

부루세라백신(RB51)의 안전성에 관한 연구

II. 부루세라 RB51 백신균주의 마우스 및 기니피크에 대한 안전성

김종만 · 우승룡 · 이지연 · 김선영 · 권창희 · 진영화 · 윤용덕 · 조상래*

국립수의과학검역원
연세대학교 의과대학*
(2000년 8월 16일 게재승인)

Studies on the safety of *Brucella abortus* RB51 vaccine

II. Safety of *Brucella abortus* RB51 in mouse and guinea pig

Jong-man Kim, Sung-ryong Woo, Ji-young Lee, Sun-young Kim, Chang-hee Kweon,
Young-hwa Jean, Yong-dhuk Yoon, Sang-nae Cho*

National Veterinary Research and Quarantine Service
College of Medicine, Yonsei University*

(Accepted by Aug 16, 2000)

Abstract : The pathogenicity of *Br abortus* RB51 strains, produced by commercial vaccine companies in Republic of Korea and USA, were evaluated in mouse and guinea pig. BALB/c and ICR mice were intraperitoneally inoculated with RB51 vaccines or virulent field strain and the existence of RB51 including its ratio of spleen to weights and persistence in spleens were examined. Groups of guinea pigs on day 55-58 of received subcutaneously with various RB51 vaccines, RB51 field isolates (Dachungjin) or virulent field isolates(Sangju) to compare the histopathogenicity in uterus. All the mice received RB51 vaccines or RB51 field isolates survived for 10 days, but the groups of mice received virulent field isolates died 5 from 11 (45.5%) in case of BALB/c mice and 12 from 12 (100%) in ICR mice, respectively. The number of RB51 in the groups of mice given with vaccine strains and RB51 field isolates were declined rapidly were in spleens between 12 and 20 days after inoculation. In contrast the mice given with the virulent field isolates rose in number of bacteria up to 20 days after inoculation. In the groups of mice infected with virulent field isolates, the ratio of spleen weights to body weight were significantly higher than those in control or in the groups inoculated with RB51 strain, including RB51 field isolates, at 12 and 20 days after inoculation. At ten days after inoculation, placentas of both the pregnant and non-pregnant guinea pigs were conducted for histopathological examination.

Although any abnormal lesions were not observed in non-pregnant guinea pigs, all the strains caused the inflammation of the placenta, implying pathogenicity of RB51 in pregnant guinea pigs.

Key words : *Brucella abortus* RB51 vaccine, experimental animal, bacteriological, histopathological examination.

서 론

부루세라균은 그람음성의 작은 간균으로 대식구나 단핵구 같은 탐식세포내에서 생존, 증식할 수 있는 통성의 세포내 기생세균으로 주로 세망내피계에 존재하며 태반 등의 목적장기에 감염하여 동물에서 유산을 유발한다¹⁻³. 이러한 부루세라병의 병원성 및 면역원성 연구에서 목적 동물 이외에 *Br abortus*의 만성감염에 대한 방어능 시험^{4,5}, 비장내 부루세라균의 지속성 및 임신동물 태반의 병리조직소견 시험에 BALB/c 마우스를 많이 이용하고 있다⁶⁻⁹. 이러한 마우스 시험은 소에서 관찰되는 결과와 유사하기 때문에 부루세라병의 면역 및 병원성 연구에 좋은 모델로 간주되고 있다^{10,11}. WHO에서는 소 부루세라생균백신(S19)의 안전성 평가기준으로 기니픽에 균을 5×10^9 CFU 근육접종하고 10일후 비장내 균수가 5×10^5 CFU/g 이하로 감소하면 약독화백신으로서의 안전성을 인정하고 있다¹².

본 연구에서는 부루세라 RB51 백신을 국내의 임신한 한우 및 젖소에 접종한 후 발생한 유·조산의 원인을 규명하기 위하여 실험동물에 대한 안전성 평가의 일환으로 RB51 백신 등을 마우스 및 기니픽에 접종하고 마우스에서의 폐사유무, 비장내 부루세라 균수변화와 임신 및 비임신 기니픽 자궁의 병리조직학적 변화를 시험하였다.

재료 및 방법

공시백신 및 균주 : 국내 A, B 제조사에서 생산한 RB51 백신, 미국의 RB51 백신(Professional Biological Company), 백신접종후 유산한 젖소에서 분리한 RB51(대홍진) 및 병원성 부루세라 야외균주(상주)를 시험에 이용

하였다.

공시동물 : 마우스는 체중 15~20g의 BALB/c 및 20~25g의 ICR 암수 마우스, 기니픽은 체중 250~350g 내외의 임신 또는 비임신 Hartley 기니픽을 공시하였다.

백신접종 마우스의 생존율 및 비장내 균수변화 조사 : 마우스에 대한 병원성을 시험하기 위하여 품종별, 암수별로 각 3~8마리씩의 마우스에 A사 백신(2.8×10^9 /ml), B사백신(8×10^8 /ml), 대홍진주(3.0×10^9 /ml) 그리고 야외 병원성 균주(1.0×10^9 /ml)를 각 1ml씩 복강으로 주사하고 10일간 대조군과 동일한 조건에서 사육하면서 폐사수를 조사하였다. 비장내 균수조사는 Stevens *et al*'의 방법에 따라 시험하였다. 즉, 병원성 시험에서와 동일한 조건으로 BALB/c 및 ICR 마우스에 백신 또는 부루세라 분리균을 접종하고 5, 12, 20일후에 경추탈골 시켜서 체중을 측정하고 비장을 채취하여 무게를 계량하였다. 비장무게의 10배 량의 멸균 생리식염수를 가하여 유발에서 마쇄하고 10진 희석한 다음 배양용 평판배지로 *Brucella agar* (Difco)를 이용하여 37°C, 48~72시간 배양한 후에 생성된 RB51 특이 R type의 회백색 집락을 계수하였다.

임신 및 비임신 기니픽 자궁의 병리조직학적 변화조사 : *Brucella agar* 사면배지에 보관중인 각 공시균주를 *Brucella agar* 평판배지에 접종하여 37°C, 48시간 배양하고 멸균생리식염수를 이용하여 균을 수집하고 균수를 계수한 다음, 국내 A사 백신주(2.4×10^{10} CFU), B사 백신주(2.4×10^{10} CFU), 미국백신주(1.6×10^{10} CFU), 대홍진 균주(2.5×10^8 CFU) 그리고 야외 병원성 부루세라균주(2.1×10^{10} CFU)를 임신 52~55일령의 기니픽과 비임신 기니픽 각 2~3수씩에 경부 피하로 접종하고 폐사한 기니픽은 제외하고 분만한 기니픽은 즉시 경추탈골시켜 자궁을 적출하였고 분만하지 않은 기니픽은 접종 10일 후에 자궁을 적출하여 10% formalin으로 고정하고 파라핀으로 포매하여 4~6 μ m 두께로 절편을 만들어 hematoxylin &

eosin 염색하여 광학현미경으로 조직소견을 관찰하였다.

결 과

백신접종 마우스의 생존율 : 공시한 국내 A, B사의 RB 51 백신 및 백신후 유산한 젖소에서 분리한 RB51(대흥진) 그리고 야외 병원성 소 부루세라균주(상주)를 BALB/c 및 ICR 마우스 복강으로 접종하고 10일간 폐사 유무를 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 두회사 백신 및 대흥진주를 접종한 마우스는 품종에 관계없이 모두 생존하였으나 야외 병원성 소 부루세라균인 상주주를 접종한 BALB/c 마우스 11수중 5수(45.5%)가 폐사하였고, ICR 마우스는 12수 모두(100%)가 폐사하였다.

접종 경과일에 따른 비장내 부루세라균수 변화 : 부루세라 균주별로 마우스 비장에서 지속성을 관찰하기 위하여 접종시험한 결과는 Fig 1과 같다. 국내 A사, B사 및 미국의 RB51 백신 그리고 대흥진주와 상주주를 접종한 마우스의 비장내 RB51 균수는 접종후 5, 12, 20일에 A사 백신주가 $6.7 \times 10^6/g$, $4.4 \times 10^5/g$, $4.3 \times 10^4/g$, B사 백신주가 $4.4 \times 10^6/g$, $1.5 \times 10^6/g$, $2.0 \times 10^5/g$, 미국 백신이 $1.5 \times 10^5/g$, $7.0 \times 10^4/g$, $5.0 \times 10^3/g$, 대흥진주가 $1.3 \times 10^6/g$, $2.8 \times 10^5/g$, $1.6 \times 10^4/g$ 였고 상주주는 $2.9 \times 10^6/g$, $5.8 \times 10^5/g$, $5.4 \times 10^6/g$ 이었다. 백신주 접종군중 A사 백신접종 마우스의 경우는 감소하는 정도가 다른 군에 비하여 다소 완만한 경향을 나타내었으며, 야외 병원성주(상주)를 접종한 마우스의 비장내 균수는 접종후 12일에 다소 감소하는 경향을 보이다가 이후 20일에는 다시 균수가 증가하는 양상을 나타내었다.

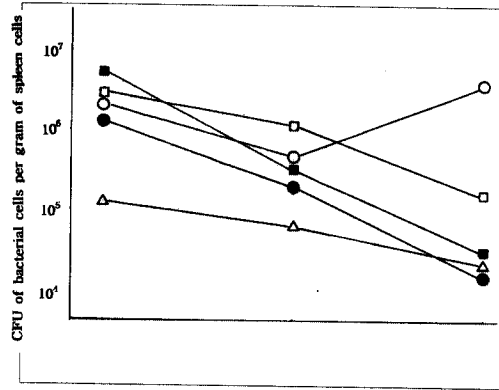


Fig 1. Persistence of *Br abortus* RB51 in spleens of injected mice.

Mice were given RB51 A vaccine(2.8×10^9 CFU, ■-■), RB51 B vaccine(8×10^8 CFU, □-□), RB51 vaccine from USA(1.0×10^9 , △-△), RB51 isolates from dairy cow aborted after vaccination(3.0×10^9 , ●-●), or virulence field isolates(1.0×10^9 , ○-○) by intraperitoneal injection.

접종 경과일에 따른 비장지수 변화 : 비장내 부루세라균수 시험에 공시한 마우스의 비장지수 즉, 마우스 체중에 비례한 비장의 무게 차이를 시험한 결과는 Fig 2와 같다. 국내 2개사와 미국에서 제조한 백신 및 야외분리 RB51주(대흥진)을 접종한 마우스의 비장지수는 큰 변화 없이 접종후 5일에 1.0~1.67, 12일에 0.71~1.96으로 미세한 증가를 보이다가 20일에는 다시 접종 5일후와 유사한 0.67~1.66의 지수를 보였다. 반면에 야외주인 상주주를 접종한 마우스의 비장지수는 접종후 5일에 1.44, 12일에 2.38 그리고 20일에는 4.18로 접종후 날자가 경과할수록

Table 1. Number of existence mice for ten days after inoculation with *Brucella abortus* RB51 vaccines, RB51 isolates and pathogenic field strain intraperitoneally

Vaccines or strains	Inoculation		No. of existence by mouse strains (No. of death/No. of inoculation)	
	Dose	Route	BALB/c	ICR
A vaccine	$2.8 \times 10^9/ml$	IP	0/23	0/26
B vaccine	8×10^8	IP	0/22	0/24
Daehungjin*	3.0×10^9	IP	0/11	0/12
Sangju**	1.0×10^9	IP	5/11(45.5%)	12/12(100%)

*; RB51 isolated from dairy cow aborted after RB51 vaccination.

**; Virulent field isolates from *Brucella abortus* reactor.

자궁조직의 병리조직학적 변화를 시험한 결과는 Table 2 및 Fig 3과 같다. 임신한 기니픽에서는 국내 및 미국에서 생산한 RB51 백신과 대흥진 및 야외 병원성주인 상주주를 접종한 모든 기니픽의 자궁조직에서 심한 염증소견이 관찰되었으며 분만한 기니픽의 자궁조직도 분만후 경과일수에 따라 잔존하는 미약한 염증반응을 볼 수 있었다. 반면에 같은 조건으로 백신과 대흥진을 접종한 비임신 기니픽의 자궁조직은 전반적으로 정상적인 소견을 나타내었고 야외 병원성 균주를 접종한 기니픽에서는 자궁염증 소견은 없었으나 접종부의 피하조직에 과립

Fig 2. Ratio of spleen weight to body weight of mice injected with RB51 vaccines, RB51 isolates from field or virulence field isolates by intraperitoneally
Mice were give RB51 A vaccine(2.8×10^9 CFU, □), RB51 B vaccine(8×10^8 CFU, □), RB51 vaccine from USA(1.0×10^9 CFU, □), RB51 isolates from dairy cow aborted after vaccination(3.0×10^9 CFU, □), or virulence field isolates(1.0×10^9 CFU, ■) by intraperitoneal injection.
* Spleen Index ; weight of spleen/mouse body weight $\times 100$.

현저한 증가를 보였다.

임신 및 비임신 기니픽 자궁조직의 병리조직 소견 : 임신 및 비임신 기니픽에 공시 백신 또는 균주를 접종하고

Fig 3. Placenta from a pregnant guinea pigs inoculated with RB51 vaccine strains. Note diffuse inflammatory cells infiltration and necrosis of placenta. Hematoxylin & eosin staining $\times 40$.

Table 2. Histological findings on pregnant and normal guinea pigs after inoculation with RB51 vaccines, field isolates of RB51, and virulent field isolates

Vaccines or strains	Injection (subcutaneous)	Placental histopathology		
		Physiological status***		Normal
		Pregnant	After delivery	
A vaccine	2.4×10^{10}	4/4 severe placentitis	2/3 normal 1/3 mild placentitis	2/2 normal
B vaccine	24×10^{10}	1/1 severe placentitis	3/4 vascularitis 1/4 normal	1/1 normal
Vaccine from USA	1.6×10^{10}	2/2 severe placentitis	2/2 mild placentitis	1/1 normal
Daehungjin*	2.5×10^8	4/4 severe placentitis	-	-
Sangju**	2.1×10^{10}	1/1 severe placentitis	1/1 normal	2/2 normal (inflammation in s.c.)

* RB51 isolates from dairy cow aborted after RB51 vaccination.

** Virulent field isolates from *Brucella abortus* reactor.

*** Number of guinea pig with placentitis or vascularitis/Number of guinea pig tested.

성, 육아종성 염증이 관찰되었다.

고 찰

Tobias *et al*¹³은 임신 9일령 마우스에 부루세라 RB51과 S19를 접종하고 9일후에 부검하여 조직소견을 조사한 바 S19는 심한 태반염과 때로 태아폐사를 유발하였으나 RB51은 태아폐사는 없이 미미한 태반염이 국소적으로 관찰되었다고 하였고, Montaraz와 Winter⁵는 BALB/c 마우스에서 약독주와 강독주에 대한 감수성과 저항성의 차이는 소에서 관찰되는 양상과 유사하여 소 부루세라 시험에 좋은 모델이라 하였다. 국내 2개사에서 생산한 RB51 백신, 백신후 유산한 짝소에서 분리한 RB51 그리고 야외 병원성 부루세라균주(상주)를 임신하지 않은 BALB/c와 ICR 마우스에 각각 접종하고 10일간 관찰한 결과 백신 및 백신후 분리한 RB51을 접종한 마우스는 품종에 관계없이 모두 생존하였으나 병원성 야외균주를 접종한 BALB/c 마우스는 45.5%, ICR 마우스는 100%가 폐사하였다. 이같은 결과로 보아 RB51 백신 및 백신후 분리한 RB51은 야외병원성 균주와는 달리 마우스를 폐사시킬 수 있는 병원성이 없음을 확인할 수 있었으며, 복강주사한 마우스의 폐사유무로도 부루세라균의 병원성을 비교 평가할 수 있었다. 다만 소에서처럼 마우스 품종간에도 감수성의 차이가 있는 것으로 사료되며 품종간, 임신유무, 일령, 접종균수 등에 따른 차이에 대하여는 좀더 연구되어서 실험동물 적용시험에 기준이 확립되어져야 할 것이다.

RB51 부루세라 백신의 실험동물에 대한 병원성 유무를 확인하기 위한 시험의 일환으로 BALB/c 및 ICR 마우스에 백신 및 야외분리 균주를 접종하고 주기별로 비장내 부루세라균수를 조사한 결과 국내 및 미국백신과 백신후 유산한 소에서 분리한 RB51을 접종한 마우스의 비장내 균수가 접종후 일수가 경과할수록 현저히 감소한 반면에 야외병원성 부루세라균을 접종한 마우스의 비장내 균수는 접종 20일 후에도 접종 5일의 균수에 비하여 오히려 증가하였다. 이러한 결과는 BALB/c 마우스에 S19 약독화백신을 접종하면 체내에서 쉽게 소멸하나 병원성 S2308주는 만성감염하여 지속 존재한다⁵는 보고와 RB51 접종마우스는 비장에 4주간만 균이 잔존하였으나 S2308은 20주이상 지속되었으며 마우스 비장에서 소 실율이 S2308에 비하여 RB51이 약 100배 빠르다는 보고⁷

와 유사한 결과이다. Braun *et al*¹⁴은 이런 이유를 RB51은 S2308과는 달리 신속하게 대식구 등에 탐식, 살균되기 때문이며, Diaz *et al*¹⁵은 S2308과 S19는 비장내 대식구의 활성을 억제시키는데 반하여 RB51은 그렇지 않기 때문이라는 보고에서 이같은 차이의 원인을 유추할 수 있을 것이다. 비장내 부루세라균의 지속성 조사와 함께 비장지수 즉, 마우스 체중에 비례한 비장무게를 조사한 결과 RB51을 접종한 마우스의 비장지수는 접종경과 일수에 따라 큰 변화를 볼 수 없었던 반면에 야외 병원성 부루세라균을 접종한 마우스의 비장지수는 시험한 20일까지 접종후 경과일수에 따라 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 S19, S2308 등의 부루세라균이 마우스에 감염하면 비장세포 proliferative 반응이 일어나며, 마우스의 비장무게가 증가한다는 보고^{7,9}에서와 같이 탐식살균에 저항하는 부루세라균은 비장에 지속 존재하면서 비장세포 증식을 자극하지만 병원성이 낮아 쉽게 탐식살균되는 RB51은 비장에서 쉽게 소멸하여 비장세포의 proliferative 반응이 약하거나 일어나지 않아 비장무게의 변화가 크지 않았던 반면에 야외병원성 부루세라균은 지속감염하면서 비장세포를 자극하여 증식시키므로서 비장무게가 증가한 것으로 사료되며 이러한 비장지수는 부루세라균의 병원성 확인에 유용한 방법으로 적용할 수 있을 것이다.

Meador와 Deyoe *et al*¹⁶은 임신마우스에 병원성 S2308를 접종하면 임신한 소에서 볼 수 있는 것과 같이 균이 trophoblast cell에서 증식하면서 태반에 심한 손상을 준다고 하였고, Enright¹⁷는 S2308 접종소의 태반조직시험에서 모든 chorionic trophoblasts가 파괴되었으나 S19, RB51을 접종한 소에서는 미미한 trophoblast cell 손상을 준다고 하였다. 또한 Tobias *et al*⁶은 임신 9일령 마우스에 S19, RB51을 접종하고 9일후 태반병변을 조사한 결과 S19는 10^{7.5}CFU를 접종하여도 심한 necrosuppurative placentitis와 태아폐사를 유발하였으나 RB51은 10^{9.5}CFU를 접종하여도 태아폐사없이 미세한 태반염만 국소적으로 관찰되었다고 하였다. 본 연구에서는 임신 마우스 대신에 임신말기의 기니피과 비임신 기니피에 백신과 야외 분리균주를 접종하고 태반의 병리조직학적 변화를 비교 조사하였다. 그 결과 임신기니피에서는 야외 병원성 균주는 물론 시험한 모든 백신주와 유산후 분리한 RB51을 접종한 모든 기니피의 태반조직에서 심한 괴사 및 염증 소견이 관찰되었으나 비임신 기니피의 자궁에서는 이러

한 병변을 관찰할 수 없었다. 이러한 임신 및 비임신 기니피그간의 차이는 Sonnenwirth와 Swartz¹⁸의 소 부루세라균의 발육을 촉진시키는 erythritol이 임신한 동물의 자궁 조직에 집중적으로 발생하며 부루세라균이 성숙한 가축의 조직보다 태아조직을 선호함에 따라서 만성감염되어 있던 균이 임신기에 태반으로 집중하면서 태반염 등을 일으켜 유산이 발생한다는 이론과 일치하는 결과이다. 다만 임신마우스에서의 S2308, S19와는 달리 RB51이 뚜렷한 자궁의 염증 및 괴사소견을 나타내지 않았다는 보고^{6,17}와는 대상동물이 다른점을 감안하더라도 큰 차이가 있으며 이에 대한 실험동물간의 비교연구 및 병원성의 조직학적 재평가가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

소 부루세라 RB51 백신의 실험동물에 대한 안전성을 조사하기 위하여 국내 A, B사에서 제조한 백신과 미국 백신, 백신접종 후에 유산한 젖소에서 분리한 RB51(대홍진) 그리고 야의 병원성 부루세라균(상주)을 공시하여 마우스의 생존율, 비장내 부루세라균 지속성 및 비장지수와 임신, 비임신 기니피그 자궁조직의 병리조직학적 시험을 실시하였다.

국내 A, B사 백신과 대홍진을 접종한 BALB/c 및 ICR 마우스는 관찰기간(10일)동안 모두 이상없이 생존하였으나 야외주인 상주주를 접종한 BALB/c 마우스는 45.5%, ICR 마우스는 100%가 폐사하였다. 백신 및 균주를 접종한 후에 주기별로 비장내 균수를 조사한 바 국내 A, B사 백신, 미국백신 및 대홍진을 접종한 마우스의 비장내 균수는 날자가 경과할수록 균수가 현저히 감소하였으나 야의 병원성균주인 상주주를 접종한 마우스의 비장내 균수는 20일 후에도 증가하는 양상을 보였다. 비장지수도 백신 및 대홍진 접종군은 큰 변화가 없었으나 상주주를 접종한 마우스는 다른 균의 마우스에 비하여 현저하게 증가하였다. 임신한 기니피그의 자궁조직은 백신, 대홍진주, 상주주를 접종한 모두에서 심한 태반염 소견을 보였으나 비임신 기니피그의 자궁조직에서는 특이한 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Cloeckert A, Kerkhofs P, Limet JN. Antibody response to brucella outer membrane proteins in bovine brucellosis: Immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:3168-3174, 1992.
2. Nicoletti. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv Vet Sci Comp Med*, 24:69-98, 1980.
3. Philip R, Epstein LB. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature*, 323:86-89, 1986.
4. Ho M, Cheers C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. *J Infect Dis*, 146:381-387, 1982.
5. Montaraz JA, Winter AJ. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun*, 53:245-251, 1986.
6. Tobias L, Schurig GG, Cordes DO. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strains 19 and RB51 in the pregnant mouse. *Research in Veterinary Science*, 53:179-183, 1992.
7. Stevens MG, Olsen SC, Pugh Jr GW, et al. Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect Immun*, 62:3206-3212, 1994.
8. Stevens MG, Olsen SC, Pugh Jr GW, et al. Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infect Immun*, 63:264-270, 1995.
9. Stevens MG, Olsen SC, Palmer MV, et al. Immune responses and Resistance to brucellosis in mice vaccinated orally with *Brucella abortus* RB51. *Infect Immun*, 64:4534-4541, 1996.
10. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, et al. Biological properties of RB51: A stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*, 28:171-188, 1991.
11. Cheville NF, Jensen AE, Halling SM, et al. Bacterial survival, lymph node changes, and immunogenic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*, 10:1881-

1. Cloeckert A, Kerkhofs P, Limet JN. Antibody response

- 1888, 1992.
12. Office International Des Epizooties. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 3rd Edition, 242-255, 1996.
 13. Tobias L, Schurig GG, Cordes DO, *et al.* Comparative behaviour of *Brucella abortus* strains 19 and RB 51 in the pregnant mouse. *Research in Veterinary Science*, 53:179-183, 1992.
 14. Braun AI, Pomales-Lebron A, Stinebring WR. Interaction between mononuclear phagocytes and *Brucella abortus* strains of different virulence. *Proc Soc Exp Biol Med*, 97:393-397, 1958.
 15. Diaz R, Garatea P, Jones LM, *et al.* Radial immunodiffusion test with a brucella polysaccharides antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J Clin Microbiol*, 10:37-41, 1979.
 16. Meador VP, Deyoe BL. Intracellular localisation of *Brucella abortus* in the bovine placenta. *Veterinary Pathology*, 26:513-515, 1989.
 17. Enright FM. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. *Animal Brucellosis*, Eds K Nielson & JR Duncan Boca Raton CRC Press:301-320, 1990.
 18. Sonnenwirth AC, Swartz MN. *Brucellae. Microbiology*, Harper & Row Publishers, 3rd Edition, 686-691, 1980.
-