con alta probabilidad de ser expuestos a la brucelosis- la vacunación puede prevenir la introducción de la infección en el rodeo.

INFORME TÉCNICO DE VACUNACIÓN DE VACUNOS CON CEPA *Brucella abortus* RB51

COMITÉ TÉCNICO PARA EVALUACIÓN DE LA VACUNA

Unidad Enfermedades Zoonóticas
USDA/ARS/NADC 2300 Dayton Rd.,
PO Box 70 Ames, IA 50010 Revisión de
16 de Agosto de 2000.

Comité de Investigación del ARS .Steven C. Olsen (Presidente, medicina/ inmunología). Norman F. Cheville (patología). Betsy Briker (biología molecular). Allen E. Jensen (bacteriología). Mitchell Palmer (patología). Mark Stevens (inmunología). Asesores Técnicos de Transferencia. Gerhart Schurig, Virginia P.I.. Fred Enright, Louisiana State University. Mike Gilsdorf, APHIS Cattle Disease. Phillip O'Berry, ARS Liaison. Versión en español Raúl Casas Olascoaga, Academia Nacional de Veterinaria, Uruguay

ÍNDICE

Características de la RB51. Cepa RB51 en Vacunos. Eficacia de la Vacunación

Pruebas de campo en vacunos. La cepa RB51 en el búfalo americano y alce. Infección humana. Comercialización. Referencias

INFORME TÉCNICO SOBRE VACUNACIÓN DE VACUNOS CON *Brucella abortus* CEPA RB51

CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA RB51

Derivación

Brucella abortus 2308 en cuya superficie bacteriana falta la cadena O de polisacáridos (residuos de perosamina). La cepa RB51 fue derivada naturalmente por pasajes en serie en medio que contenía rifampicina y por selección de colonias que poseían morfología rugosa.¹

El Dr. Schurig del Virginia Polytechnic Institute, quien desarrolló la cepa RB51, suministró en 1990 un cultivo de la cepa RB51 al National Animal Disease Center para su estudio ulterior. Este cultivo fue transferido una vez y el nuevo cultivo fue designado como Semilla Maestra (Master Seed) RB51/ARS-1. A partir de esta cepa maestra, se produjeron varios pasajes para ser usados en el estudio con bovinos.

Caracterización

El carácter rugoso de cepa RB51 se basa en la morfología, tinción con cristal violeta, aglutinación espontánea en so-

lución salina, y aglutinación en solución de acriflavina.

La falta o muy baja expresión de la cadena O se demuestra por SDS-PAGE y tinción por plata, y por análisis en blot Western con anticuerpos monoclonales de la cadena-O.¹ Los análisis sobre sulfato dodecil sódico- electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguidos de tinción por azul Coomassie dan perfiles similares a la *Brucella abortus* cepa 19 y cepa 2308 lo cual sugiere que los componentes proteínicos de la cepa RB51 no han sufrido cambios diferenciales. La cepa RB51 expresa las proteínas mayor y menor de la membrana externa como previamente han sido informados para otras cepas de *Brucella abortus*. La tinción de Gram de las preparaciones de RB51 muestra formas bacilares o cocobacilares las cuales son ligeramente menores que las de las cepa 19 y cepa 45/20. La cepa RB51 es urea positiva, utiliza oxidativamente la glucosa, crece en presencia de eritritol, y no requiere CO₂ o sangre para su crecimiento.¹ La cepa RB51 al igual que la cepa 2308 (pero diferente a la cepa 19) crece en medio que contiene azul tionina (1:500.000) o penicilina (5U/ml).

Resistencia antibiótica

La cepa RB51 es sensible a los antibióticos usados en el tratamiento de la brucelosis humana (tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomycin, y doxiciclina) y a la amikacina, ampicilina, cloramfenicol, carbenicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, y trimetoprim-sulfametazol. La cepa RB51 es resistente a la rifampicina (esta resistencia la diferencia de otros aislamientos de *Brucella*) y a penicilina, cloxacilina, metilicina y oxacilina. La cepa RB51 no transporta el gene de resistencia a la estreptomycin el cual se presenta y expresa por ingeniería genética de mutantes de *Brucella* Tn5.

Genes bacterianos

El genoma de la cepa RB51 tiene diferencias menores que el genoma de la cepa madre *B. abortus* 2308 cuando se examina por las técnicas corrientes.^{2,3} La cepa RB51 contiene un gene funcional *eri* para el metabolismo del eritritol, el cual falta en la Cepa 19. El cultivo de laboratorio pasaje 70a de la cepa RB51 no difirió de

la Semilla Maestra cuando fue examinado por las técnicas genéticas corrientes. La técnica en campo pulsado de gel de la electroforesis de restricción de fragmentos genómicos derivados- endonucleasa revela que la cepa RB51 se asemeja estrechamente con otras cepas de *Brucella*.²

Estabilidad en Vacunos

La cepa RB51 es genéticamente estable en vacunos; no revierte a la virulencia o a la forma lisa después del desarrollo en bovinos por lo menos durante 12 semanas.⁴ También se ha demostrado que la cepa RB51 es estable *in vitro* después de > 100 pasajes en cultivo celular e *in vivo* luego de pasajes seriados en ratones.¹

Viabilidad durante la Liofilización y Almacenamiento

El proceso de liofilización de las suspensiones de cepa RB51 causa aproximadamente una pérdida de 4% de bacterias vivas. Aún después del almacenamiento a temperaturas de -25 ó 4 C por hasta un año, la cepa RB51 liofilizada retiene una excelente viabilidad (>95% y 75%, respectivamente).⁵

Dosis de la Vacuna

Las dosis subcutáneas de cepa RB51 usadas para la vacunación son: terneras, 10 a 34 mil millones de bacterias vivas; adultos/hembras preñadas, 1.0 mil millones de bacterias vivas. Las dosis comparables de cepa 19 son: terneras de 4 meses a un año, 3 a 10 mil millones; vacunos adultos, 0,3 a 1.0 mil millones de bacterias vivas.³

La dosis estándar de cepa 19 era originalmente de 10 mil millones de células vivas/ml (50 mil millones/ dosis) en la prueba inicial y no menos de 5 mil millones/ml (25 mil millones/dosis) a la fecha de expiración. Posteriormente se estableció una dosis reducida de cepa 19 en 3 a 10 mil millones de células vivas con edad límite para su aplicación de 4 a 12 meses de edad. La dosis reducida está basada en datos sobre estudios con una dosis protectora mínima de 90 millones a 4.5 mil millones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para terneras de 3-6 meses de edad, y 100 millones a 90 mil millones para terneras de 4 a 6 meses de edad.⁷

Se estima que 2:100,000 terneras vacunadas retienen la cepa 19 hasta la edad adulta.⁷ En 23 vacas adultas examinadas los tejidos en los cuales la cepa 19 fue retenida fueron: útero/placenta 10, leche/ubre 6, y contenido estómago fetal 2 con aislamiento de riñón, cápsula articular, ganglio linfático preescapular.⁸

Los tejidos de los cuales se recuperaron otros dos aislamientos de cepa 19 no fueron especificados.

En vacunos ha sido determinada la bioseguridad de la cepa RB51. Los experimentos fueron hechos en terneros para determinar la bioseguridad de varias dosis (1 millón a 60 mil millones de UFC SQ) y en vacas preñadas para determinar su abortogenicidad. (Cuadro 1).

VACUNACIÓN DE TERNERAS

Efecto clínico

La cepa RB51 es segura en todas las edades. No se presenta enfermedad clínica y no hay evidencias de efectos patológicos en tejidos cuando se administraron subcutáneamente dosis elevadas de RB51 a terneros de 3 y 6 meses de edad. La vacuna de cepa RB51 persiste por un período suficiente para desarrollar inmunidad y es luego eliminada de los tejidos del huésped sin riesgos de persistencia hasta la edad adulta.⁹

En la necropsia de terneros vacunados con cepa RB51 no fueron observadas lesiones patológicas. De acuerdo a información de la Colorado Serum Company, la vacuna cepa RB51 induce

aproximadamente 1 reacción adversa por millón de dosis vendidas.

Persistencia

Experimentos de bioseguridad hechos con terneras Polled Hereford de 10 meses de edad demostraron que la replicación de cepa RB51 en los ganglios linfáticos que drenaban los lugares subcutáneos de vacunación fueron aproximadamente similares que para la cepa 19, luego de una semana de la vacunación pero declinaron más rápidamente. La mayoría de los bovinos eliminó las dosificaciones de 10 mil millones de UFC de la cepa RB51 antes de las 12 semanas postvacunación. (Cuadro 2).

Lesiones Tisulares

El examen microscópico de terneros infectados con la cepa RB51 demostró que no se presentaron lesiones en el cerebro, tracto genital, y en otras vísceras. Los ganglios linfáticos que drenan los sitios de vacunación no mostraron evidencias de destrucción linfoide. Artritis, una secuela que puede presentarse en la vacunación con cepa 19, no fue observada en terneros vacunados con RB51. Lesiones histológicas no fueron encontradas en cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos (12), pulmones, corazón, útero, testículos.

Diseminación de ternero a ternero

La cepa RB51 no se transmite de terneros vacunados a terneros no vacunados. Terneras no vacunadas estabuladas con terneras vacunadas no desarrollaron evidencias bacteriológicas o serológicas de infección con cepa RB51.

Cuadro 1. Criterios de Bioseguridad para Vacuna viva de *Brucella*.

1. No se presentan signos clínicos de la enfermedad luego de la vacunación.
2. La bacteria persiste en los ganglios linfáticos por >6 semanas pero <12 semanas.
3. La bacteria no persiste en la circulación sanguínea más allá de 3 días.
4. La bacteria no se presenta en las secreciones nasales, saliva, u orina.
5. Los anticuerpos séricos aparecen a los 14 días después de la infección
6. La inmunosupresión no causa recrudescencia.
7. No hay depleción linfoide en ganglios que drenan el punto de vacunación.
8. No hay cambios tisulares degenerativos o inflamatorios.
9. Las bacterias recuperadas después de 12 semanas de desarrollo en el huésped son genéticamente idénticas a la cepa de la vacuna.

Cuadro 2. Número de *Brucella abortus* vivas en ganglio linfático preescapular que drena los sitios de vacunación (promedio de 6 biopsias).

	Semanas después de la vacunación					
	1	2	4	6	10	12
RB51	4,355	1,185	82	29	1	0
CEPA 19	3,748	21,896	1,205	43	2	0

Inmunosupresión

La supresión química de la inmunidad en terneros vacunados no causó recrudescencia de la cepa RB51. La administración de dexametasona en terneros 12 semanas después de la vacunación, no indujo crecimiento de RB51, ni cambios en la respuesta serológica, u otras evidencias de recrudescencia de la cepa de vacuna.⁴

VACUNACIÓN DE BOVINOS ADULTOS

Una dosis reducida de la cepa RB51 es eficaz en vacas adultas.¹⁰ Las vacas vacunadas con una dosis única de 3×10^9 o 1×10^9 UFC, o doble vacunación con 1×10^9 UFC previo al servicio fueron protegidas contra el aborto o contra el desafío de infección intraconjuntival con 1×10^7 UFC de la cepa virulenta 2308 (Cuadro 3).¹⁰

Cepa RB51 en vacas preñadas

La cepa RB51 causó 1 aborto en 820 vacas preñadas las cuales fueron vacunadas en condiciones de campo con 1 mil millones de UFC. A fin de examinar el efecto abortígeno de la vacunación usando dosis y rutas de administración inapropiadas, se administraron dosis de 10 mil millones de UFC de RB51 por vía intravenosa a 10 vaquillonas preñadas a los seis meses de gestación.¹¹ Las vaquillonas fueron sacrificadas y fue efectuada la necropsia 6 semanas después de la inoculación (n=5) y en el parto normal (n=5). La mayoría de las vaquillonas se infectó con la cepa RB51 y desarrolló placentitis, pero solamente una vaquillona parió un ternero prematuro (Cuadro 4).

Brucella abortus cepa RB51 fue cultivada de tejidos de vacas y fetos 8 semanas

Cuadro 3. Vaquillonas Hereford (18 meses de edad) fueron vacunadas con *B. abortus* cepa RB51 inmediatamente después del servicio y desafiadas intraconjuntivalmente en la mitad de la gestación con *B. abortus* cepa 2308.

Dosificación	N	Número de Preñadas	Número de abortos	Cepa 2308 recuperada de tejidos	
				Materno	Fetal
3×10^9 UFC dosis única	6	4	0/4	0/4	0/4
1×10^9 UFC dosis única	7	7	0/7	0/7	0/7
1×10^9 UFC doble dosis	6	4	0/4	0/4	0/4
No vacunadas	6	6	4/6	6/6	4/6

Cuadro 4. Vacas preñadas (16 de 27 meses de edad) fueron inoculadas intravenosamente con 10 mil millones UFC de *B. abortus* cepa RB51 a los 180 días de preñez.

n=	Tiempo en semanas del examen después del desafío	Número de placentas infectadas	Número con placentitis	Número de abortos o terneros prematuros
5	8 semanas	4/5	4/5	0
5	en el parto	4/5	4/5	1 *
•	ternero prematuro débil			

después de la inoculación y en el momento del parto luego de la inoculación a los 180 días de la gestación.¹¹ Muestras de útero materno, placenta, hígado, bazo, y ganglios linfáticos supramamarios estaban infectados con la cepa RB51 en ambos tiempos de la toma de muestras. (Cuadro 5). De manera similar, muestras de hígado, bazo, pulmón, ganglios linfáticos brónquicos, e hisopos de recto fueron positivos para la cepa RB51 en ambos tiempos de la toma de las muestras. Muestras alantoideas fueron positivas 2/5 a las 8 semanas, pero todas las muestras alantoideas y amnióticas fueron negativas en las muestras recolectadas al momento del parto.

En un segundo estudio se investigó los efectos de la administración subcutánea de 1 mil millones de UFC de la cepa RB51 o 3x10⁸ de cepa 19 en la mitad de la gestación de hembras bovinas.¹² Las vacas vacunadas con cepa 19 o con cepa RB51 no abortaron ni tuvieron nacimientos prematuros. (Cuadro 6). Los tejidos maternos y fetales recolectados en la necropsia fueron negativos en los culti-

vos para la detección de *Brucella* spp. y no presentaron lesiones histológicas de brucelosis.

OTRAS ESPECIES ANIMALES

En la mayoría de las especies evaluadas, la cepa RB51 se mostró atenuada y la eliminación de la bacteria fue más rápida comparada con otras cepas de vacunas de *B. abortus*. Una excepción es el búfalo americano ("bison") en el cual la cepa RB51 persistió un tiempo similar a la cepa 19.¹³ En estudios de inocuidad en ratones campestres, cuervos, venados, ardillas terrestres, la cepa RB51 fue eliminada de los tejidos esplénicos y hepáticos del venado, ratón y cuervo a las 12 semanas y no se observaron efectos nocivos de morbilidad o mortalidad. En la ardilla terrestre la administración oral de cepa RB51 no indujo enfermedad clínica o mortalidad, aun cuando la cepa de vacuna fue recuperada del bazo de 4 de 7 ardillas terrestres 12 semanas después de la infección oral.¹⁴

EFICACIA DE LA VACUNACIÓN EXPERIMENTAL DE VACUNOS CON CEPA RB 51

Efecto de la Vía de Vacunación

En el vacuno la inyección subcutánea es la única vía recomendada para el uso de la vacuna RB51. Según se ha demostrado, las terneras vacunadas subcutáneamente con RB51 quedan protegidas contra la infección y el aborto. La dosis de la cepa virulenta de desafío *B. abortus* 2308 (10⁷ in 100ul) fue administrada en el saco conjuntival (50ul/ojo).⁹ La vacunación de vacunos con cepa 19 por vía conjuntival o intrapalpebral fue casi tan efectiva como la vacunación subcutánea pero no tan práctica. La vacunación oral con cepa 19 ha tenido éxito; mientras que los estudios de administración de la RB51 por vía oral están siendo efectuados. Estos experimentos de vacunación oral en vaquillonas con cepa 19 han demostrado protección contra el aborto: 0/20 vaquillonas preñadas vacunadas oralmente y luego desafiadas con la cepa

Cuadro 5. Cultivos bacterianos de tejidos de vacas y fetos después de la administración intravenosa de 10 mil millones de UFC de *B. abortus* cepa RB51 a los 180 días de la preñez.

Animal	Tejidos	Necropsia	
		8 semanas	Parto/nacimiento (n=5)
Vacas	Placenta	4/5	4/5
	Ganglios mamarios	2/5	0/5
	Leche	0/5	1/5
	Hisopos vaginales	0/4	1/5
Fetos	Pulmones	4/5	2/5
	Contenido del cuajo	2/5	1/4
	Sangre	0/5	2/5

Cuadro 6. Vacas preñadas (20 meses de edad) fueron inoculadas subcutáneamente con 1 mil millones de UFC de *B. abortus* cepa RB51 o con 3x10⁸ de UFC de *B. abortus* cepa 19 a los 180 días de la preñez.

n=	Vacuna	Número de placentas infectadas	Número de placentitis	Número de abortos o terneros prematuros
5	Cepa RB51	0/5	0/5	0
5	Cepa 19	0/5	0/5	0

2308 virulenta en la mitad de la gestación, no sufrieron aborto; mientras que 10/19 vaquillonas preñadas controles abortaron (14 dieron cultivo positivo).¹⁵

Los sistemas balísticos de aplicación de la vacuna RB51 liofilizada están siendo evaluados en el búfalo americano y en el alce.

Efecto de la dosis de vacunación

Dosis altas de cepa RB51 dan respuestas inmunes detectables más elevadas que las dosis más bajas. A fin de examinar el efecto de la dosis sobre la protección, grupos de terneras Polled Hereford fueron vacunadas por vía subcutánea a los 7 meses con una dosis alta (32 mil millones de UFC) o con dosis bajas (16 mil millones de UFC) de la vacuna RB51. Las terneras fueron desafiadas con la cepa virulenta 2308 a los 6 meses de preñez y fueron examinadas para detectar evidencias de infección y aborto. Los datos sugieren protección similar de la vacuna

RB51 a las dosis de 16 y 32 mil millones de UFC. (Cuadro 7).¹⁶

Efecto de la Edad de Vacunación

A fin de determinar el efecto de la edad de vacunación, se utilizaron hembras Polled Hereford las cuales fueron vacunadas con 10 mil millones de UFC de la vacuna RB51 a las edades de 3, 5, 6, 7, y 10 meses de edad, se cubrieron a los 16-18 meses de edad, y fueron desafiadas con la cepa virulenta de *B. abortus* a los 6 meses de gestación.^{9,17,18} Las terneras vacunadas a los 10 meses de edad presentaron los más altos porcentajes de protección. (Cuadros 8 y 9). Aun cuando la vacunación a los 5, 6, 7 o 10 meses de edad tendió a dar protección equivalente, hubo una tendencia a inducir menor protección en las edades más jóvenes (3 meses). Las hembras que recibieron la vacuna cepa 19 (n=22) estaban protegidas contra la infección en 95% mientras que las hembras no vacunadas

controles (las cuales recibieron solución salina; n=47) tuvieron una alta incidencia de infección y aborto.

CEPA RB51 EN OTRAS ESPECIES

Un estudio de la eficacia de la vacuna RB51 (4x10¹⁰ UFC administradas subcutáneamente de la vacunación, los carneros fueron desafiados con 3x10⁹ UFC de *B. ovis* virulenta y fueron examinados 8 semanas más tarde. Tanto los controles como los vacunados con la RB51 fueron infectados en el 100%; mientras que se infectó el 68% de los carneros vacunados con la vacuna Rev-1 (Cepa Rev-1 de *Brucella melitensis*).

PRUEBAS EN VACUNOS EN CAMPO

Pruebas en campo llevadas a cabo por APHIS/ USDA (Drs. Mike Gilsdorf, Donald Evans) comenzaron en 1994 en Kansas y involucraron la vacunación de vacas adultas en un rodeo (rebaño) no

Cuadro 7. Eficacia de la Vacuna RB51 administrada a dos dosis diferentes.

Terneras Polled Hereford fueron vacunadas subcutáneamente con 16 o 32 mil millones de bacterias vivas, fueron servidas a los 16 - 18 meses de edad, y desafiadas con la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308 a los 6 meses de gestación.¹⁶

Edad de vacunación	Vacuna (dosis)	n=	<i>Brucella</i> Aborto
7 meses	RB51- alta	6	0
7 meses	RB51- baja	6	0
20 meses	RB51- baja	3	0
7 meses	sol. salina	6	2

Cuadro 8. Eficacia de la Cepa RB51 usada en cinco edades diferentes de vacunación

Edad de vacunación	Protección contra la infección % protegidas (infectadas/desafiadas)		
	RB51	CEPA 19	CONTROLES
10 meses de edad	95% (1/20)	100% (0/6)	45% (6/11)
7 meses de edad	83% (4/23)	80% (1/5)	36% (7/11)
5-6 meses de edad	69% (8/26)	100% (0/4)	50% (7/14)
3 meses de edad	61% (7/18)	100% (0/4)	27% (8/11)
Todas las edades	78% (20/87)	95% (1/19)	40% (28/47)

Cuadro 9. Protección contra el aborto conferido por la vacuna RB51 y la cepa 19 en diferentes edades de vacunación.

Edad de Vacunación	Protección contra el aborto % protegido (abortadas/desafiadas)		
	RB51	CEPA 19	CONTROLES
10 meses de edad	100% (0/20)	100% (0/6)	45% (6/11)
7 meses de edad	100% (0/23)	100% (0/6)	64% (4/11)
5-6 meses de edad	92% (2/26)	100% (0/4)	64% (5/14)
3 meses de edad	87% (2/15)	100% (0/4)	55% (5/11)
Todas las edades	95% (4/84)	100% (0/19)	58% (20/47)

infectado y en tres rodeos (rebaños) infectados (Cuadro 10). Las vacas recibieron vacuna liofilizada preparada en el National Animal Disease Center a una dosis de 1 mil millones de CFU de *B. abortus* cepa RB51 (cepa ARS-1).

Los rodeos (rebaños) 1, 2, y 4 estaban cuarentenados en el momento de la vacunación debido a la identificación de bovinos infectados con *B. abortus*. Los rodeos (rebaños) 1 & 2 han sido despoblados. SD= Sin datos.

Como parte del proceso de obtención de la licencia (permiso, autorización), Colorado Serum Company efectuó pruebas de campo en las cuales fueron administradas dosis de 1 mil millones de UFC de RB51 a más de 1500 bovinos adultos, de ellos más de 800, se confirmó, estaban preñados. Luego del examen bacteriológico, serológico e histológico de las muestras obtenidas después del aborto, la cepa RB 51 fue incriminada como causante de un aborto y se diagnosticaron

otros 6 abortos que no fueron causados por la vacunación con la cepa RB51. El papel potencial de la cepa RB51 en dos abortos adicionales ocurridos en estos estudios se desconoce ya que no fueron obtenidas muestras para el análisis de laboratorio. Los efectos de la dosificación de la cepa RB51 en vacas preñadas es desconocido. Sin embargo, la cepa RB51 fue recuperada de tejidos fetales luego de distocia presentada en una vaquillona la cual fue vacunada con la dosis de ternera ($1-3.4 \times 10^{10}$ UFC) en la mitad de la gestación²⁰

DETECCIÓN DE VACUNOS INFECTADOS EN LABORATORIO Y EN CAMPO

Pruebas Serológicas Estándar para Brucelosis

Los sueros de bovinos vacunados con cepa RB51 no contienen anticuerpos que reaccionen en las pruebas diagnósticas

corrientes para brucelosis. En los vacunos, no son inducidos los anticuerpos de la cadena O los cuales reaccionan en las pruebas serológicas que usan lipopolisacáridos como antígenos (pruebas estándar en tubo, prueba de la tarjeta, rivanol, PCFIA)²¹ Los vacunos adultos no sufren seroconversión detectable en las pruebas de vigilancia. La vacunación con la cepa RB51 en bovinos adultos que habían recibido la vacunación con cepa 19 cuando eran terneras, no indujo respuestas serológicas en las pruebas convencionales de vigilancia.²² El fracaso de la cepa RB51 para producir anticuerpos de la cadena O también se ha demostrado en otras especies (caprino, conejo, ratón).¹

Vacunos vacunados con cepa RB51 e infectados con la cepa virulenta 2308 desarrollan anticuerpos los cuales reaccionan en las pruebas serológicas estándar. Los vacunos vacunados con cepa RB51, luego de desafiados con la cepa virulenta 2308 muestran respuestas po-

Cuadro 10. Pruebas de campo con *B. abortus* cepa RB51.

Rodeo (rebaño)	n	Fecha de vacunación	Estatus	
			No. nacimientos	Cultivos Positivos
1	25	12-3-94	13	2
2	99	12-22-94	>35	SD
3	57	3-20- 95	>18	0/22
4	15	7-27-95	SD	

Los rodeos (rebaños) 1, 2, y 4 estaban cuarentenados en el momento de la vacunación debido a la identificación de bovinos infectados con *B. abortus*. Los rodeos (rebaños) 1 & 2 han sido despoblados. SD= Sin datos.

sitivas en la prueba estándar de tubo, pero a diferencia de las respuestas de los vacunos no vacunados e infectados, los títulos serológicos disminuyen progresivamente.

Pruebas serológicas para la cepa RB51

Las evidencias serológicas de la vacunación con cepa RB51 se hacen con la prueba del "dot blot" la cual detecta la respuesta de anticuerpos contra las proteínas bacterianas gamma- irradiadas de la RB51.²³ Los títulos de anticuerpos son significativamente más altos en los vacunos a los cuales se ha dado una dosis de 30 mil millones de CFU de la cepa RB51, comparados con los títulos de los vacunados con una dosis de 15 mil millones. Los vacunos vacunados con Cepa RB51 producen anticuerpos contra, por lo menos, la membrana proteica externa (superficiales) 4 o 5 de *B. abortus*. Estas proteínas han sido aisladas para usarlas en el desarrollo de una prueba diagnóstica más específica.²⁴

Prueba Cutánea

La prueba cutánea de sensibilidad específica por medio de inyección intradérmica de brucelina no distingue entre vacunos infectados con cepa 19 y aquellos infectados con una cepa de *B. abortus* virulenta de campo, ya que ambos grupos reaccionan dando pruebas cutáneas positivas. Los vacunos vacunados con RB51 no reaccionan a la inyección intradérmica de brucelina estándar.²⁴

Inmunidad celular mediada

Los vacunos vacunados con RB51 muestran in vitro evidencias de inmunidad mediada por células. Los linfocitos aislados de ganglios linfáticos de vacunos vacunados con RB51 responden de manera similar a aquellos procedentes de vacunos que recibieron cepa 19.²⁵

Identificación Bacteriológica

Los métodos presentes para el cultivo de la cepa RB51 incluyen el plaqueado en placas de agar triptosa conteniendo 5% de suero bovino. Usualmente, el desarrollo se presenta a los 4 -5 días de incubación. El subcultivo es seguido por

la verificación de las características consistentes, morfológicas y bioquímicas de la cepa RB51. Se ha desarrollado un medio selectivo que facilita el aislamiento e identificación de la cepa RB51 y permite su diferenciación de las cepas de *B. abortus* experimentales y las cepas de campo.²⁶

Un prueba rápida (abortus, melitensis, ovis, suís: "AMOS" PCR TEST), basada en la tecnología de la cadena polimerasa, puede ser usada para la identificación diagnóstica específica de la cepa RB51. La prueba "AMOS" distingue la cepa RB51 de otras cepas virulentas de *B. abortus* aisladas en el campo, en 8 horas, mientras que las técnicas bacteriológicas estándares requieren varios días para diferenciarlas. La prueba "AMOS" no permite diferenciar la cepa RB51 de su cepa madre 2308. El análisis genético ha demostrado una segunda redistribución genética, la cual diferencia la cepa RB51 de la cepa 2308. Esta redistribución es estable y ha sido mantenida en todos los aislamientos de la RB51 probados hasta el presente, y podría ser usado para desarrollar una prueba diferencial.²

CEPA RB51 EN EL BÚFALO AMERICANO Y EN EL ALCE

La infección con *B. abortus* del búfalo americano y el alce en el Yellowstone National Park es una fuente potencial de infección del vacuno y de la persistencia de la brucelosis en Estados Unidos. Los estudios en el búfalo americano indican que la cepa RB51 puede ser un efectivo agente inmunizante. Los búfalos americanos vacunados subcutáneamente con RB51, tienen un pico menor de número de bacterias en los tejidos de los ganglios linfáticos, más bajo título de anticuerpos, y eliminan las bacterias más lentamente que los vacunos.^{12,27,28} La cepa RB51 se localiza predominantemente en los tejidos de los ganglios linfáticos de los búfalos y no parece causar lesiones histológicas adversas.²⁸

En los búfalos americanos la vacunación de terneros con la cepa RB51 no disemina la infección a terneros vírgenes estabulados con ellos o alojados en el mismo ambiente.²⁷ En los búfalos ha sido de-

mostrada la respuesta celular mediada a antígenos de *B. abortus* iniciándose a las 12 semanas y las respuestas son similares a las que se observan en los vacunos vacunados.²⁷ Las búfalas vacunadas con RB51 en la edad joven (terneras) quedaron protegidas contra la infección y aborto, cuando fueron desafiadas en la mitad de la gestación con la cepa virulenta 2308.²⁹

La vacunación con RB51 en la edad adulta de búfalas preñadas, la cepa RB51 indujo aborto (2/8) y placentitis cuando se aplicó a la dosis de 10⁹ UFC, dosificación que ha demostrado ser segura en bovinos.³⁰ Los datos sugieren que la búfala vacunada en el segundo trimestre de la gestación es probable que aborte.

INFECCIÓN HUMANA

Han ocurrido infecciones accidentales de humanos con *B. abortus* cepa RB51, si bien, no hay conocimiento de signos clínicos adversos que hayan sido informados al Center for Disease Control en Atlanta, GA. Sin embargo, la patogenicidad de la cepa RB51 para los humanos está aún pendiente de determinación.

COMERCIALIZACIÓN

No existe patente para la *B. abortus* cepa RB51. Los científicos e instituciones que desarrollaron (Dr. Schurig, Virginia Polytechnic Institute) y probaron (National Animal Disease Center, ARS) la cepa RB51 han publicado sus datos, y esto impide la adquisición y registro de patente.

El potencial del uso de la vacuna RB51 en Estados Unidos ha sido estimado en 10 millones de dosis anuales durante 10 años.

Actualmente la cepa RB51 se reconoce como vacuna oficial en 49 estados con, por lo menos, 20 estados que no autorizan el uso de la vacuna cepa 19. (Alaska no autoriza la vacunación de los vacunos contra la brucelosis).

Se anticipa que APHIS recomendará suspender el uso de la cepa 19, o alternativamente, reducir severamente su uso, una vez que la vacuna comercial de cepa RB51 obtenga aprobación oficial completa.

Referencias Bibliográficas

1. **Schurig, G.G.; Roop R.M.; Bagchi, T.; Boyle, S.; Buhrman, D.; Sriranganathan, N.** (1991). Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28: 171-188.
2. **Jensen, A.E.; Cheville, N.F.; Ewalt, D.R.; Payeur, J.B.; Thoen, C.O.** (1995). Application of pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of vaccine strain RB51 from field isolates of *Brucella abortus* from cattle, bison, and elk. *Am. J. Vet. Res.* 56: 308-312.
3. **Bricker, B.J.; Halling, S.M.** (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay: differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain RB51. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1640-1642.
4. **Cheville, N.F.; Jensen, A.E.; Halling, S.M.; Tatum, F.M.; Morfitt, D.C.; Hennager, S.G.; Frerichs W.M.; Schuring G.** (1992). Bacterial survival, lymph node changes and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 53 :1881-1888.
5. **Capsel, R.L.; Olsen, S.C.; Cheville, N.F.; Thoen, C.O.** Survival of *Brucella abortus* strain RB51 lyophilized and as liquid vaccine under different storage conditions. *Biologicals* (In Press).
6. **Deyoe, B.L.; Dorsey, T.A.; Meredith, K.; Garrett L.** (1980). Reduced doses of *Brucella abortus* in cattle. *Proc. USAHA Annl. Meet.*, pp 163-164.
7. **Jones, L.M.; Berman, D.T.** (1976). The role of living vaccines in prophylaxis. *Develop. biol. Standard* 31: 328-334.
8. **Thomas, B.L.; Bracewell, C.D.; Corbel M.J.** (1981). Characterization of *Brucella abortus* strain 19 culture isolated from vaccinated cattle. *Vet. Record* 108: 90-93.
9. **Cheville, N.F.; Stevens, M.G.; Jensen, A.E.; Tatum, F.M.; Halling, S.M.** (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *AM. J. Vet. Res.* 54 : 1591-1597.
10. **Olsen, S.C.** (2000). Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res. Vet. Sci.* (in Press)
11. **Palmer, M.V.; Cheville, N.F.; Jensen, A.E.** (1996). Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB 51. Pathologic, bacteriologic and serologic findings. *Vet. Path.* 33: 682-691.
12. **Palmer, M.V.; Cheville, N.F.; Olsen, S.C.** (1997). Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58: 472-477.
13. **Olsen, S.C.; Cheville, N.F.; Kunkle, R.A.; Palmer, M.V.; Jensen, A.E.** (1997). Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of bison (*Bison bison*) vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51, *J. Wildlife Dis.* 33: 146-151.
14. **Jannuszewski, M.C.; Olsen, S.C.; McLean, R.G.; Clark, L.; Rhyan, J.C.** Biosafety of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in non-target species of birds and rodents. *J. Wildlife Dis.* (In Review).
15. **Nicoletti, P.; Milward, F.W.** (1983). Protection by oral administration of *Brucella abortus* strain 19 against an oral challenge exposure with a pathogenic strain of *Brucella*. *Am. J. Vet., Res.* 44: 1641-1646.
16. **Olsen, S.C.; Bricker, B.; Palmer, M.V.; Jensen, A.E.; Cheville, N.F.** (1999). Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: Serology, clearance and efficacy. *Res. Vet. Sci.* 66: 101-105.
17. **Cheville, N.F.; Olsen, S.C.; Jensen, A.E.; Stevens, M.G.; Palmer, M.V.** (1996). Efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis: Effects of age at vaccination, *Am. J. Vet. Res.* 57: 1604-1607.
18. **Olsen, S.C.** (2000). Immune responses and efficacy following administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet. Therapeutics* (In Press).
19. **de Bacques, M.P.J.; Barberan, M.; Marin, C.M.; Blasco, J.M.** (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 13: 301-304.
20. **Van Metre, D.C.; Kennedy, G.A.; Olsen, S.C.; Hansen ,G.R.; Ewa, D.R.** (1999). Brucellosis induced by RB51 vaccine in a pregnant heifer. *J.A.V.M.A.* 215: 1491-1493.
21. **MacMillan, A.** (199). Conventional serologic tests, pp 153-197. In: Nielsen K, Duncan JR (eds.) *Animal Brucellosis* CRC Press, Boca Raton, FL.
22. **Olsen, S.C.; Stevens, M.G.; Cheville, N.F.; Schurig, G.** (1997). Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diag. Invest.* 9: 363-367.
23. **Olsen, S.C.; Evans, D.; Hennager, S.G.; Cheville, N.F.; Stevens, M.G.** (1996). Serologic Responses of Calhhood Vaccinated Cattle to *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diag. Invest.* 8: 451-454.
24. **Cheville, N.F.; Jensen, A.E.; Morfitt, D.C.; Stabel, T.J.** (1994). Cutaneous delayed hypersensitivity reactions of cattle vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*, using brucellins prepared from various brucellar strains. *Am. J. Vet. Res.* 55: 1261-1266.
25. **Stevens, M.G.; Olsen, S.C.; Cheville, N.F.** (1994). Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 223-235.
26. **Hornsby, R.L.; Jensen, A.E.; Olsen, S.C.; Thoen, C.O.** (2000). Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Microbiol.* 73: 51-60.

-
27. **Olsen, S.C.; Jensen, A.E.; Palmer, M.V.; Stevens, M.G.** (1998). Evaluation of serologic responses, lymphocyte proliferative responses, and clearance from lymphatic organs after vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.* 59: 410-415.
28. **Roffe, T.J.; Olsen, S.C.; Gidlewski, T.; Jensen, A.E.; Palmer, M.V.; Huber, R.** (1999). Biosafety of parenteral *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in bison calves. *J. Wildlife Management.* 63: 950-955.
29. **Olsen, S.C.; Palmer, M.V.** Efficacy of calfhooed vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 to protect bison against challenge with virulent *B. abortus* strain 2308. *J. Wildlife Dis.* (In preparation).
30. **Palmer, M.V.; Olsen, S.C.; Gilsdorf, M.J.; Philo, L.M.; Clarke, P.R.; Cheville, N.F.** (1996). Abortion and placentitis in pregnant bison (*Bison bison*) induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.* 57:1604-1607.