

## Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella spp.*

Omar A. Saldarriaga<sup>1</sup>, MV, MS; Jorge E. Ossa<sup>1</sup>, MV, MS, Ph.D.  
y María T. Rugeles<sup>1</sup>, Bact, MS, Ph.D.

<sup>1</sup>Grupo de Inmunovirología - BIOGENESIS, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia  
A.A. 1226, Medellín, Colombia\*  
mtruigel@catios.udea.edu.co

(Recibido: 13 julio, 2001; aceptado: 31 mayo, 2002)

### Resumen

*La Brucella es una bacteria Gram-negativa, intracelular facultativa que infecta en forma persistente a humanos y animales domésticos y salvajes. Este género de bacterias se replica en los fagocitos mononucleares del hospedero, evadiendo los mecanismos solubles extracelulares de la respuesta inmune. La patogénesis de la infección por Brucella es bastante compleja, depende del patógeno y de los mecanismos de defensa que se activan, donde la inmunidad celular, macrófagos, citoquinas tipo Th1 y células citotóxicas participan activamente en la resolución de la infección. Aunque esta bacteria no evade los mecanismos de fagocitosis, si ha desarrollado mecanismos para la sobrevivencia intracelular. El entendimiento de la interrelación de la respuesta inmune con estos patógenos microbianos, permitirá el desarrollo de medidas para la prevención y el control. Esta revisión describe algunos de los mecanismos inmunológicos innatos y específicos involucrados en la eliminación de la infección causada por las especies de Brucella y referencia artículos originales que dan cuenta del avance logrado mediante la utilización de diferentes modelos animales.*

**Palabras clave:** *B. abortus*, inmunidad, sobrevivencia.

### Introducción

La infección por *Brucella* es una gran amenaza para la salud pública ya que produce una enfermedad zoonótica que afecta el ganado bovino, ovino, caprino y porcino, y causa un serio problema económico en la ganadería. En Colombia se calculan pérdidas anuales por 28 mil millones de pesos representados en la incapacidad de incursionar en los mercados internacionales, los abortos inducidos por la bacteria y los trastornos reproductivos que sufren los animales infectados. Para abordar los mecanismos involucrados en la respuesta inmune contra la *Brucella*, es importante resaltar que esta bacteria es un cocobacilo gram negativo, cuyos antígenos pueden ser divididos en dos grupos principales; el lipopolisacarido (LPS),

que induce anticuerpos aglutinantes (36, 15) y las proteínas, responsables de la inmunidad celular protectora. Para el estudio de la inmunidad protectora contra la infección causada por las especies de *Brucella* se han utilizado varios modelos animales mamíferos como los ratones (38), cobayos (26), bovinos (11) y humanos (32,5). El criterio utilizado para medir la protección de animales inmunizados, después de un tiempo determinado y luego del reto con una cepa virulenta, es el conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria, recuperadas de algunos órganos como el bazo (38).

En bovinos sanos, la *Brucella* es usualmente transmitida por contacto con mucosas de animales infectados, productos del aborto, o con alimentos

\* Dirección para solicitar reimpresos

contaminados. Si el microorganismo sobrepasa la mucosa, es transportado hasta los ganglios linfáticos regionales. Si la especie de bacteria no es virulenta, entonces es rápidamente controlada por la respuesta inmune celular resolviéndose la infección, inclusive sin que ocurra la seroconversión. Por el contrario si la cepa es virulenta, se sobrepasan las defensas celulares y los microorganismos pueden llegar a otros sitios del organismo localizándose en diversos órganos, tales como el hígado, el útero, la glándula mamaria y el bazo (7).

### Respuesta inmune innata

*El papel del macrófago y los polimorfonucleares.* Los macrófagos son células fagocíticas, presentadoras de antígeno capaces de modular la respuesta inmune a través de la producción de diferentes citoquinas (25); son la principal célula blanco de esta infección. El tipo de fagocitosis, la naturaleza del receptor utilizado y la activación de esta célula son variables críticas para determinar el desarrollo de la infección; así, se ha demostrado que cepas rugosas (desprovistas de LPS) y lisas (con LPS) de *B. abortus* son rápidamente ingeridas sólo si son opsonizadas con complemento o anticuerpos específicos (19). En macrófagos bovinos, derivados de glándula mamaria, las cepas virulentas de *Brucella abortus* presentan una mayor tasa de sobrevivencia y replicación, comparadas con cepas rugosas o no virulentas (19). Se ha sugerido que la cadena O del LPS es un factor esencial de este patógeno para la sobrevivencia en ratones (14). Una vez la bacteria ha sido fagocitada, es expuesta al medio hostil de los compartimentos fagolisosomales dentro de la célula fagocítica. El ensamblaje de esta estructura puede ser inhibido por cepas virulentas de *B. abortus*, mediante extractos de superficie (proteínas, azúcares, aminoácidos y carbohidratos) no relacionados con los LPS, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma (13).

La explosión respiratoria juega un papel muy importante en el proceso antibacterial de las células fagocíticas. Sólo las cepas de *Brucella* opsonizadas son capaces de inducir la liberación de cantidades significativas de radicales de oxígeno en macrófagos derivados de bovinos resistentes a la infección por *B. abortus*, comparado con macrófagos derivados de animales susceptibles (18, 19). *In vitro*, líneas celulares de macrófagos y macrófagos peritoneales murinos, producen especies derivadas del nitrógeno reactivo, como el óxido nítrico, después de la activación con

interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y la infección con diferentes especies de *Brucella* (17,23).

Las células fagocíticas tienen otros tipos de mecanismos diferentes a los radicales derivados del oxígeno, como las enzimas hidrolíticas y los haluros reactivos; sistemas esencialmente encontrados en los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs). Los PMNs utilizan los componentes de sus gránulos para la destrucción de microorganismos invasores. Se ha demostrado que la degranulación de estas células puede ser inhibida por la *B. abortus* (35,2); esto se evidenció por un proceso inhibitorio activo de la iodación de proteínas por los PMNs: en la presencia de extractos crudos de *B. abortus* (3), donde la 5' guanosina monofosfato (GMP) y la adenina han sido identificadas como los componentes bacterianos involucrados en este proceso (4). Adicionalmente, se ha demostrado que algunos componentes de la membrana externa de la *Brucella spp*, como el lípido A del LPS, juega un papel importante en la resistencia a los péptidos catiónicos bactericidas. De esta manera el LPS se considera un factor de virulencia (19) que genera una eficiente barrera protectora cuando la bacteria se expone a la actividad digestiva de los fagocitos (12,27).

El gen *Nramp1*, que codifica la proteína del macrófago asociada con resistencia natural a patógenos intracelulares como *Mycobacterium*, *Salmonella* y *Leishmania* (41), ha sido ubicado en el cromosoma 2 bovino (9). Macrófagos derivados de bovinos seleccionados por la resistencia in vivo a la infección por *B. abortus*, restringieron la replicación intracelular, a *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) y *Salmonella dublin*, significativamente mejor que macrófagos derivados de animales susceptibles (34). Estos mismos autores encontraron asociación significativa entre un polimorfismo del 3' UTR de gen *Nramp1* bovino y la resistencia natural de ganado a la Brucelosis.

La sobrevivencia de esta bacteria dentro de células fagocíticas y no fagocíticas, puede ser también aumentada por la expresión de proteínas como la enzima superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) (40) y la proteasa de respuesta a temperaturas aumentadas (HtrA) (8). Estas proteínas juegan un papel importante en la patogenicidad inducida por la *B. abortus* ya que son importantes componentes de defensa contra la respuesta oxidativa generada por el hospedero.

*Inducción de la Respuesta Inmune Humoral.* El LPS es el primer antígeno frente al cual aparecen anticuerpos (43,6) de tipo IgM e IgG, después de la infección natural o de la vacunación con la cepa 19. Ya que los anticuerpos pueden opsonizar las cepas patógenas, nuevas células fagocíticas podrían ser invadidas, potenciando la infección y promoviendo el establecimiento de la brucelosis bovina (22). Los anticuerpos tipo IgG también pueden proteger al huésped contra la liberación de grandes cantidades de endotoxinas (21). También se ha demostrado la producción de anticuerpos contra proteínas de membrana, como las OMPII (16,42). Si bien es cierto que la respuesta humoral ante estas proteínas no es tan fuerte como la observada contra el LPS, estos anticuerpos son importantes para el diagnóstico, cuando se utilizan cepas vacunales rugosas. De esta manera, otros antígenos, probablemente proteicos, podrían estar involucrados en la protección contra cepas lisas virulentas, ya que bovinos vacunados con cepas rugosas (RB51), aunque no producen anticuerpos contra el LPS de cepas lisas (2308), sí producen anticuerpos que reaccionan contra proteínas de estas cepas virulentas (37).

### **Respuesta Inmune Específica.**

*Inmunidad Mediada por Células.* Ya que esta bacteria es capaz de replicarse en el medio ambiente intracelular, se asume que una respuesta inmune mediada por células es de vital importancia para eliminar o proteger el huésped de la infección por este organismo. Aunque en ratones la resistencia adquirida a la infección es el resultado de los efectos independientes o probablemente interactivos entre los anticuerpos y las células T efectoras de ambos fenotipos CD4+ y CD8+ (1), esta inmunidad protectora mediada particularmente por los linfocitos TCD8+ ha sido demostrada por ensayos con ratones knockout para las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I y II (31).

*Citoquinas.* Algunas citoquinas proinflamatorias y derivadas de la célula T han sido detectadas en sobrenadantes de esplenocitos derivados de animales sensibilizados, reestimulados con antígenos de *Brucella*. El papel de estas citoquinas en el control de la infección ha sido investigado por el uso de citoquinas recombinantes o por la inhibición específica de sus funciones, utilizando anticuerpos monoclonales. Se ha demostrado que monocitos humanos (44) y células

adherentes derivadas de bazo murino (32), expresan la IL-12 p40, después de una estimulación *in vivo* con *B. abortus* y LPS derivados de esta bacteria. Esta inducción puede ser suprimida por anticuerpos monoclonales anti CD14, lo cual sugiere que los monocitos reconocen la *B. abortus* por medio de su receptor LPS. Esta producción rápida de IL-12 durante la infección con *B. abortus*, es de vital importancia para activar las células Th1 productoras de IFN $\gamma$  y de esta manera contribuir a la inducción de la resistencia celular adquirida. La supresión de la IL-12 endógena antes de la infección de ratones con *B. Abortus* aumenta significativamente la infección por *Brucella*, probablemente por la disminución en la producción de IFN $\gamma$  por las células T de bazo, observada en estos ratones. Bajos niveles de IFN $\gamma$  no alcanzaron a estimular adecuadamente los macrófagos derivados de bazo, quienes a su vez mostraron una disminución en la producción de óxido nítrico (47). La IL-12 inducida por *B. abortus*, también ha mostrado un gran efecto sobre células NK, ya que en éstas se promueve una eficiente actividad citolítica contra células tumorales (44).

El IFN $\gamma$  ha sido claramente involucrado en la resistencia durante la infección por *B. abortus*, ya que macrófagos murinos activados por esta citoquina controlaron efectivamente la replicación intracelular de las cepas de *B. abortus* 19 y 2308, *in vitro* (24); además, la neutralización de IFN $\gamma$  endógeno *in vivo* resultó en una marcada disminución de la habilidad del ratón para controlar la infección con la cepa atenuada 19 de *B. abortus* (48). En humanos, la *B. abortus* induce la secreción de IFN $\gamma$  en células TCD4+ y TCD8+, demostrando de nuevo la capacidad de esta bacteria para promover el patrón Th1 de diferenciación de la célula T (45). Sin embargo, aunque es conocido que la *B. abortus* induce el patrón Th1 de las células TCD4 (49), las cepas 19 y 2308 de *B. abortus* pueden persistir en los bazos de ratones BALB/c infectados, entre 6 semanas y 6 meses respectivamente (20,29). Adicionalmente, una respuesta Th1 con producción de IFN $\gamma$  puede promover la secreción de anticuerpos; como por ejemplo, en ratones los isotipos Ig G3 e Ig G2a, dirigidos contra el LPS de la cepa lisa de *Brucella*, han mostrado ser protectores.

De igual manera el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), una citoquina proinflamatoria producida durante la fase temprana de la infección intracelular,

también está involucrada en la resistencia a la *Brucella abortus* (51). Sin embargo, se ha demostrado que algunos subproductos proteicos de alto peso molecular derivados de la *Brucella* inhiben específicamente la expresión de  $\text{TNF}\alpha$ , y por lo tanto se han considerado como factores de virulencia (5). La inducción de  $\text{TNF}\alpha$  y de los patrones Th1 y Th2 por cepas vivas y muertas de *Brucella* es diferente. Así, cantidades sustanciales de  $\text{TNF}\alpha$ , fueron detectadas en los sobrenadantes de macrófagos peritoneales bovinos, después del reto con la *Brucella* viva. Por el contrario, estas células estimuladas con bacterias muertas por calor, no produjeron  $\text{TNF}\alpha$  (46). De igual forma, células de bazo derivadas de ratones infectados con *Brucella* viva produjeron  $\text{IFN}\gamma$  e IL-2 en respuesta a antígenos de *Brucella in vitro*, mientras que las mismas células derivadas de ratones inoculados con proteínas solubles de *Brucella*, produjeron cantidades significativas de IL-2 y de IL-4, pero no de  $\text{IFN}\gamma$  (49,50). Utilizando la misma metodología se ha determinado el perfil de otras citoquinas proinflamatorias, como por ejemplo la IL-1, la cual fue producida en bajas cantidades en respuesta a la bacteria viva o muerta y la IL-6 la cual se produjo en altas cantidades pero tampoco difirió significativamente entre la respuesta inducida por la bacteria viva y la muerta (46). De esta manera, queda reconocido el papel de la forma del antígeno y su influencia en la determinación de la respuesta inmune.

La IL-10 es una citoquina involucrada en la regulación negativa de la respuesta inmune protectora contra la *B. abortus*, mediante la inhibición de patrón Th1 o bloqueando las citoquinas inducidas por la activación del macrófago (10). La inmunización de ratones con *B. abortus* muerta, induce un incremento simultáneo de la expresión de genes de IL-10 y de  $\text{IFN}\gamma$  en células TCD4+, independiente de la IL-2, sugiriendo que en la respuesta inmune primaria ambos patrones de citoquinas son producidos. Además, aquí probablemente se está presentando un mecanismo de regulación fisiológica donde la respuesta inflamatoria es regulada negativamente por la IL-10 producida endógenamente (39). De igual manera ratones deficientes en CMH clase I, donde no hay activación de células TCD8+, produjeron mayor cantidad de IL-10 que esplenocitos derivados de ratones con deficiencia en CMH de clase II. Los altos niveles de IL-10 se correlacionaron con un incremento de la susceptibilidad a la infección por brucelosis en ratones deficientes de CMH de clase I. Se sugiere entonces

que las células TCD8+ pueden inhibir la producción de IL-10; por esto la brucelosis murina es más grave en ratones defectuosos para CMH de clase I (32).

La identificación de antígenos derivados de esta bacteria, que puedan inducir una inmunidad mediada por células protectora (Th1) ha sido el objetivo de varios estudios. El uso de una proteína ribosomal L7/L 12, producida por tecnología recombinante en *E. coli*, estimuló un perfil Th1 ( $\text{IFN}\gamma$  e IL-2) en ratones infectados con *B. abortus* (30). Además la inmunización de ratones con esta proteína, confiere protección contra la infección producida por la *B. abortus* (31). Otros componentes proteicos derivados de esta bacteria, como las proteínas de la membrana externa (OMP II) y la superóxido dismutasa (SOD Cu/Zn), han mostrado inducir una inmunidad mediada por células en bovinos (28,33).

La *B. abortus* inactivada, también indujo altos niveles de expresión de las moléculas coestimuladoras B7.1, B7.2 y de la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1) sobre monocitos humanos, de tal forma que esta bacteria puede aumentar las interacciones de las células presentadoras de antígeno (CPA) con las células T, sugiriendo el potencial uso de esta cepa inactivada como una vacuna que favorece una amplia respuesta inmune celular (44).

Ya que los linfocitos T derivados de diferentes hospederos como humanos, ratones y bovinos, proliferan mostrando un perfil de citoquinas Th1 de manera análoga en respuesta a la infección por *Brucella* (32), las vacunas deberían preferencialmente inducir un patrón Th1, para generar una óptima resistencia contra la infección inducida por esta bacteria. La inducción de una respuesta Th2 parece ser contraproducente para el control de la infección causada por estas bacterias.

## Conclusiones

Los anticuerpos dirigidos contra los LPS juegan un papel importante en la inmunidad protectora contra brucelosis causada por cepas lisas. Otros antígenos probablemente proteicos pueden estar involucrados en la protección contra cepas lisas ya que vacunas desarrolladas con cepas rugosas han protegido ratones contra el reto con cepas lisas como la *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*. Estas proteínas no son necesariamente componentes de superficie celular y

probablemente protegen a través de su capacidad para inducir respuesta inmune celular. Los patrones de respuesta celulares y de citoquinas, entre diferentes especies mamíferas incluyendo el hombre, encontrados después de la estimulación con *Brucella* son similares. Sin embargo, estos patrones cambian de acuerdo a la naturaleza del antígeno empleado, es decir que varían dependiendo si el reto se realiza con cepas vivas, atenuadas, muertas o derivados proteicos bacterianos. De esta manera la producción temprana de IL-12 durante la infección por *Brucella* por los macrófagos, es de vital importancia para producción de citoquinas tipo Th1, como el IFN $\gamma$ , el cual activa macrófagos y regula negativamente la expresión de citoquinas Th2 como la IL-10, que a la vez regula negativamente esos mecanismos. Aunque se ha demostrado un efecto pleiotrópico para el gen *Nramp1* que regula la resistencia natural a la *Brucella* y a otros patógenos intracelulares en el modelo murino, es de vital importancia determinar las funciones que regula este gen en otros modelos como el bovino. Sorprendentemente estos patógenos han desarrollado estrategias eficientes para la sobrevivencia y

perpetuación de la infección dentro de sus hospederos. El conocimiento de los mecanismos requeridos para una eficiente protección contra esta bacteria permitirá el desarrollo de vacunas dirigidas a la estimulación de estos patrones que están involucrados en el control de la infección.

En la Figura 1 se hace una representación esquemática de la respuesta inmune generada contra la *Brucella*. Inicialmente el macrófago infectado produce TNF $\alpha$  que actúa autocrinamente e IL-12 que activa la producción de citoquinas tipo Th1, como el IFN $\gamma$ . Esta citoquina a su vez activa macrófagos y regula negativamente la producción de IL-10, la cual regula negativamente estos mecanismos. Adicionalmente los macrófagos infectados regulan la expresión, de moléculas de adhesión como el B7.1, B7.2 e ICAM-1 que favorecen la adhesión entre células presentadoras de antígeno y los LT e indirectamente por medio de la IL-12, regulan otras moléculas de adhesión como el LFA-1 sobre los linfocitos.

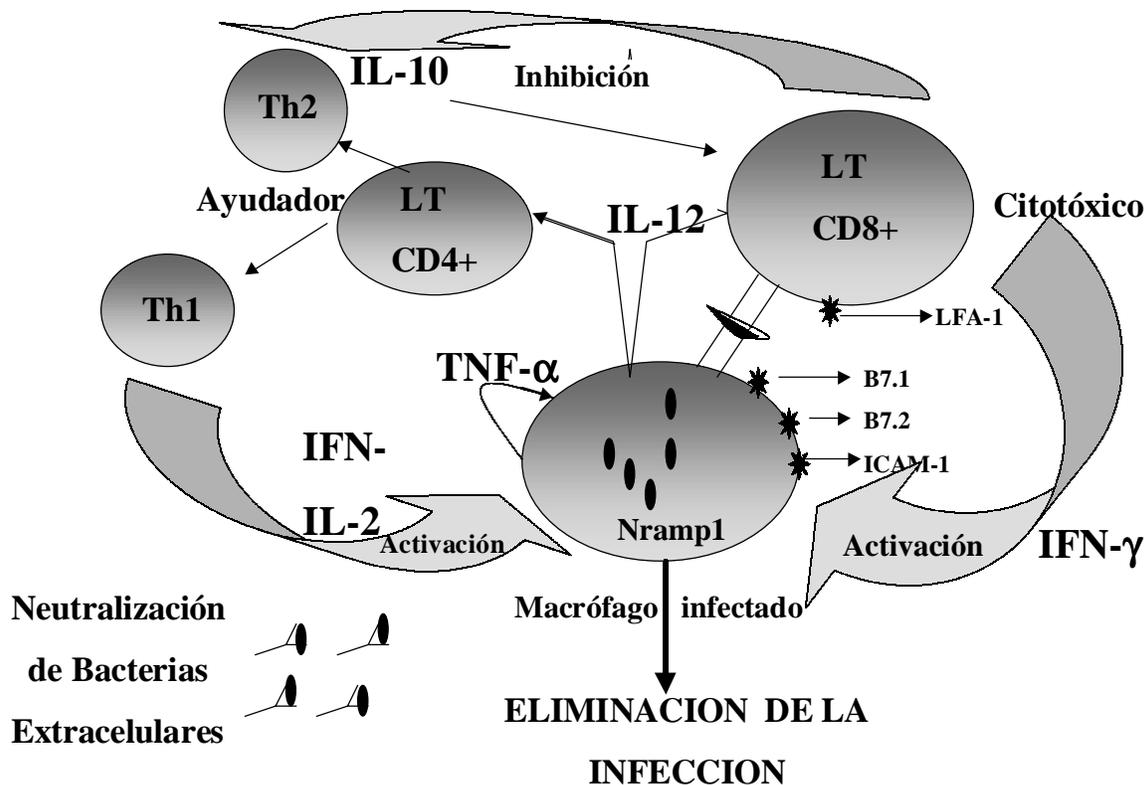


Figura 1. Representación esquemática de la respuesta inmune dirigida contra *Brucella* ssp.

## Agradecimientos

A la profesora Fabiola Toro por la revisión de este manuscrito.

### Summary

#### *Immune Response and Strategies of xxx in the infection by Brucella spp*

*Brucella is a Gram-negative intracellular facultative bacterium causing persistent infection in humans and domestic and wild animals. This bacterial genus replicates in host mononuclear phagocytes evading the extracellular soluble mechanisms of the immune response. The infection induced by this bacterium is quite complex and depends on the pathogen and on the activated defense mechanisms of the host. Macrophages, Th 1 cytokines and cytotoxic cells actively participate in the resolution of the infection. Although the macrophages of the host actively and efficiently phagocyte these bacteria, the parasite has developed mechanisms for intracellular survival. The understanding of the interaction of the immune system with these microbial pathogens would allow us the development of new efficient strategies directed to prevent and control this broadly distributed pathogen. This review emphasizes on some of the innate and specific immunologic mechanisms involved in the clearance of the infection caused by Brucella species and on recent literature on animal models of the disease.*

**Key words:** *B. abortus, immunity, survival*

## Referencias

- Araya LN, Elzer PH, Rowe GE, Enright FM. and Winter AJ. Temporal development of protective cell mediated and humoral Immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. J Immunol. 1989; 143: 3330-3337.
- Bertram TA, Canning PC, and Roth JA. Preferential inhibition of primary granule release from Bovine neutrophils by a *Brucella abortus* extract. 1986; 5 (1): 285-292
- Canning PC, Roth JA, Tabatabai LB, and Deyoe BL. Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. J Infect Dis. 1985; 152(5):913-921.
- Canning PC, Roth JA, Deyoe LB. Release of 5' guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. J Infect Dis. 1986; 154: 464-470.
- Caron E, Gross A, Liautard JP. and Dornand J. *Brucella* species release a specific. protease -sensitive, inhibitor of TNF $\alpha$  expression, active on human macrophage-like cells. J Immunol. 1996; 2885-2893.
- Corbeil LB, Blau K, Inzana TJ, Nielsen KH, Jacobson RH; et al Infect Immun. 1998; 56(12): 3251-3261.
- Crowford RP, Adams GA, and William JD. Relationship of days in gestation at exposure and development of Brucellosis in strain 19 vaccinated heifers. Am J Vet Res. 1988 49(7):1037-1039.
- Elzer PH, Phillips RW, Robertson GT and Roop RM. The HtrA response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. Infect Immun. 1996; 64(11):4838-4841.
- Feng YL, Li M, Hashad M, Schurr E, Gros P, et al. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. Gen Res, 1996; 6:956-964
- Fernandes DM and Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. Infect and Immun. 1995; 63(3):1130-1133.
- Folch H, Rojas X, Oñate A, Alonso O, Leyan V, et al. Humoral and cellular response in calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. Arch. Med. Vet. XXVII, Número Extraordinario, 1995.
- Freer E, Moreno E, Moriyon I, Pizarro-Cerda J, Weintraub A. et al. *Brucella*- *Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella spp.* counterparts. J Bacteriol. 1996,178(20): 5867-5876.
- Frenchick PJ, Markham JF and Cochrane AH. Inhibition of phagosome- lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. Am J Vet Res. 1984; 46(2):333-335.
- Godfroid F, Taminiau B, Danesse I, Denoel P, Tibor A, et al. Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of Lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. Infect and Immun. 1998; 66(11):5485-5493.
- Gómez G, Moreno LF, Umaña G. Elaboración de vacunas a partir de fracciones antigénicas de *Brucella abortus*. Netw Brucellosis res. The United Nations. University Press, 1991.
- Gómez PH, Rueda E, Gallego I, Villamil M, Mariño OC. Mecanismos de protección inducidos por proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepa RB51. Arch. Med. Vet. XXVII, Número extraordinario, 1995.
- Gross A, Spiesser S, Terraza A, Rout B, Caron E, et al. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. 1998; 66:4.

18. Harmon BG, Templeton JW, Crawford RP, Heck FC, Williams JD, *et al.* Macrophage function and immune response of naturally resistant and susceptible cattle to *Brucella abortus*. Genetic Control of host resistance to infection and malignancy. 1985; 345-354.
19. Harmon BG, Adams LG and Frey M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. Am. J. Vet. Res. 1989; 49:1092-1097.
20. Ho M. and Cheer 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. 1982; 146:381-387.
21. Hoffmann EM, and Houle JJ. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. Critical Reviews in Microbiology. 1995; 21(3): 153-163.
22. Hoffmann EM and Houle JJ. Failure of *Brucella abortus* lipopolisaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement.. Vet Immunol Immunopathol. 1983; 5(1): 65-76.
23. Jiang X, Leonarad B, Benson R, Baldwin CL. Macrophage control of *Brucella abortus*, role of oxygen intermediates and nitric oxide. Cell Immunol. 1993a; 15: 309-319.
24. Jiang X and Baldwin C.I. Effect of cytokines on the ability of macrophages to control intracellular *Brucella abortus*. Infect. Immun. 1993b; 61: 124-134.
25. Liautard JP, Gross A, Dornand J and Kohler S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella spp.* Microbiol SEM 12. 1996; 197-206.
26. Mariño OC, Gallego IM, Rueda E, Sedano L and Schurig G. Evaluation of a potential vaccine: *Brucella abortus* RB51 susceptibility and protection in guinea pigs. Networking in Brucellosis Research II: Proceedings of the UNU/BIOLAC Brucellosis Workshop. The United Nations University Press, Tokyo, Japan, 1998.
27. Martinez de Tejada G, Pizarro -Cerdeja J, Moreno E. and Moriyon I. The outer membranes of *Brucella spp.* are resistant to bactericidal cationic peptides. Infect and Immun. 1995; 63(8):3054-3061.
28. Montaña NI, Rueda OE, Calderón CP, Ortega A, Puentes AR, *et al.* Medición de la respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *B. abortus* RB51 en bovinos. Arch. Med. Vet. 1998; 30 (2): 110 - 115.
29. Montaraz JA and Winter AJ. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/C mice. Infect Immun. 1986; 53: 245-251.
30. Oliveira SC, and Splitter GA. Subcloning and expression of the *Brucella abortus* L7/L 12 ribosomal gene and T-lymphocyte recognition of the recombinant protein. Infect Immun. 1994; 62:5201-5204.
31. Oliveira SC, and Splitter G.A. CD8+ type 1 CD44<sup>hi</sup>CD45Rb<sup>lo</sup> T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II deficient mice. Euro J Immunol. 1996; 25: 2551-57.
32. Olivera SC, Harms JS, Rech EL., Rodarte RS, Bocca AL, Goes AM and Splitter GA. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. Brazil J Med Biol Res. 1998; 31:77-84.
33. Oñate A y Folch H. Proteína de 18.5 KDa: un antígeno interesante en *Brucella*. Arch. Med. Vet. XXVII, Número extraordinario, 1995.
34. Qureshi T, Templeton JW and Adams GA. Intracellular survival of *B. abortus*, *M. bovis* (BCG), *S. dublin* and *S. typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. Vet Immun Immunopath. 1996; 50: 55-65.
35. Riley LK and Robertson DC. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun. 1984; 46: 224-230.
36. Schurig GG, Pringle AT and Breese SS. Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral response in *Brucella abortus* infected cattle. Infect Immun. 1981; 34: 1000-1007.
37. Stevens MG and Steven CO. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. Infect Immun.. 1996b; 64(3):1030-1034.
38. Stevens MG, Olsen SC, Palmer MV and Pugh G. Immune response and resistance to brucellosis in mice vaccinated orally with *Brucella abortus* RB51. Infect Immun. 1996a; 64: 4534-4541.
39. Svetic A, Jian YC, Lu P, Finkelman FD and Gause WC. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterised by elevated IL-10 and IFN $\gamma$  in CD4+ T cells. Internat Immunol. 1993; 5(8): 877-883.
40. Tatum FM, Detilleux PG, Sacks JM and Halling SM. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: Analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. Infect Immun.. 1992; 60(7):2863-2869.
41. Vidal S M, Tremblay M L, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, *et al.* The Ity/Lsh/Bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the of the Nramp1 gene. J. Exp. Med, 182: 655-666.
42. Villamil M, Rueda E., Gallego I, Mariño OC y Gutiérrez A. Respuesta inmune humoral y celular en cobayos inmunizados con proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepa RB51. Arch. Med. Vet. XXVII, Número extraordinario, 1995.
43. Winter AJ, Duncan JR, Santisteban CG, Douglas JT and Adams LG. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. Infect Immun. 1989; 57: 3438-3444.
44. Zaitseva M, Golding H, Manischewitz J, Webb D y Golding B. *Brucella abortus* as a potential vaccine

- candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infect Immun.*, 1996; 64: 3109-3117.
45. Zaitseva MB, Golding H, Betts M, Yamauchi A, Bloom ET, *et al.* Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following *in vitro* stimulation with heat-inactivated *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 1995; 63(7): 2720-28.
  46. Zhan Y and Cheers CH. Differential induction of macrophages-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria *in vitro*. *Infect Immun.* 1995b; 63(2): 720-723
  47. Zhan Y and Cheers CH. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 1995a; 63(4):1387-1390.
  48. Zhan Y and Cheers C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 1993a; 61: 4899-4901.
  49. Zhan Y, Kelso A and Cheers C. Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts, *Immunol.* 1993b; 80: 458-464.
  50. Zhan Y, Kelso A and Cheers CH. Differential activation of *Brucella*- reactive CD4+ T cell by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Infect Immun.* 1995c; 63(3): 969-975.
  51. Zhan Y, Liu Z A~ Cheers CH. Tumor necrosis factor alpha and Interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect Immun.* 1996; 64(7): 2782-86.