

Studio delle principali citochine responsabili del tipo di risposta immune Th1/Th2 in bovini vaccinati con *Brucella abortus* RB51

A. Polci, A. Leone & A. Di Provvido

Riassunto

Nel presente lavoro è stata sviluppata una metodica RT-PCR real-time per valutare l'espressione dell'interferone-gamma (IFN- γ) e dell'interleuchina-4 (IL-4) in bovine vaccinate con *Brucella abortus* RB51. Cellule polimorfonucleate del sangue periferico (PBMC) di manze vaccinate con *B. abortus* RB51, sono state stimolate *in vitro* con lo stesso antigene vaccinale e con un mitogeno generico concanavalina A (ConA). I dati ottenuti confermano che, anche nel bovino, la risposta immune indotta dal ceppo RB51 è preferenzialmente di tipo Th1: espressione di IFN- γ e assenza di espressione di IL-4. Inoltre, le cellule PBMC, stimolate *in vitro* con *B. abortus* RB51, esprimono valori di IFN- γ significativamente più elevati nei bovini vaccinati rispetto ai bovini non vaccinati.

Parole chiave

Brucella abortus RB51, RT-PCR Real-time, IFN- γ , IL-4, Th1/Th2, Citochine, Immunità cellulo-mediata.

Introduzione

Brucella abortus RB51 è un ceppo mutante, rifampina resistente, incapace di sintetizzare l'omopolimero di N-formil-4-amino,4-6-dideossimannosio (catena-O) normalmente presente nella parete lipopolisaccaridica di *Brucella spp.* a morfologia liscia (S-LPS) (28). L'efficacia e la sicurezza del ceppo RB51 come vaccino sono state ampiamente documentate (8, 9, 15, 19,26). L'Unione Europea ha autorizzato per la prima volta nel 2002 l'utilizzo del vaccino *Brucella abortus* RB51 (RB51) per l'immunizzazione di bovine a rischio di infezione con *B. abortus* (Decisione della Commissione Europea 2002/598/CE del 15 luglio 2002) (12).

Il ceppo vaccinale RB51 non induce negli animali vaccinati la produzione di anticorpi contro S-LPS (30,34), risulta quindi impossibile discriminare con le tecniche sierologiche previste dalla normativa europea (30, 27) gli animali vaccinati da quelli sani. Inoltre, altri autori riferiscono che il ceppo vaccinale RB51 è comunque in grado di sintetizzare porzioni parziali dell'antigene-O (11) e quindi animali vaccinati con questo ceppo possono risultare positivi o dare risposte ambigue con i convenzionali tests sierologici (23), basati sulla rilevazione di anticorpi IgG1 diretti contro epitopi presenti sul S-LPS di *Brucella sp.* (3, 6, 17, 22). Infine, i bovini infetti da *B. abortus*, anche se vaccinati con RB51, reagiscono alle prove sierologiche classiche previste dalla normativa europea (9).

E' stato provato che l'immunità protettiva indotta da *B. abortus* RB51 è principalmente di tipo cellulo-

mediata (CMI) (4), con l'induzione di IFN- γ ma non di IL-4 (14, 37, 38, 39). Anche *B. abortus* è un potente stimolatore dell'immunità cellulo-mediata (13, 41) e l'attivazione dei macrofagi con IFN- γ risulta essere un importante fattore di controllo nei confronti dell'infezione brucellare (5).

Le citochine giocano un ruolo importante nel regolare la risposta immune; il tipo e le quantità relative di espressione di queste molecole guidano il sistema immune verso il tipo di risposta cellulo-mediata (Th1) o verso il tipo di risposta umorale (Th2) (21, 36).

Il tipo cellulare Th1 produce principalmente interleuchina 2 (IL-2), interferone gamma (IFN- γ), fattore di necrosi tumorale (TNF- α) e IL-12, mentre la linea cellulare Th2 produce IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. In particolare IFN- γ e IL-4 vengono considerati i principali markers discriminanti tra la risposta immune di tipo Th1 e quella di tipo Th2 (7, 20). In questo lavoro abbiamo sviluppato un metodo RT-PCR real-time per valutare le differenze di espressione genica di IFN- γ e IL-4 in cellule PBMC di bovini non vaccinati e vaccinati con RB51.

Materiali e metodi

Animali

Le prove sono state condotte su quindici manze di razza frisona provenienti da un allevamento ufficialmente indenne da brucellosi, tenute in ambiente protetto da eventuali introduzioni di *Brucella* sp. Dieci manze sono state vaccinate, per via sottocutanea (s.c.) con 2 ml di *B. abortus* RB51 (5×10^9 /ml) (26) e 5 inoculate via s.c. con 2 ml di soluzione fisiologica (gruppo di controllo).

Colture cellulari e stimolazione in vitro

Da ogni animale sono stati prelevati 10 ml di sangue in acido etil-diamminico-tetracetico (EDTA). Le cellule PBMC sono state isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità attraverso Ficoll-Hypaque (densità 1083, Sigma) (18). Le cellule sono state contate dopo colorazione con

trypan blue (TB) utilizzando una camera di Burker e quindi risospese in terreno RPMI con l'aggiunta di glutammina (1%), penicillina 100 UI/ml, streptomina 100 μ g/ml, gentamicina 5 μ g/ml, nistatina 50 UI/ml e siero fetale bovino 10% (FBS) (18).

Le cellule, ottenute da ogni campione di sangue, sono state poste in coltura in piastre da 48 pozzetti (2×10^6 cellule per pozzetto) e incubate a 37 °C al 5% di CO₂ (10) con ConA (10 μ g/ml; Sigma) o *B. abortus* RB51 (rapporto 100 a 1, *B. abortus* RB51 vs PBMC) o con solo RPMI per il controllo negativo. Le cellule sono state raccolte a 6, 9, 12 e 24 ore post-stimolazione (p.s.) e processate per l'estrazione di RNA.

Estrazione di RNA

Dopo allontanamento del terreno di crescita, l'RNA totale è stato estratto dal lisato cellulare utilizzando RNeasy mini kit (Qiagen), quindi trattato con RNase-Free DNase Set 50 (Qiagen) per la digestione del DNA genomico (gDNA), secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice, ed eluito in 50 μ l di acqua RNase-free.

Primers e Probe TaqMan

I primers e il probe TaqMan per IL-4 bovina sono stati disegnati utilizzando il software Primer Express (Applied Biosystems) sulla sequenza del gene per la interleuchina-4 bovina (GeneBank, codice di accesso AH003241). Primers e probe sono stati disegnati sulla regione individuata da due esoni consecutivi del gene in modo da rendere più specifica l'amplificazione del mRNA per IL-4. Per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e per IFN- γ bovine si sono utilizzati i primers e probes TaqMan pubblicati da Leutenegger *et al.* (18). Ogni probe è marcato all'estremità 5' con il reporter FAM (6-carbossifluorosceina) e all'estremità 3' con il quencher TAMRA (6-carbossitetrametil-rodamina) ed è bloccato all'estremità 3' per prevenire l'estensione operata dalla polimerasi AmpliTaq

Tabella I
Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati

Nome	Primer	Sequenza (5'-3')	Probe	Sequenza del Probe (5'-3')
GAPDH	GAPDH.463f GAPDH.582r	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA CCCTCCACGATGCCAAAAGT	GAPDH.489p	ATACCCTCAAGATTG TCAGCAATGCCTCCT
IFN- γ	IFN.287f IFN.12.737r	TGGATATCATCAAGCAAGACATGTT GGTCTCAGTTGCAGGTTCTGG	IFN.378p	GGAATTGAATCAGC CAGATCATCCACC
IL-4	IL-4f IL-4r	CCATGGACACAAGTGTGATATTACC TACAGCAGCTCCATGCATG	IL-4p	CGCTGAACATCCTCAC AACGAGAAAG

Gold. Tutti i primer e probe sono stati sintetizzati da Applied Biosystems (Tabella I).

Real-time TaqMan RT-PCR one-step per la quantificazione delle citochine

Le reazioni di RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) per ogni citochina e per il GAPDH (housekeeping-gene) sono state effettuate in tubi separati su piastra per PCR real-time a 96 pozzetti (Applied Biosystems). Le reazioni di trascrittasi inversa e di amplificazione del cDNA sono state eseguite in un'unica fase. Ogni reazione di RT-PCR conteneva, in un volume finale di 25 μ l, 1 μ l di RNA (circa 10-50 ng), 400 nM di ogni primer, 80 nM del probe TaqMan, 12.5 μ l di "one-step" RT-PCR Mastermix e 0,625 μ l di Multiscribe (Applied Biosystems).

Le reazioni di RT-PCR sono state realizzate con ABI Prism 7700 alle seguenti condizioni: 30 min. a 48 °C per la reazione di RT, 10 min. a 95 °C per l'attivazione della AmpliTaq Gold e 50 cicli di 15 sec. a 95 °C e 1 min. a 60 °C.

Quantificazione relativa delle citochine

L'espressione genica di IFN- γ e IL-4 è stata calcolata mediante quantizzazione relativa; tale metodo compara il ciclo soglia (Ct) della citochina del campione di interesse con il Ct generato da un campione di riferimento chiamato "calibratore" (PBMC non stimolate). L'espressione delle interleuchine testate è stata normalizzata rispetto all'espressione del GAPDH mediante il valore del Δ Ct ("Ct interleuchina" meno "Ct Gapdh"). È stato calcolato quindi il $\Delta\Delta$ Ct come differenza tra i valori di Δ Ct per i PBMCs stimolati e i valori di Δ Ct dei rispettivi PBMCs non stimolati. Infine, la differenza relativa di espressione delle interleuchine tra le cellule stimolate con ConA o *B. abortus* RB51 e le rispettive cellule non stimolate è stata calcolata applicando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Questa formula è applicabile solo se la reazione di amplificazione per le citochine analizzate risulta identica a quella del housekeeping-gene e se i livelli di espressione di quest'ultimo non sono soggetti a variazioni

Tabella II

Valori medi di CT per l'espressione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), misurati, nelle cellule polimorfonucleate di sangue periferico bovino (PBMCs), alle differenti condizioni sperimentali

Tempo	6 h	9 h	12 h	24 h
PBMCs non stim.	23.66 \pm 0.66	23.71 \pm 0.67	26.33 \pm 2.60	26.32 \pm 3.51
PBMCs stim. con ConA	23.52 \pm 0.56	23.18 \pm 0.65	24.37 \pm 2.31	23.06 \pm 4.55
PBMCs stim. con <i>Brucella abortus</i> RB51	24.40 \pm .50	24.23 \pm 0.30	23.61 \pm 1.80	24.11 \pm 2.20

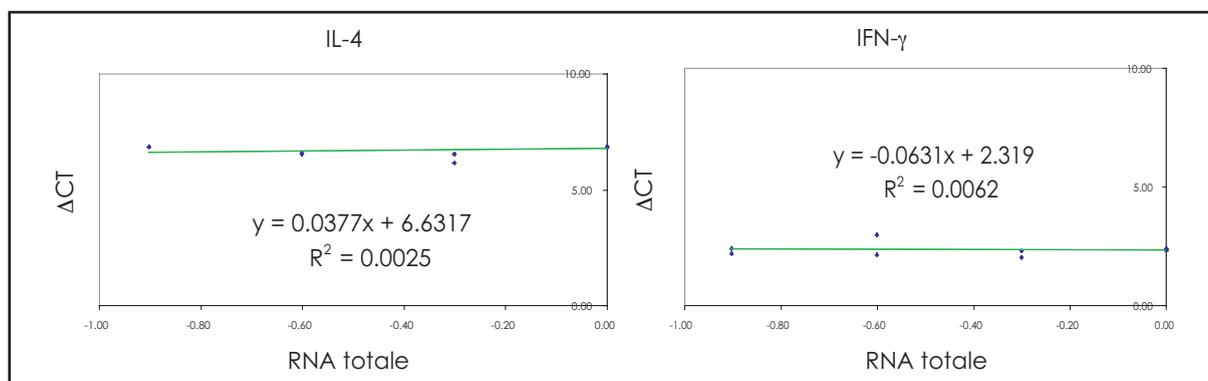


Figura 1
Grafico del Log della quantità di RNA totale rispetto al ΔC_t calcolato per gliceraldeide-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) ed ognuno dei geni considerati.

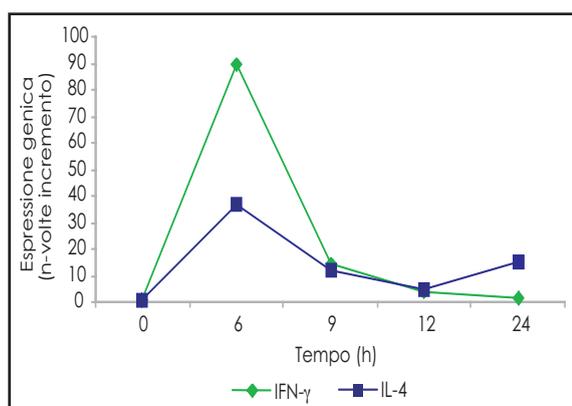


Figura 2
Cinetica dell'espressione genica di IFN- γ e IL-4 in PBMC di bovino stimolate con ConA. RNA è stato estratto dalla cellule PBMC stimolate e non stimolate dopo 6, 9, 12 e 24 ore. I risultati sono espressi come n-volte incremento dell'espressione di IFN- γ o IL-4 nelle cellule stimolate con ConA rispetto alle cellule non-stimolate

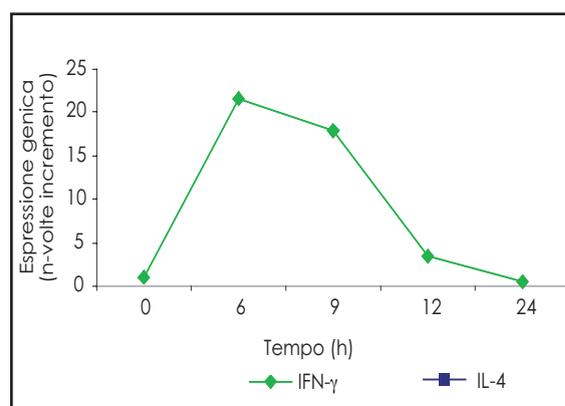


Figura 3
Cinetica dell'espressione genica del IFN- γ in PBMC di bovino stimolate con *B. abortus* RB51. RNA è stato estratto dalla cellule PBMC stimolate e non stimolate dopo 6, 9, 12 e 24 ore. I risultati sono espressi come n-volte incremento dell'espressione di IFN- γ nelle cellule stimolate con *B. abortus* RB51 rispetto alle cellule non-stimolate

significative legate alle condizioni sperimentali. Abbiamo effettuato la reazione di RT-PCR su sei diluizioni scalari di RNA estratto dai PBMCs stimolati con ConA ed abbiamo verificato, per ognuna delle interleuchine testate, che l'efficienza della reazione di amplificazione è approssimativamente identica a quella del GAPDH (Fig. 1).

Inoltre i valori medi di espressione del GAPDH nelle diverse condizioni sperimentali non sono

soggetti a variazioni significative come mostrato dai dati riportati nella Tabella II.

Risultati

In seguito alla stimolazione *in vitro* delle cellule PBMC con ConA, sia IFN- γ che IL-4 mostrano un massimo di espressione genica a 6 ore post stimolazione (p.s.), con livelli medi rispettivamente

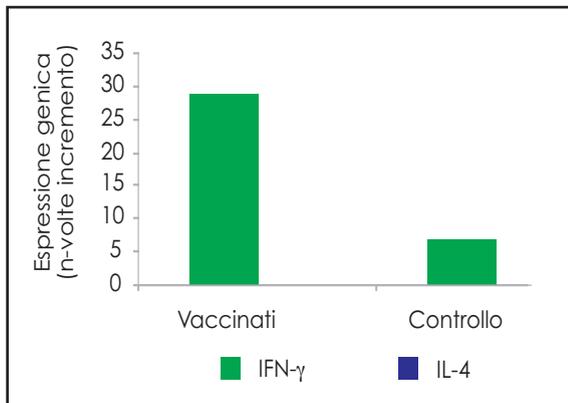


Figura 4
Espressione genica di IFN- γ e IL-4 in cellule polimorfonucleate di sangue periferico (PBMC) stimulate *in vitro* con *B. abortus* RB51 per 6 ore. I valori di espressione di IFN- γ risultano significativamente più elevati nei bovini vaccinati con *B. abortus* RB51 rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$)

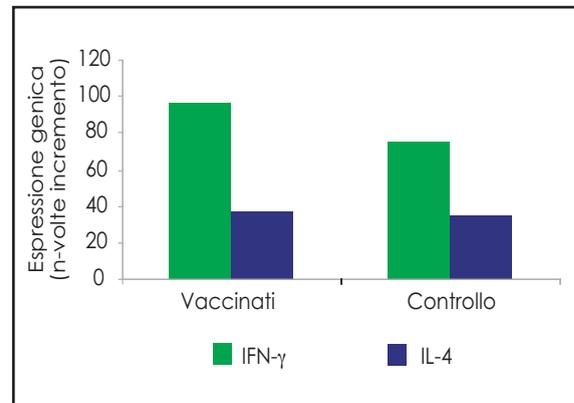


Figura 6
Espressione genica di IFN- γ e IL-4 in cellule polimorfonucleate di sangue periferico (PBMC) stimulate *in vitro* con ConA per 6 ore. I valori di espressione genica di IFN- γ e IL-4 tra gli animali vaccinati con *Brucella abortus* RB51 ed il gruppo di controllo, non risultano significativamente differenti

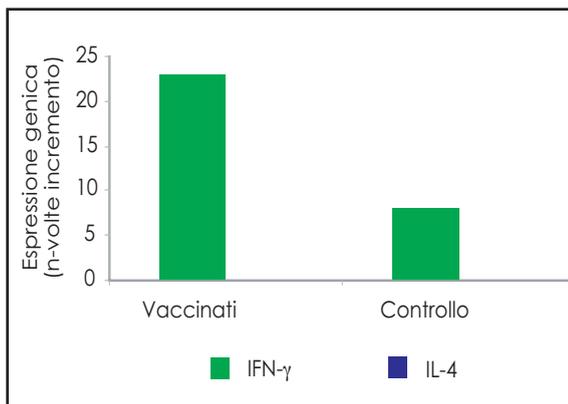


Figura 5
Espressione genica di IFN- γ e IL-4 in cellule polimorfonucleate di sangue periferico (PBMC) stimulate *in vitro* con *B. abortus* RB51 per 9 ore. I valori di espressione di IFN- γ risultano significativamente più elevati nei bovini vaccinati *B. abortus* rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$)

di 90 volte e 37 volte più alti dei valori medi trovati nelle cellule non stimulate (Fig. 2). L'IFN- γ nei PBMCs stimolati con *B. abortus* RB51 mostra un analogo profilo temporale con valore di espressione medio 22 volte più alto rispetto alle cellule non stimulate dopo 6 ore (Fig. 3); mentre non abbiamo

rilevato alcuna espressione genica per IL-4 (dati non mostrati).

Abbiamo analizzato l'espressione dell'IFN- γ e della IL-4 nei bovini vaccinati con *B. abortus* RB51 nelle cellule PBMC stimulate *in vitro* per 6 e 9 ore con lo stesso antigene vaccinale. I valori di espressione dell'IFN- γ nel gruppo vaccinato risultano essere maggiori di 22 volte dopo 6 ore di stimolazione (Fig. 4) e di 15 volte dopo 9 ore di stimolazione rispetto al gruppo di controllo (non vaccinati) (Fig. 5).

Il confronto dei valori di espressione genica ottenuti, elaborati con il test T di Mann-Whitney, restituisce una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra il gruppo di controllo e gli animali vaccinati; mentre non si hanno differenze significative dopo 12 e 24 ore di stimolazione. Non risulta espressione genica della IL-4 nelle cellule PBMC stimulate con *B. abortus* RB51.

Nelle cellule PBMC stimulate con ConA per 6 ore la media dei valori di espressione genica per IFN- γ e IL-4 risulta essere più elevata se riferita alle stesse cellule trattate con RB51 (Fig. 6), tuttavia non risultano

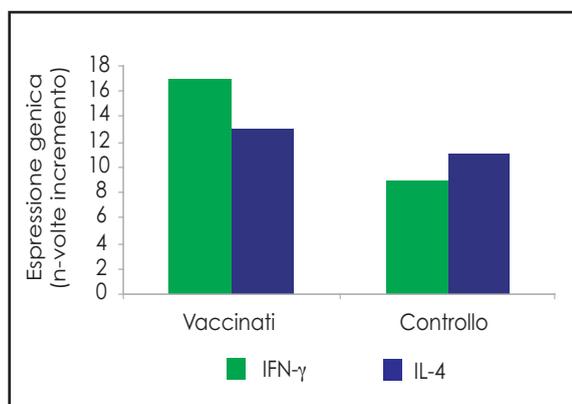


Figura 7

Espressione genica di IFN- γ e IL-4 in cellule polimorfonucleate di sangue periferico (PBMC) stimolate *in vitro* con ConA per 9 ore.

I valori di espressione genica di IFN- γ e IL-4 tra gli animali vaccinati con *Brucella abortus* e il gruppo di controllo, non risultano significativamente differenti

differenze significative tra il gruppo di controllo e gli animali vaccinati. Analogamente non si hanno differenze significative tra i due gruppi dopo 9 ore di stimolazione con ConA (Fig. 7).

Discussione

La vaccinazione con *B. abortus* RB51 conferisce protezione nei confronti di infezioni patogene sia nel topo (16, 31, 33, 35) che nel bovino (19, 25, 26, 32). La protezione indotta dalla vaccinazione con *B. abortus* RB51 si basa principalmente sull'immunità cellulo-mediata, mentre la risposta immune umorale assume un ruolo meno importante (16, 31, 35). I dati del nostro lavoro: espressione di IFN- γ e assenza d'espressione della IL-4 nelle cellule PBMC stimolate *in vitro* con *B. abortus* RB51, sia nei bovini vaccinati che nel gruppo di controllo, confermano che l'antigene induce principalmente la produzione di citochine del tipo Th1 e concordano con le conclusioni trovate da altri autori (2, 4, 29, 40). Inoltre, il confronto dei dati, tra gli animali vaccinati con *B. abortus* RB51 ed il gruppo di controllo (animali non vaccinati

ed indenni da brucellosi), evidenzia valori di espressione di IFN- γ significativamente più elevati negli animali vaccinati.

Dai dati di un precedente studio condotto sul topo (27) risulta che negli animali vaccinati con *B. abortus* RB51 gli splenociti stimolati *in vitro*, con lo stesso antigene vaccinale o con *B. abortus* 2308, producono IFN- γ ma non sintetizzano IL-4. Per contro, dopo infezione degli animali con *B. abortus* 2308, gli splenociti stimolati *in vitro* sintetizzano anche IL-4, sia nei topi vaccinati che nel gruppo dei non vaccinati. Inoltre, la sintesi di IFN- γ risulta essere significativamente più precoce nelle cellule derivate dai topi vaccinati con *B. abortus* RB51 rispetto ai non vaccinati.

Se consideriamo assieme i dati ottenuti dal nostro lavoro e quelli ottenuti da Pasquali *et al.* (27), sembra plausibile ipotizzare che la produzione di IL-4, negli splenociti o PBMC stimolati *in vitro* con *B. abortus* RB51, sia strettamente correlata all'infezione degli animali con il ceppo virulento *B. abortus* 2308; mentre non si avrebbe produzione di IL-4 negli animali solo vaccinati.

Attualmente, gli unici due test capaci di individuare i bovini vaccinati con *B. abortus* RB51 sono il test dot-blot (24) e la fissazione del complemento con antigene specifico RB51 (FdC-RB51) (1). Il test dot-blot riesce ad individuare il titolo anticorpale fino a 8 settimane post-vaccinazione; purtroppo, pur essendo altamente specifico per i bovini vaccinati con 10^{10} CFU (unità formanti colonia) di *B. abortus* RB51, non è in grado di individuare gli animali vaccinati con una dose inferiore (10^9 CFU di RB51). Mentre la FdC-RB51 riesce ad individuare con alta specificità fino a 18 settimane post-vaccinazione i bovini immunizzati con ambedue le dosi di *B. abortus* RB51 (1).

Poiché, come risulta dai nostri dati, esiste una differenza significativa di espressione di IFN- γ

tra i bovini vaccinati e quelli non vaccinati, ancora sei mesi dopo la vaccinazione, la metodica qui utilizzata potrebbe rivelarsi anche uno strumento utile per discriminare tra bovini sani e bovini immunizzati con *B. abortus* RB51; in particolare in quei casi in cui gli animali vaccinati diano risposte ambigue nei convenzionali test sierologici (23). Per contro, il ritrovamento di espressione di IL-4 dopo il test starebbe a indicare la probabile interazione degli animali con il ceppo virulento *B. abortus* 2308, indipendentemente dal fatto che essi siano stati vaccinati o meno con *B. abortus* RB51.

Bibliografia

1. Adone R., Ciuchini F. & Olsen S. 2001. Field validation of the use of RB51 as antigen in a complement fixation test to identify calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin Diag Lab Immunol* **8**, 385-387.
2. Agranovich I., Scott D.E., Terle D., Lee K. & Golding B. 1999. Down-regulation of Th2 responses by *B. abortus*, a strong Th1 stimulus, correlates with alterations in the B7.2-CD28 pathway. *Infect Immun*, **67**, 4418-4426.
3. Allan G., Chappel R., Williamson P. & McNaught D. 1976. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J Hyg*, **76**, 287-298.
4. Araya L.N. & Winter A.J. 1990. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *B. abortus* by passive transfer of immune T-cells or serum. *Infect Immun*, **58**, 254-256.
5. Baldwin C.L. & Parent M. 2002. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet Microbiol*, **90**, 367-382.
6. Butler J., Seawright G., McGivern P. & Gilsdorf M. 1986. Preliminary evidence for a diagnostic immunoglobulin G1 antibody response among culture-positive cows vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenge exposed with strain 2308. *Am J Vet Res*, **47**, 1258-1264.
7. Cher D.J. & Mosmann T.R. 1987. Two types of murine helper T cell clone: II: Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol*, **138**, 3688-3694.
8. Cheville N.F., Jensen A.E., Halling S.M., Tatum F.M., Morfitt D.C., Hennager S.G., Frerichs W.M. & Schurig G.G. 1992. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *B. abortus*. *Am J Vet Res*, **53**, 1881-1888.
9. Cheville N.F., Jensen A.E., Halling S.M., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *B. abortus*. *Am J Vet Res*, **54**, 1591-1597.
10. Choi I.S., Collisson E.W., Maheswaran S.K. & Yoo H.S. 2002. Evaluation of cytokine gene expression in porcine spleen cells, peripheral blood mononuclear cells, and alveolar macrophages by competitive RT-PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **34** (2), 119-126.
11. Clockaert A., Zygmunt M.S. & Guilloteau L.A. 2002. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. *Vaccine*, **20**, 1820-1822.
12. European Commission 2002. Commission Decision 2002/598/EC of 15 July 2002 approving vaccines against bovine brucellosis within the framework of Council Directive 64/432/EEC. *Off J*, **L194**, 5.
13. Golding B., Scott D.E., Sharf O., Huang L.Y., Zaitseva M., Lapham C., Eller N. & Golding H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect*, **3**, 43-48.
14. He Y., Vemulapalli R., Zeytun A. & Schurig G.G. 2001. Mice vaccinated with *B. abortus* RB51 develop specific cytotoxic lymphocytes. *Infect Immun*, **69**, 5502-5508.
15. Jensen A.E., Ewalt D.R., Cheville N.F., Thoen C.O. & Payeur J.B. 1996. Determination of stability of

- B. 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**, 628-633.
16. Jimenez de Bagues M.P., Elzer P.H., Jones S.M., Blasco J.M., Enright F.M., Schurig G.G. & Winter A.J. 1994. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect Immun* **62**: 4990-4996.
 17. Lamb V., Jones L., Schurig G. & Berman D. 1979. Enzyme linked immunoassorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun*, **26**, 240-247.
 18. Leutenegger C.M., Alluwaimi A.M., Smith W.L., Perani L. & Cullor J.S. 2000. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, **77**, 275-287.
 19. Lord V.R., Schurig G.G., Cherwonogrodzky J.W., Marcano M.J. & Melendez G.E. 1998. Field study of vaccination of cattle with *B. abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am J Vet Res*, **59**, 1016-1020.
 20. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. & Coffman R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I: Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, **136**, 2348-2357.
 21. Mosmann T.R. & Coffman R.L. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, **7**, 145-173.
 22. Nielsen K., Heck F., Wagner G., Stiller J., Rosenbaum B., Pugh R. & Flores E. 1984. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assay. *Prev Vet Med*, **2**, 197-204.
 23. Olsen S.C., Evans D., Hennager S.G., Cheville N.F. & Stevens M.G. 1996. Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J Vet Diagn Invest*, **8**, 451-454.
 24. Olsen S.C., Stevens M.G., Cheville N.F. & Schurig G.G. 1997. Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J Vet Diagn Investig* **9**, 363-637.
 25. Olsen S.C., Bricker C.B., Palmer M.V. & Jensen A.E. 1999. Response of cattle to two dosages of *Brucella abortus* RB51: serology clearance and efficacy. *Res Vet Sci* **66**, 101-106.
 26. Palmer M.V., Olsen S.C. & Cheville N.F. 1997. Safety and immunogenicity of *B. abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res*, **58**, 472-477.
 27. Pasquali P., Adone R., Gasbarre L.C., Pistoia C. & Ciuchini F. 2001. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect Immun*, **69**, 6541-6544.
 28. Schuring G.G., Roop R.M., Bagchi T., Boyle S., Buhrman D. & Sriranganathan N. 1991. Biological properties of RB51, a stable, O-chain deficient mutant of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, **28**, 171-188.
 29. Scott D.E., Agranovich I., Inman J., Gober M. & Golding B. 1997. Inhibition of primary and recall allergen-specific T-helper cell type 2-mediated responses by T-helper cell type 1 stimulus. *J Immunol*, **159**, 107-116.
 30. Stevens M.G., Hennager S.G., Olsen S.C., & Cheville N.F. 1994. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J Clin Microbiol*, **32**, 1065-1066.
 31. Stevens M.G., Olsen S.C., Pugh G.W. Jr. & Palmer M.V. 1994. Immune and pathologic response in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect Immun* **62**, 3206-3212.

32. Stevens M.G., Olsen S.C. & Cheville N.F. 1995. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strains 19 or RB51. *Vet Immunol Immunopathol*, **44**, 223-235.
33. Steven M.G., Olsen S.C. & Pugh G.W. Jr. 1995. Comparison of spleen cell proliferation in response to *Brucella abortus* 2308 lipopolysaccharide or proteins in mice vaccinated with strain 19 or RB51. *Infect Immun* **63**, 3199-3205.
34. Stevens M.G. & Olsen S.C. 1996. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. *Infect Immunol*, **64**, 1030-1034.
35. Street N.E., Schumacher J., Fong H.T., Bass A.H., Fiorentino D., Leverah F.J.A. & Mosmann T.R. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells, evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells.
36. Street N.E., Schumacher J., Fong H.T., Bass A.H., Fiorentino D., Leverath F.J.A. & Mosmann T.R. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells, evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J immunol*, **144**, 1629.
37. Vemulapalli R., Cravero S., Calvert C.L., Toth T.E., Boyle S.M., Sriranganathan N. & Schurig G.G. 2000. Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kDa outer membrane protein of *B. abortus*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **7**, 114-118.
38. Vemulapalli R., He Y., Boyle S.M., Sriranganathan N. & Schurig G.G. 2000. *B. abortus* RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses. *Infect Immun*, **68**, 3290-3296.
39. Vemulapalli R., He Y., Cravero S., Sriranganathan N., Boyle S.M. & Schurig G.G. 2000. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. *Infect Immun*, **68**, 3286-3289.
40. Zaitseva M.B., Golding H., Betts M., Yamauchi A., Bloom E.T., Butler L.E., Stevan L. & Golding B. 1995. Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T-cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following *in vitro* stimulation with heat-inactivated *B. abortus*. *Infect Immun*, **63**, 2720-2728.
41. Zhan Y., Yang J. & Cheers C. 1993. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* protein. *Infect Immun*, **61**, 2841-2847.