

## 부루세라 RB51의 ELISA 진단법개발

### I. Western blot에 의한 *Brucella abortus* RB51균의 항원 분석

허 문 · 조동희 · 정병열 · 조성근 · 정석찬 · 김옥경

국립수의과학검역원 세균과  
(2000년 12월 4일 게재승인)

## Development of ELISA for *Brucella abortus* RB51 I. Analysis on antigens of *Brucella abortus* RB51 by Western blot

Moon Her, Dong-hee Cho, Byeong-yeal Jung, Seong-kun Cho,  
Suk-chan Jung, Ok-kyung Kim

Bacteriology and Parasitology Division, National Veterinary Research and Quarantine Services  
(Accepted by December 4, 2000)

**Abstract :** As compared with reaction of antibody for sonicated antigen of *Brucella abortus* strain RB51 and 1119-3 by Western blot analysis, *Brucella* field positive sera was detected strong reaction at 40~80 kDa LPS of strain 1119-3, but detected very weak reaction at strain RB51 partly. Otherwise, as we analyzed major immunogen of RB51 by antisera bled periodically during 6 months after RB51 vaccination. we detected strong immunological reaction at 17, 18 and 8 kDa antigen of RB51. Especially, reaction of 8 kDa antigen by Western blot coincided with reaction of dot-blot assay in RB51-antibody detection method. We also compared with reaction of field sera by STAT(standard tube agglutination test), dot-blot assay and Western blot (reaction of 8 kDa antigen of strain RB51). 16 sera of 4~5 months after RB51 vaccination are all negative by STAT, and 12 field brucellosis positive serum are all positive, and also 12 of 16 sera vaccinated RB51 are positive by dot-blot assay and reaction of 8kDa antigen by Western blot. but 1 of 15 Brucellosis negative sera reacted nonspecifically dot-blot assay.

**Key words :** *Brucella abortus*, RB51, 8 kDa antigen

## 서 론

부루세라병은 가축뿐만 아니라 사람에도 감염되는 인수공통질병으로서 소를 비롯한 다양한 종류의 숙주동물을 갖고 있으며 전 세계적으로 발생하고 있는 질병으로 우리 나라에서는 이 전염병을 가축에서 제 2종 법정전염병으로 지정하고 가축전염병 예방법, 동법 시행령 및 시행규칙, 결핵병 및 부루세라 방역실시요령에 의하여 부루세라병 검색 및 양성우 살처분 정책을 시행하고 있다.

부루세라병은 잠복기간이 3주일 내지 3개월로 비교적 긴 만성전염병으로 오염된 사료, 물 등을 통한 경구, 유두나 창상부위 등을 통해 체내에 침입하면 인접 임파절

에 이르러 탐식세포 내에서 증식하고 임파절에 생존하던 균이 임신 4~6개월령 소의 태반에서 분비하는 호르몬(erythritol)에 의하여 혈류를 통해 태반에 도달하여 증식하고 그 결과 임신 6~8개월에 전구증상 없이 유사산을 일으켜 양축농가에 막대한 경제적 손실을 초래하는 질병으로서, 탐식 세포내 증식하는 부루세라균에 대한 효과적인 치료방법은 없다<sup>24</sup>.

소 부루세라병은 국내에서 1955년 도입 젖소에서 혈청학적 검사결과 양성우가 처음으로 검색되었으며, 그 이듬해인 1956년에 병원균 분리가 이루어져 본 병의 발생이 확인되었고 그후 부루세라병 근절을 위해 매년 검색 및 살처분 정책을 실시하고 있으나 최근 들어서 전

국적으로 질병발생이 만연되고 있는 실정이다<sup>4,5</sup>.

최근들어 미국 등 외국에서는 *B. abortus* strain 2308의 rough mutant인 lipopolysaccharide O-side chains이 결손된 *B. abortus* RB51 strain을 이용한 생균백신을 개발하여 부루세라병 예방에 사용하고 있다. *B. abortus* RB51은 rifampin에 내성을 가지고 있으며 urease(+), glucose(+)이며 erythritol 존재시 잘 자라고 배양시 CO<sub>2</sub>을 요구하지 않는 성상을 가지고 있다<sup>6,11</sup>. 또한 자연 감염된 부루세라균의 항체를 검색하는 우유윤환반응(Milk ring test), 로즈벵갈 평판응집반응(Rose Bengal plate test), 표준평판응집반응(standard plate agglutination test), 표준시험관응집반응(standard tube agglutination test) 및 보체결합반응(complement fixation test)에서는 *B. abortus* RB51의 항체를 검색할 수 없어 자연 감염우와 감염이 가능하다<sup>9,11-15</sup>. 현재 RB51의 항체를 측정할 수 있는 방법은 균체 항원을 이용한 dot-blot assay 법이 유일한 방법<sup>16-18</sup>으로 이 검사법은 사용되는 nitrocellulose paper (NC)의 종류, conjugate의 농도, substrate의 종류 및 반응시간에 따라 차이를 보여 진단방법의 설정이 어렵고 실험실간의 결과가 차이를 보일 수 있다.

따라서 본 연구는 부루세라병의 효율적인 검색기법을 개발하기 위해서 Western blot을 이용하여 *B. abortus* RB51의 주 면역원성 항원을 분석하였고, 이 항원의 면역반응과 현재 RB51 항체검사법으로 이용되고 있는 dot-blot assay 진단법과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

항원분석에 사용된 균주는 미국 NVSL(national veterinary services laboratory)에서 분양받은 *B. abortus* RB51 strain과 농림부 수의과학검역원 세균과에 보관중인 부루세라 진단액 생산균주인 *B. abortus* 1119-3 strain을 이용하였다.

### 배양 및 항원제조

공시균주를 10% bovine serum이 함유된 부루세라 한천배지에 접종한 다음 Candle jar에 36~48시간 종균 배양한 다음 같은 배지에 36~48시간 호기상태로 증균 배양하였다. 배양한 균은 plate 당 phosphate buffered saline(PBS) 10 ml을 넣어 회수한 다음 10,000×g로 3회 원심세척하여 회수하였다. 회수된 균은 g(wet) 당 PBS 50 ml로 부유시키고 sonicator(75% max. output, 1.5sec pulse on & 1.0sec pulse off)로 10분간 초음파 파쇄한 균을 12,000×g, 30분간 원심하여 그 상층액을 0.45 μm로 여과한 것을 항원으로 사용하였다.

### Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

*B. abortus* 항원분석을 위해 초음파 파쇄된 항원을 Lameli 법<sup>19</sup>에 준하여 10% 또는 15% SDS polyacrylamide gel을 150 V로 1시간 동안 전기영동을 실시한 다음 Coomassie blue R-250으로 염색하여 두 균주간의 항원의 차이를 관찰하였으며 Standard Molecular Weight Marker(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 항원의 크기를 산출하였다.

### Western blot

Winston & Fuller<sup>20</sup>에 따라 SDS-PAGE에 의해 분리된 *B. abortus* sonicated 항원을 electroblotting buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM glycine, 20% methanol) 내에서 nitrocellulose membrane에 1.0A로 3~4시간 동안 전사하였다. Sonicated 항원들이 전사된 NC membrane을 PBS(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.23 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g, NaCl 9.0 g/L, pH 7.2)로 2회 세척한 후, blocking buffer(1% skim milk in PBS)에 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 여기에 RB51 양성혈청 또는 야의 부루세라 양성혈청을 blocking buffer로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 PBS를 넣고 3회 세척하였다. 다시 goat anti-bovine IgG(H + L specific), horseradish peroxidase conjugate(KPL, Maryland, USA)를 blocking buffer에 1,000배 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고 PBS로 4회 이상 세척한 후, substrate 용액(3,3'-diaminobenzidine; DAB 50 mg, 1% CoCl<sub>2</sub> 2 ml, PBS 98 ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 ml)을 10-15분간 반응하여 band를 확인하였으며 Standard Molecular Weight Marker(Sigma, St. Louis, MO, USA)는 0.5% Ponceau S(Sigma)로 염색하여 항원의 크기를 산출하였다.

### Dot-blot assay

부루세라 RB51 균을 10% bovine serum이 함유된 부루세라 한천배지에 bacitracin 25 unit/ml, polymixin B 5 unit/ml, nalidixic acid 5 μg/ml, vancomycin 20 μg/ml, cycloheximide 100 μg/ml이 첨가된 BPNV medium에 37°C, 36~48 hrs 배양하여 0.15 M PBS로 균 회수하여 3,000×g, 30분간 3회 원심세척하고 균 농도를 약 3×10<sup>11</sup> CFU/ml로 조정, 항온수조에서 65°C, 30분간 처리하여 사멸시켜 다시 원심세척하여 4°C에 보관하였다. 최종 항원사용농도는 280 nm에서 OD 0.82±0.01로 TBS buffer(Trisma base 0.47 g, Trisma HCl 2.54 g, NaCl 29.22 g/L, pH7.5)로 희석하여 사용하였다.

NC membrane(Bio-Rad)에 100 ml 씩 분주하여 진공펌프를 이용하여 10분간 흡착한 다음 TBS로 1회 세척한

다음 37°C에서 건조시켜 사용시까지 보관하였다. GTBS (0.25% Gelatin in TBS)에 30분간 정치시키고 TBS로 1회 세척하였고 혈청을 GTBS로 1/20 희석하여 각 well에 100  $\mu$ l 씩 분주, 30분간 반응시킨 다음 진공펌프를 이용하여 NC membrane을 통과시키고 TBST(0.05% Tween 20 in TBS)로 5회 세척하였다. Conjugate(goat anti-bovine IgG HRP, KPL)는 1/2,000배로 희석하여 30분간 반응시키고 TBST로 3회, TBS로 1회, D.W로 1회 세척한 다음 Substrate(0.5 mg 4-chloro-1-naphthol/ml in TBS and 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 넣어 3~5분간 반응시켜 암청색으로 발색하면 양성으로 판정하였다.

#### Standard tube agglutination test (STAT)

가검혈청 80, 40, 20, 10, 5  $\mu$ l가 함유된 각각의 4부 시험관에 부루세라 Tube 용 진단액을 0.5% 페놀이 함유된 식염수로 100배 희석하여 2 ml 씩 넣고 잘 혼합한 다음 37°C, 48시간 반응시켜 응집이 일어나는 시험관의 희석 배수를 항체가로 산정하고 100배 이상일 때 양성으로 판정한다.

### 시험 결과

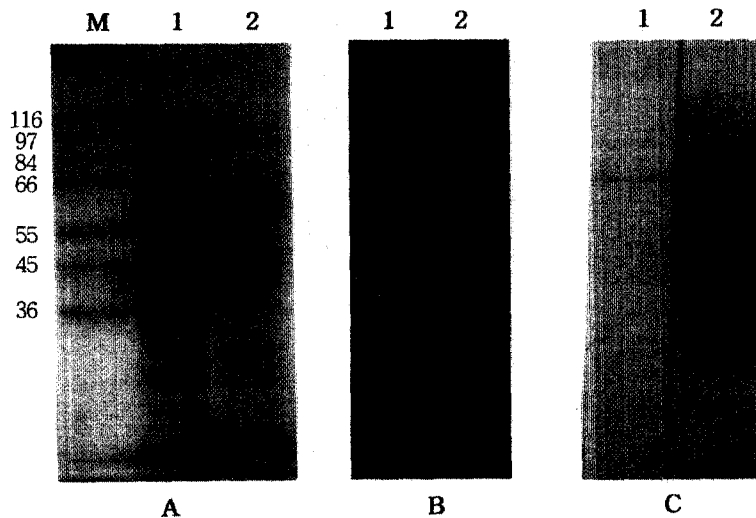
#### 부루세라 RB51과 1119-3 균주의 항원 비교

*B. abortus* RB51과 1119-3 균을 McFarland No.2의 농도로 부유시켜 초음파 파쇄한 항원을 전기영동하여 분

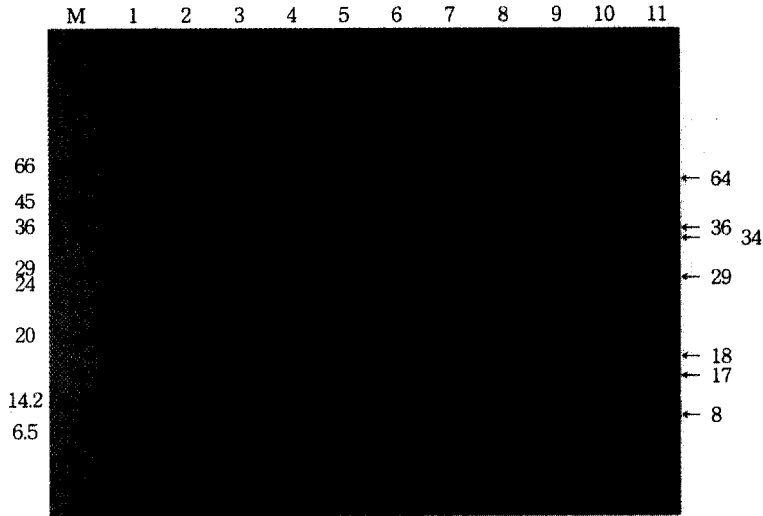
석한 결과 RB51 항원이 1119-3에 비해 62, 57 kDa 등 일부항원의 크기가 약간 감소하였으며 35, 33 kDa 등의 비교적 적은 크기의 항원들이 관찰되었으나 두 균주간의 균체 단백질 항원의 차이는 크지 않았다(Fig 1, A). 하지만 이들을 Western blot에 의해 분석한 결과 RB51 양성혈청에는 두 균주 모두 전반적으로 미약한 반응을 보였으며 20 kDa 이하의 항원에서 1119-3균과 달리 RB51 균에서 약간의 면역반응이 관찰되었다. 또한 야외 부루세라 양성혈청에서는 RB51 균과 달리 1119-3 균주의 40~80 kDa 항원에 매우 강한 반응을 보였다(Fig 1, B & C).

#### Western blot에 의한 부루세라 RB51 항원의 면역원성 분석

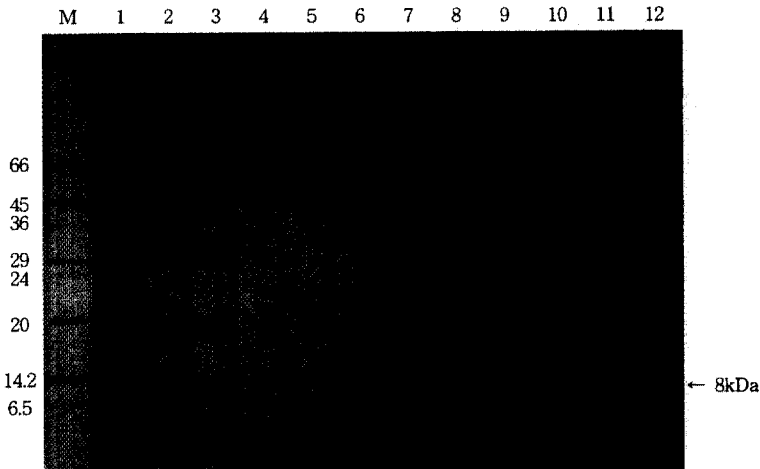
부루세라 RB51 예방약 접종후 주기적으로 6개월간 채혈한 혈청을 이용하여 Western blot 분석에 의한 RB51 항원의 면역원성 물질을 분석한 결과 약 7개의 주요 면역원성 물질을 확인할 수 있었다. 그 중 64, 36, 34, 29 kDa의 항원의 반응은 개체에 따라 다양하였으며 일부 음성혈청에도 반응하여 다른 미생물과의 공통항원이거나 비특이항원으로 추정된다(data not shown). 또한 17, 18 kDa은 접종 12주령부터 강한 면역반응을 보였지만(Fig 2) 개체에 따라 반응의 차이를 보였다(Fig 3). 특히 RB51의 8 kDa의 항원은 접종 3~4주령부터 강한 면역반응을 보였으며 각 개체별 면역반응 결과는 dot-blot assay 성



**Fig 1.** Electrophoretic and immunological analysis of sonicated antigens of *B. abortus* RB51 and 1119-3. The sonicated antigens of *B. abortus* RB51 and 1119-3 were electrophoretically analysis using 10% SDS-PAGE (Panel A) and also immunologically with sera from cattles vaccinated with *B. abortus* RB51 (Panel B) or with field bovine brucellosis (Panel C). Lane M. Molecular weight marker (Sigma), Lane 1. *B. abortus* RB51 sonicated antigens, Lane 2. *B. abortus* 1119-3 sonicated antigens.



**Fig 2.** Western blot analysis of sonicated antigens of *B. abortus* RB51 with bovine serum(1:100) collected at different days after vaccination with *B. arbotus* RB51. Lane M: molecular weight marker, Lane 1-11: Day 0, 26, 42, 55, 82, 96, 120, 134, 148, 162 and 182, respectively.



**Fig 3.** Western blot analysis of sonicated antigens of *B. arbotus* RB51 with bovine sera shown various reactivities. Lane M: molecular weight marker, Lanes 1-3: STAT(+), dot-blot(+) serum, Lanes 4-6: STAT(+), dot-blot(-) serum, Lanes 7-9: STAT(-), dot-blot(+) serum, Lanes 10-12: STAT(-), dot-blot(-) serum.

적과 일치하였다.

**STAT, dot-blot assay 와 Western blot 의 반응 성 비교**

다양한 부루세라 관련 혈청에 대하여 야의 부루세라 검색 확진법인 STAT, 부루세라 RB51 항체검사법인 dot-blot assay와 Western blot에 의한 8 kDa 항원과의 반응성을 비교하였다. 부루세라 RB51 예방약을 접종한 후

4~5개월령의 개체 16두를 검사한 결과 모두 STAT에서 음성을 보였으며 그 중 12두에서 RB51 양성을 보였으며 8 kDa 항원 역시 dot-blot assay와 각 개체별 성적이 일치하였다. 또한 야의 부루세라 양성혈청 12두중 4두가 dot-blot assay에서 양성반응이 관찰되었으며 이와 같은 성적은 8 kDa 항원의 반응과도 일치한 성적을 보였다. 야의 부루세라 양성혈청에서 dot-blot assay 양성을 보인 혈청은 STAT에서 3,200배 이상의 항체가를 보이는 고

**Table 1.** Comparison of STAT, dot-blot assay and Western blot(8 kDa) against various bovine brucellosis antisera

Groups	No. of sera tested	STAT <sup>1</sup>		dot-blot assay <sup>2</sup>		Western blot <sup>3</sup>	
		+	-	+	-	+	-
I	16	-	16	12	4	12	4
II	12	12	-	4	8	4	8
III	15	-	15	1	14	-	15

I. sera from cattles in 4~5 months after vaccination with *Brucella abortus* RB51, II. sera from cattles with field bovine brucellosis, III. sera from cattles without field bovine brucellosis and vaccination. 1. STAT; standard tube agglutination test, 2 dot-blot assay; dot enzyme-linked immunosorbent assay, 3. reactivity for 8 kDa antigen of *B. abortus* RB51 by Western blot

도로 면역된 개체였다. 한편 부루세라 음성혈청 15두중 1두가 비특이 반응에 의한 RB51 양성반응을 보였지만 8 kDa 항원에는 반응하지 않아 이 항원의 특이성을 확인할 수 있었다(Table 1, Fig 3).

## 고 찰

*B. abortus* RB51은 병원성 *B. abortus* 2308의 rough mutant로 LPS O-side chain이 결여된 균으로 LPS에 특이적인 단크론항체에 반응하지 않을 뿐만 아니라 RB51 균으로 고도 면역된 소에서도 이에 대한 항체를 형성하지 않아 기존 혈청학적 진단 방법으로는 항체를 측정할 수 없음을 보고하였다<sup>11,15,21</sup>. 그러나 RB51의 균체 단백질 성분을 *B. abortus* S19, S2308과 비교하여 87~91%의 유사성을 보임을 보고하였으며<sup>11,22</sup> 또한 균체의막단백질(OMP)도 RB51과 S19, S2308이 서로 일치함이 보고되었다<sup>22</sup>.

본 연구에서도 *B. abortus* RB51과 진단액 생산균주인 1119-3을 초음파 파쇄하여 항원을 전기영동하여 분석한 결과 단지 일부의 단백질 항원에서 두 균주간의 차이가 인정되었다(Fig 1, A). 또한 이들을 Western blot에 의해 분석한 결과 RB51 양성혈청에는 두 균주 모두 전반적으로 미약한 반응을 보였지만 20 kDa 이하의 항원에서 1119-3균과 달리 RB51 균에서 약간의 면역반응이 관찰되었으며 야외양성혈청에는 1119-3 균주의 40~80 kDa 항원에 매우 강한 반응을 보였지만 RB51 균주에는 거의 반응을 보이지 않았다(Fig 1, B & C). 이러한 반응은 야외 부루세라균 감염시 LPS 대한 면역반응이 강하게 일어나고 LPS O 항원은 주로 27~90 kDa의 크기에 위치하고 있다는 보고<sup>23</sup>로 보아 1119-3 균주의 LPS에 대한 반응으로 여겨지며 LPS가 결여된 RB51 균에는 면역반응을 보이지 않은 것으로 사료된다.

한편 RB51의 고면역원성 물질인 32, 27, 18 및 18 kDa 이하의 단백질 항원은 RB51 백신 접종한 소의 임파구 증식을 자극시킴을 보고하였으며<sup>24</sup> immunoblot에 의하여 LPS에 대한 항체는 형성하지 않으며 84 kDa과 20 kDa

이하의 단백질 항원과 반응함을 보고하였다<sup>25</sup>.

본 실험에서도 Western blot 분석에 의한 RB51 항원의 면역원성 물질을 분석한 결과 약 7개의 주요 면역원성 물질을 확인할 수 있었다. 그 중 64, 36, 34, 29 kDa의 항원의 반응은 다른 미생물과의 공통항원이거나 비특이항원으로 추정되고 17, 18, 8 kDa은 부루세라 항원으로 강한 면역반응을 보였으며(Fig 2) 이는 다른 연구자의 성적과 일치하였다<sup>24,25</sup>. 특히 RB51의 8 kDa의 항원은 예방약을 접종한 개체에서 dot-blot assay와 일치되는 성적을 보였으며 17, 18 kDa의 항원은 부루세라 OMP로 추정되며 개체에 따라 면역반응에 차이를 보였다(Fig 3)

RB51은 LPS가 결여된 균으로 고도 면역된 소에서도 이에 대한 항체를 형성하지 않아<sup>21</sup> 기존 혈청학적 진단 방법으로는 항체를 측정할 수 없음이 보고되었으며<sup>11,15</sup> 본 실험에서도 RB51 예방약을 접종한 후 4~5개월령의 개체 16두를 검사한 결과 모두 STAT에서 음성을 보여 일치하는 결과를 얻었다. 또한 그 중 12두에서 RB51 양성을 보였으며 이는 접종 2주부터 12주까지 dot-blot assay로 RB51 항체를 조사한 바 접종 12주부터 급속히 항체 검출율이 감소한다는 Olsen 등<sup>16</sup>의 보고와 일치하는 결과를 얻었다. Western blot에 의한 8 kDa 항원 역시 dot-blot assay와 각 개체별 성적이 일치하였다.

야외 부루세라 양성혈청 12두중 4두가 dot-blot assay에서 양성반응이 관찰되었으며 이와 같은 성적은 8 kDa 항원의 반응과도 일치한 성적을 보였지만 강독주로 공격접종한 개체에서 dot-blot assay에 의한 RB51항체를 검출할 수 없었다는 Olsen 등<sup>16</sup>의 보고와는 다소 상이한 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 야외 강독 부루세라균은 LPS로 균체표면이 덮혀 있어 RB51 균의 주요 면역원성 물질이 밖으로 직접 노출되어 있지 않아 짧은 기간에는 이에 대한 항체를 형성할 수 없을 뿐만 아니라 LPS에 의해 체내의 대식구에 의한 항원인식이 지연된 결과라고 생각한다. 야외 부루세라 양성혈청에서 dot-blot assay 양성을 보인 혈청은 대부분 STAT에서 3,200 배 이상의 매우 높은 항체가를 보여 심하게 감염된 개

체이거나 만성 감염되어 지속적으로 부루세라 균에 자극을 받은 개체인 것으로 추정된다. 한편 부루세라 음성 혈청 15두중 1두가 RB51 양성반응을 보여 dot-blot assay에 대한 비특이 반응을 확인하였지만 8 kDa 항원에는 반응하지 않아 이 항원의 특이성이 간접적으로 확인할 수 있었다(Table 1, Fig 3).

## 결 론

백신균주인 LPS가 결합된 *B. abortus* RB51과 진단액 생산균주인 *B. abortus* 1119-3을 초음파 파쇄하여 항원을 Western blot으로 분석한 결과 RB51 양성혈청에는 두 균주 모두 미약한 반응을 보였으나 야외양성혈청에는 *B. abortus* 1119-3 균주의 40~80 kDa 항원에 매우 강한 반응을 보였다.

한편 RB51 예방약 접종 후 주기적으로 6개월간 채혈한 혈청을 이용하여 RB51 항원의 면역원성 물질을 분석한 결과 부루세라 항원으로 17, 18, 8 kDa이 강한 면역반응을 보였다. 특히 RB51의 8 kDa의 항원은 예방약을 접종한 각 개체에서 dot-blot assay와 일치되는 성적을 보였다.

야외 혈청에 대한 STAT, dot-blot assay와 Western blot(8 kDa)의 반응성 비교하였다. 부루세라 RB51 예방약을 접종한 후 4~5개월령의 개체 16두와 야외 부루세라 양성혈청 12두를 검사한 결과 예방약 접종 혈청은 모두 STAT에서 음성을 보였으며 야외 양성혈청은 모두 양성이었다. 또한 부루세라 RB51에 대한 dot-blot assay 성적과 8 kDa 항원의 반응과는 각 개체별 성적이 일치하였다. 부루세라 음성혈청 15두중 1두가 비특이반응에 의한 RB51 양성반응을 보였지만 8 kDa 항원에는 반응하지 않아 이 항원의 특이성을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. 농림부. 결핵병 및 부루세라병 방역실시 요령. 농림부고시 제1999-52.
2. USDA APHIS Veterinary Services. Facts about brucellosis.
3. Stevens MG, Olsen SC, Palmer MV, et al. *Brucella abortus* strain RB51: a new Brucellosis vaccine for cattle. *Food Animal*. 19(6):766-774, 1997.
4. 정석찬. 세균성 인수공통전염병의 최근 연구동향: 부루세라병 예방대책. *수의과학연구소*. 45-59, 1996.
5. 농촌진흥청 가축위생연구소. 한국의 가축위생연구: 가축위생연구소 80년사.
6. Olsen SC, Cheville NF, Bricker B, et al. Technical report on vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Technical Committee for Vaccine*

*Evaluation Zoonotic Disease Unit, USDA/ARS/NADC*, 1-13, 1997.

7. Olsen SC, Cheville NF, Bricker B, et al. Technical report on vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Technical Committee for Vaccine Evaluation Zoonotic Disease Unit, USDA/ARS/NADC*, 1-11, 1996.
8. Frye GH, Gilsdorf MJ and Taft A. Brucellosis eradication-FY 96 Status report. *USDA APHIS Veterinary Services*, 1996.
9. Palmer MV, Cheville NF, Jensen AE. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet Pathol*. 33(6):682-691, 1996.
10. Jensen AE, Ewalt DR, Cheville NF, et al. Determination of stability of *Brucella abortus* RB51 by use of genomic fingerprint, oxidative metabolism, and colonial morphology and differentiation of strain RB51 from *B. abortus* isolates from bison and elk. *J Clin Microbiol*. 34(3):628-633, 1996.
11. Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunopathol*. 44(3-4):223-235, 1995.
12. Tobias L, Schurig GG, Cordes DO. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strains 19 and RB51 in the pregnant mouse. *Res Vet Sci*. 53(2):179-183, 1992.
13. Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, et al. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res*. 57(8):1153-1156, 1996.
14. Cheville NF, Jensen AE, Halling SM, et al. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*. 53(10):1881-1888, 1992.
15. Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, et al. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*. 54(10):1591-1597, 1993.
16. Olsen SC, Stevens MG, Cheville NF, et al. Experimental use of a dot-blot assay to measure serological responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J Vet Diagn Invest*. 9:363-367, 1997.
17. Olsen SC, Bricker B, Palmer MV, et al. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res Vet Sci*. 66:101-105, 1999.
18. Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res*. 58(5):472-477, 1997.
19. Laemmli E.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.

20. Winstone and Fuller : Immunoblotting, Current Protocols in Immunology, Unit 8.10.1-8.10.5, 1991.
21. Olsen SC, Evans D, Hennager SG, *et al.* Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J Vet Diagn Invest.* 8(4):451-454, 1996.
22. Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW Jr, *et al.* Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect Immun.* 62(8):3206-3212, 1994.
23. Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Lymphocyte proliferation in response to immunodominant antigens of *Brucella abortus* 2308 and RB51 in strain 2308-infected cattle. *Infect Immun.* 62(10):4646-4649, 1994.
24. Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308 proteins in RB51-vaccinated or 2308-infected cattle. *Infect Immun.* 64(3):1007-1010, 1996.
25. Stevens MG, Olsen SC. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. *Infect Immun.* 64(3):1030-1034, 1996.