

# Valutazione della produzione di gamma interferone in bovini vaccinati con *Brucella abortus* ceppo RB51 mediante un test ELISA

Manuela Tittarelli, Fabrizio De Massis, Barbara Bonfini, Mauro Di Ventura & Massimo Scacchia

## Riassunto

In questo lavoro sono presentati i risultati di un test ELISA messo a punto per rilevare la produzione di gamma interferone ( $\gamma$ -interferone) in bovini vaccinati con *Brucella abortus* ceppo RB51 (RB51). Come stimolo antigenico per il sangue intero è stata utilizzata una frazione proteica purificata derivante da RB51 (brucellina RB51). La prova è stata valutata nell'arco di 300 giorni in 10 manze vaccinate in età prepubere con  $10 \times 10^9$  Unità Formanti Colonia di RB51 e in cinque manze di controllo, provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da brucellosi bovina. I capi vaccinati hanno cominciato a fornire risultati positivi a partire dal 17° giorno post vaccinazione (p.v.) fino al giorno 239 p.v. Tutti i capi vaccinati hanno fornito almeno una volta un risultato positivo (indice di stimolazione, IS, superiore a 2,5). Tuttavia, se si esclude il prelievo al giorno 20 p.v. (90% di animali vaccinati risultati positivi), la sensibilità del test oscilla tra il 20% e il 70%, con una media del 40%. IS superiore a 2,5 è stato rilevato anche in tre animali di controllo. Sulla scorta dei risultati ottenuti, si ritiene che il test del  $\gamma$ -interferone non fornisce garanzie sufficienti per consigliarne l'impiego ai fini di riconoscere i bovini vaccinati con RB51, sia come prova individuale, sia come prova d'allevamento.

## Parole chiave

*Brucella abortus*, Brucellosi, Eradicazione, ELISA, Gamma-interferone, RB51, Vaccinazione.

## Introduzione

La Decisione della Commissione Europea (CE) 2002/598/CE del 15 luglio 2002 (5) ha autorizzato l'utilizzo del vaccino *Brucella abortus* ceppo RB51 (RB51) per l'immunizzazione di femmine della specie bovina a rischio di contaminazione da *B. abortus*.

La Decisione prevede che l'Autorità Competente dello Stato membro presenti, alla CE e agli altri Stati membri, informazioni dettagliate relative al programma di vaccinazione, in particolare la zona di vaccinazione, l'età degli animali da vaccinare e il sistema di test utilizzato per identificare gli animali vaccinati.

RB51, mutante in fase rugosa del ceppo virulento *B. abortus* 2308, non induce nei bovini vaccinati la formazione di anticorpi rilevabili con le tecniche sierologiche attualmente previste dalla normativa europea (11, 14, 15). Tale caratteristica, seppur utile nella distinzione degli animali vaccinati da quelli infetti, richiede tuttavia la disponibilità di test alternativi capaci di individuare gli animali vaccinati con vaccino RB51 al fine di soddisfare sia i dettami della normativa europea, sia di individuare l'uso illegale di RB51 nei Paesi dove la vaccinazione con RB51 è vietata. I test fino ad oggi rivelatisi efficaci a tale scopo sono un test dot-blot (10), un test di Fissazione del Complemento (FdC) allestito con antigene specifico RB51 (FdC-RB51) (1) e la combinazione di FdC-RB51 con un test di

intradermoreazione alla brucellina (6). Un metodo utile per svelare la presenza di risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti di *B. abortus* può essere quello di rilevare la produzione di gamma interferone ( $\gamma$ -interferone) a seguito di stimolazione linfocitica con antigene specifico. Il test sfrutta, *in vitro*, il medesimo meccanismo di risposta immunitaria evocabile *in vivo* dal test di intradermoreazione alla brucellina. Gli studi effettuati in tal senso hanno dimostrato come *Brucella* spp. sia in grado di evocare la risposta macrofagica attraverso la produzione di  $\gamma$ -interferone da parte dei linfociti T stimolati sia nei topi (7, 13) sia nei bovini infetti da *B. abortus* (17). Studi effettuati su sangue di bovini vaccinati con RB51 stimolato con il ceppo vaccinale omologo, hanno dato risultati promettenti per quel che riguarda l'individuazione specifica di bovini trattati con RB51 (2). Sebbene il test abbia minore praticità d'uso rispetto ad altri test sierologici, potrebbe essere utile per individuare bovini vaccinati con RB51.

Scopo del presente lavoro è di:

- valutare la produzione di  $\gamma$ -interferone da parte di linfociti di bovini vaccinati in età prepubere con RB51
- valutare la possibilità di individuare i bovini vaccinati con RB51 in età prepubere attraverso l'utilizzo di un test ELISA per il rilievo di  $\gamma$ -interferone.

## Materiali e metodi

### Vaccino RB51

Il vaccino RB51 è stato gentilmente fornito dalla ditta CZ Veterinaria di Pontevedra (Spagna) che lo produce e distribuisce in Europa su licenza della Colorado Serum Company di Denver (USA). Il vaccino, ricostituito secondo le indicazioni della ditta produttrice, conteneva  $5 \times 10^9$  Unità Formanti Colonia (UFC) per ml.

### Animali e vaccinazione

Quindici bovine di razza frisona, di età compresa fra quattro e sei mesi, provenienti da allevamenti Ufficialmente Indenni da Brucellosi bovina, sono state selezionate in

maniera casuale e divise in due gruppi di cinque e dieci animali. Gli animali sono stati sottoposti, prima dell'inizio dell'esperimento, a controllo per brucellosi tramite Siero-agglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala (SAR) e Fissazione del Complemento (FdC), secondo quanto descritto nel *Manuale OIE* (18). Gli stessi capi sono stati sottoposti a prova di dot-blot e FdC-RB51. Tutti gli esami effettuati hanno dato esito negativo. Dieci animali sono stati quindi vaccinati per via sottocutanea con RB51 secondo le indicazioni della casa produttrice (2 ml di sospensione vaccinale ricostituita, pari a  $10 \times 10^9$  UFC). Cinque animali di controllo sono stati inoculati, per via sottocutanea, con 2 ml di soluzione fisiologica sterile. Gli animali sono stati tenuti in condizione di isolamento durante tutto l'esperimento.

### Raccolta dei campioni

I campioni di sangue sono stati raccolti mediante puntura alla vena giugulare in provette sterili contenenti litio – eparina come anticoagulante al giorno 0 (immediatamente prima della vaccinazione), e a giorni 1, 2, 6, 9, 13, 14, 17, 20, 29, 43, 58, 76, 91, 104, 119, 162, 239, 268, 300 dalla vaccinazione (p.v.). I campioni, prontamente refrigerati, sono stati conservati a +4 °C durante il trasporto e inviati al laboratorio entro sei ore. Nello stesso momento sono stati prelevati dai medesimi animali campioni di siero, sottoposti successivamente a test SAR e FdC.

### Stimolazione del sangue intero

Tutte le prove ELISA  $\gamma$ -interferon sono state effettuate entro sei ore dal prelievo. La stimolazione dei campioni di sangue raccolti è stata condotta utilizzando una frazione batterica purificata di RB51 (brucellina RB51) prodotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZS A&M), come descritto in un precedente lavoro (6). La stimolazione è stata condotta in duplicato in micropiastre a 24 pozzetti aggiungendo 100  $\mu$ l di brucellina RB51 diluita in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,2) (40  $\mu$ g di contenuto proteico) ad 1 ml di sangue in esame. Come controllo negativo, 100  $\mu$ l di PBS sono stati aggiunti ad 1 ml di sangue in esame.

Le piastre sono state incubate per 16-24 ore a 37 °C in atmosfera umidificata con CO<sub>2</sub> al 5%. Dopo l'incubazione, la piastra è stata centrifugata per 10 minuti a 800 × g ed è stato raccolto il plasma surnatante.

### Analisi del $\gamma$ -interferone

Il livello di  $\gamma$ -interferone nel plasma raccolto dopo stimolazione è stato valutato mediante un test ELISA (17). Le micropiastre sono state attivate con 100  $\mu$ l di anticorpo monoclonale anti- $\gamma$ -interferone bovino diluito in tampone carbonato bicarbonato, pH 9,6 (5  $\mu$ g/ml) e incubate per una notte a 37 °C. Successivamente, le piastre sono state saturate con tampone diluente (PBS + albumina bovina) ed incubate per due ore a temperatura ambiente. Dopo lavaggio con soluzione fisiologica con 0,01% Tween 20 (200  $\mu$ l/pozzetto), sono stati dispensati 100  $\mu$ l per pozzetto del plasma raccolto in precedenza e 100  $\mu$ l per pozzetto di PBS. Come controlli interni di ciascuna piastra, sono stati utilizzati PBS, per verificare la reazione enzimatica in assenza di campione, un siero bovino positivo di riferimento per RB51 e un siero bovino negativo di riferimento per RB51. Tutti i campioni in esame ed i controlli sono stati saggiati in duplicato. Le piastre sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente e, dopo lavaggio, in tutti i pozzetti sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di anticorpo monoclonale anti- $\gamma$ -interferone bovino coniugato con perossidasi diluito in tampone diluente (5  $\mu$ g/ml). Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente sono stati effettuati i lavaggi e sono stati aggiunti 100  $\mu$ l per pozzetto di substrato. La lettura delle piastre è stata effettuata con uno spettrofotometro ( $\lambda$ =650 nm). I risultati sono stati espressi come Indice di Stimolazione (IS), determinato come rapporto fra la media delle OD del campione in esame e la media delle OD dei pozzetti di controllo negativo. Valori di IS maggiori di 2,5 sono stati considerati positivi, così come descritto da Weynants *et al.* (17).

### Analisi statistica

Sensibilità e specificità del test del  $\gamma$ -interferone sono state stimate usando un approccio bayesiano (12). L'inferenza bayesiana è un'applicazione del teorema di Bayes (3), che

consente di integrare qualsiasi conoscenza precedente (espressa come distribuzione di probabilità a priori), con la probabilità di ottenere un risultato certo se l'animale è infetto o se l'animale è sano (funzioni di probabilità), con i risultati ottenuti dall'applicazione del test ad una data popolazione (dati raccolti). Le funzioni di probabilità dipendono dalla sensibilità e dalla specificità del o dei test utilizzati e dall'incertezza dei loro valori. I risultati finali sono delle distribuzioni di probabilità del numero di animali infetti correttamente identificati come tali (sensibilità) oppure del numero di animali sani correttamente identificati come sani (specificità), nel campione o nella popolazione (probabilità a posteriori). Le probabilità dei vari possibili valori di sensibilità e specificità sono stati stimati usando una funzione di probabilità binomiale e una distribuzione a priori non informativa Uniforme (0,1). È stata utilizzata una distribuzione a priori non informativa Uniforme (0,1) perché la conoscenza a priori della sensibilità o della specificità del test è stata considerata virtualmente nulla. La distribuzione Uniforme (0,1) specifica che, prima della raccolta dei dati, sono considerati possibili tutti i valori veri di probabilità all'interno dell'intervallo definito per il numero di veri positivi (calcolo della sensibilità) o dei veri negativi (calcolo della specificità). I risultati del test ELISA  $\gamma$ -interferone sono stati espressi come percentuale di animali positivi sugli esaminati; gli intervalli di confidenza al 95% (IC) superiori e inferiori sono stati calcolati usando una distribuzione di probabilità Beta (16). I calcoli sono stati eseguiti utilizzando MS-Excel® per Windows®, versione 2000.

## Risultati

Tutte le prove SAR e FdC hanno dato esito negativo. I risultati del test del  $\gamma$ -interferone effettuato sugli animali vaccinati, espressi in termini di percentuale di animali risultati positivi al test e relativi IC, sono illustrati in Figura 1. Usando brucellina RB51 diluita 1:2,5 come antigene per la stimolazione (40  $\mu$ g di proteina), negli animali vaccinati il test ha fornito risultati positivi a partire dal giorno

17 p.v. (40% dei vaccinati risultati positivi al test, IC 16,7%-69,2%), raggiungendo un picco di sensibilità del 90% (IC 58,7%-97,7%) al giorno 20 p.v. Dopo un brusco calo al prelievo successivo (10%; IC 2,3%-41,3%), la sensibilità del test oscilla tra il 20% e il 70%, con una media del 40%, fino al giorno 239 p.v., periodo in cui almeno un animale vaccinato ha reagito positivamente al test. Gli ultimi due prelievi, a giorni 268 e 300 p.v., sono risultati negativi per tutti gli animali vaccinati (Figura 1). Nel corso di tutto l'esperimento, tutti gli animali vaccinati hanno reagito positivamente almeno una volta al test. I risultati, espressi come

percentuale di animali di controllo (non vaccinati) che hanno fornito risultato positivo al test, sono illustrati in Figura 2. Negli animali di controllo è stata riscontrata positività al test ai prelievi a giorni 20, 76, 91, 104, 119 e 239 p.v., con un picco di tre animali positivi su cinque al giorno 76 p.v. (specificità 40%, IC 11,8%-77,7%). Tre animali di controllo su cinque hanno reagito positivamente almeno una volta al test. La sensibilità del test del  $\gamma$ -interferone a livello di allevamento, in relazione alla sensibilità del test sul singolo animale e al numero di animali vaccinati presenti in allevamento, è illustrata in Figura 3.

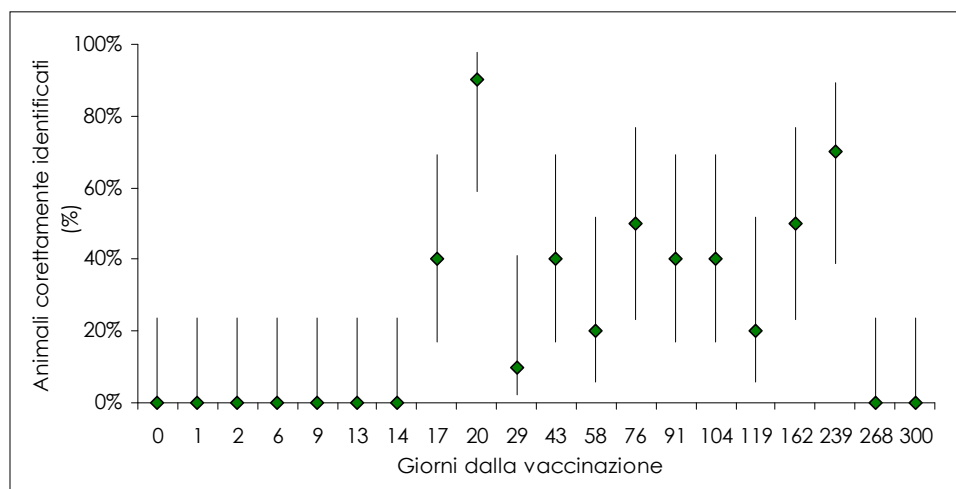


Figura 1  
Percentuale di animali vaccinati correttamente identificati dal test del  $\gamma$ -interferone e intervalli di confidenza al 95%

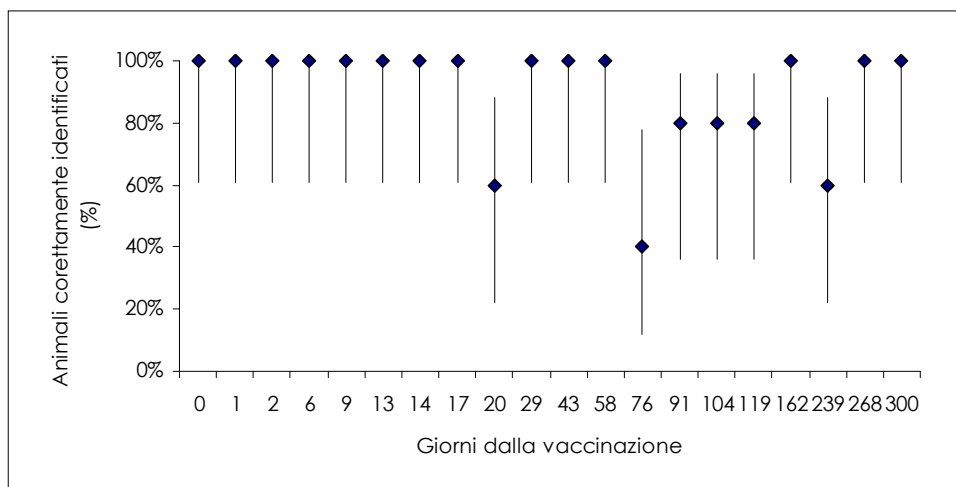


Figura 2  
Percentuale di animali non vaccinati correttamente identificati dal test del  $\gamma$ -interferone e intervalli di confidenza al 95%

In Figura 4 è illustrata la probabilità che il test fornisca almeno un risultato falso positivo a livello di mandria, in relazione alla specificità sull'animale singolo e al numero di capi presenti in allevamento.

## Discussione

Il ceppo RB51 non induce nei bovini vaccinati la formazione di anticorpi rilevabili con le tecniche sierologiche attualmente previste dalla normativa europea (11, 14, 15). Il controllo dell'efficacia e dell'efficienza delle campagne vaccinali non può prescindere dalla disponibilità di prove in grado di individuare gli animali vaccinati con RB51. Il rilievo della risposta immunitaria cellulo-mediata indotto dal ceppo vaccinale potrebbe rivelarsi utile per l'individuazione di bovini vaccinati con RB51. In particolare, un metodo per svelare la presenza di risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti di *B. abortus* è quello di rilevare la produzione di  $\gamma$ -interferone a seguito di stimolazione linfocitaria con antigene specifico.

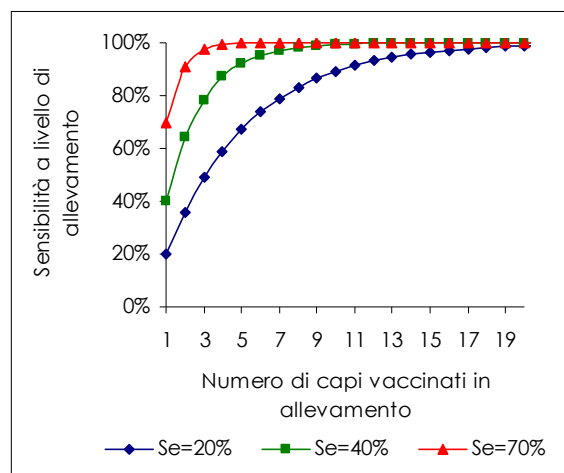


Figura 3  
Sensibilità del test del  $\gamma$ -interferone a livello di allevamento, in relazione alla sensibilità del test sull'animale singolo e al numero di animali vaccinati presenti in allevamento

*Brucella* spp. è un parassita intracellulare facoltativo in grado di moltiplicare e sopravvivere all'interno dei fagociti ospiti ed è noto che l'immunità cellulo-mediata è il principale meccanismo di difesa dell'organ-

ismo ospite. È altrettanto noto che il  $\gamma$ -interferone gioca un ruolo principale nell'immunità cellulo-mediata contro *Brucella* spp. (9). Per tale motivi, in animali vaccinati ci si aspetterebbe una produzione di  $\gamma$ -interferone alta e durevole nel tempo, così come la copertura vaccinale.

Tuttavia, la risposta più alta in termini di animali vaccinati risultati positivi si è rilevata solamente al giorno 20 p.v., le risposte ai prelievi successivi sono rimaste nel complesso su valori bassi e il test, dopo il giorno 239 p.v., ha smesso di fornire risultati positivi (Figura 1).

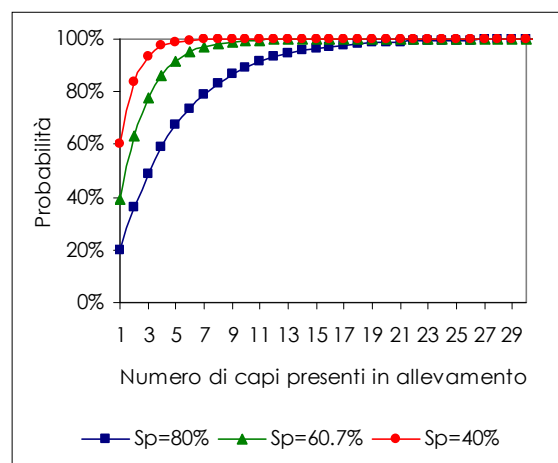


Figura 4  
Probabilità del test del  $\gamma$ -interferone di fornire almeno un risultato falso positivo a livello di allevamento, in relazione alla specificità del test sull'animale singolo e al numero di capi presenti in allevamento

I risultati suggeriscono che il test non è affidabile, se non al giorno 20 p.v., per l'individuazione di singoli bovini vaccinati con RB51. Un rilievo simile fu evidenziato da precedenti autori su bovini vaccinati con ceppo Buck 19 (4). In particolare, utilizzando un test di stimolazione linfocitaria, l'autore osservò che la vaccinazione dei bovini con una singola dose di *B. abortus* ceppo Buck 19 induceva una memoria dei linfociti T molto piccola, mentre ripetute inoculazioni producevano una memoria immunologica prolungata. Essendo gli animali del presente esperimento stati vaccinati con una singola dose, ed essendo il test del  $\gamma$ -interferone basato sul rilievo



dell'immunità cellulo-mediata, sembra plausibile sostenere che anche in caso di vaccinazione con RB51 in dose singola, la risposta dei linfociti T *in vitro* sia bassa e limitata nel tempo.

Le oscillazioni nella sensibilità del test (Figura 1) limitano la possibilità di individuare i singoli animali vaccinati con RB51; tuttavia, non ne precludono l'utilizzo del test come screening di massa per individuare gli allevamenti in cui RB51 è stato somministrato. Considerando che la vaccinazione, in un allevamento di bovini che ricorre alla profilassi indiretta, si pratica generalmente su tutti (o quasi tutti) gli animali vaccinabili, l'esecuzione del test su tutti gli animali vaccinabili aumenterebbe notevolmente la sensibilità a livello di mandria. Infatti, considerato anche lo scenario di una sensibilità del test del 20% (come ai giorni 58 e 119 p.v.), alla presenza di almeno 13 animali vaccinati si avrebbe il 95% di probabilità che almeno uno reagisca positivamente al test del  $\gamma$ -interferone (Figura 3). In ogni caso, tale possibilità rimane limitata nel tempo dal giorno 17 al giorno 239 p.v. Oltre questo periodo, e precisamente a 414 giorni p.v., è stato tuttavia dimostrato che gli stessi animali reagiscono positivamente all'intradermoreazione effettuata utilizzando brucellina RB51 o brucellina commerciale, con una sensibilità rispettivamente del 60% (IC 30,8-83,3%) e del 40% (16,7-69,2%) (6). Pertanto, la prova *in vivo* sembra avere maggiori possibilità di individuare allevamenti vaccinati con RB51 rispetto alla prova *in vitro* (quantomeno in termini temporali), anche in considerazione del fatto che l'intradermoreazione genera una risposta umorale anamnesticamente rivelabile con la FdC nel 100% degli animali vaccinati tra 9 e 16 giorni dall'inoculazione della brucellina (6).

Gli animali di controllo hanno fornito risultato positivo in varie occasioni (giorni 20, 76, 91, 104, 119 e 239 p.v.), con un picco di tre animali positivi su cinque al giorno 76 p.v. (specificità 40%, IC 11,8%-77,7%) (Figura 2). Gli animali provenivano da allevamenti ufficialmente indenni ed erano negativi alla SAR e alla FDC eseguite con ceppo 99 come antigene (18) e, pertanto, sembrerebbe poco plausibile che la

positività osservata sia collegata ad infezione da *Br. Abortus*. Gli animali, d'altronde, sono rimasti negativi per tutta la durata dell'esperimento a SAR e FDC. La positività in animali non vaccinati potrebbe essere dovuta alla presenza di componenti stimolatorie aspecifiche nell'antigene usato per la stimolazione del sangue intero. Risultati simili sono stati osservati da altri autori (8), i quali hanno supposto che fossero dovuti alla presenza di proteine comuni al genere *Brucella* e ad altri batteri Gram-negativi in grado di dare luogo alla produzione non specifica di  $\gamma$ -interferone da parte dei linfociti T ed hanno concluso che il test del  $\gamma$ -interferone non era idoneo alla diagnosi di brucellosi a causa della sua scarsa specificità (8).

In ogni caso, la bassa specificità sul singolo animale influisce negativamente sulla specificità a livello di allevamento (Figura 4). Considerando che la consistenza media degli allevamenti bovini soggetti al programma di eradicazione nelle province italiane non Ufficialmente Indenni da brucellosi bovina (ossia quelle nelle quali ci sarebbe interesse all'utilizzo fraudolento di RB51) è pari a 22 capi (Ministero della Salute della Repubblica Italiana, comunicazione personale), e considerando l'ipotesi di una sensibilità del test a livello di singolo animale dell'80%, l'utilizzo del test  $\gamma$ -interferone come prova di screening fornirebbe un risultato falso positivo a livello di allevamento nel 99,3% dei casi (Figura 4).

Se poi si considera il limite di confidenza inferiore del migliore valore di specificità fornito dal test durante l'esperimento (100%, IC 60,7%-100%), il test avrebbe il 100% di probabilità di fornire un risultato falso positivo per consistenze di allevamento dai 25 capi in su (Figura 4). Conseguentemente, ciò giustificherebbe l'utilizzo del  $\gamma$ -interferone come screening a livello di allevamento solamente se il test è seguito da una prova di conferma di elevata specificità, come potrebbe essere ad esempio la FdC-RB51 (1).

Tuttavia, precedenti studi effettuati sui medesimi soggetti (6) hanno dimostrato che la prova di intradermoreazione (effettuata utilizzando brucellina RB51 o brucellina

commerciale) fornisce su animali vaccinati con RB51 un risultato di specificità del 100% (IC 60,7%-100%) e ha inoltre il vantaggio, rispetto al test del  $\gamma$ -interferone, di indurre una risposta umorale anamnesticamente rilevabile con la FdC-RB51 (6). Tale caratteristica aumenta la sensibilità di tale sistema diagnostico in maniera superiore a quella che potrebbe risultare dall'utilizzo combinato di  $\gamma$ -interferone e FdC-RB51, per la mancata evocazione, in quest'ultimo caso, di risposta immunitaria anamnesticamente da parte del test  $\gamma$ -interferone. Pertanto, rispetto alla prova *in vitro*, la prova di ipersensibilità ritardata *in vivo* sembrerebbe fornire maggiori garanzie di corretta identificazione degli allevamenti in cui RB51 non è stato utilizzato, a vantaggio dell'efficienza ed efficacia di eventuali procedure di controllo.

## Conclusioni

Se si esclude la risposta al giorno 20 p.v., il test del  $\gamma$ -interferone non è affidabile, in termini di

sensibilità, per l'individuazione di bovini vaccinati in età prepubere con una singola dose di RB51, a causa della scarsa memoria immunitaria che i linfociti T dimostrano *in vitro* nei confronti dell'antigene specifico RB51.

Il test del  $\gamma$ -interferone è altresì non affidabile, in termini di specificità, per l'individuazione di animali o allevamenti in cui RB51 non è stato utilizzato, a causa dell'esistenza di una produzione non specifica di  $\gamma$ -interferone da parte dei linfociti T stimolati *in vitro*.

Si conclude che il test del  $\gamma$ -interferone non fornisce garanzie sufficienti per l'impiego ai fini dell'individuazione di bovini o allevamenti bovini vaccinati con vaccino RB51 in età prepubere.

## Supporto finanziario

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute della Repubblica Italiana.

## Bibliografia

1. Adone R. & Ciuchini F. 1999. Complement fixation test to assess humoral immunity in cattle and sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin Diagn Lab Immunol*, **6**, 787-790.
2. Adone R., Ciuchini F., Pistoia C. & Piccinino G. 2000. Uso del gamma-interferon test per il rilievo della risposta cellulo-mediata indotta, nei bovini, da ceppi di *Brucella* spp. *Selez Vet, Suppl*, 225-232.
3. Bayes T. 1763. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. *Philos Trans R Soc Lond*, **53**, 370-418 ([www.stat.ucla.edu/history/essay.pdf](http://www.stat.ucla.edu/history/essay.pdf) accesso 14 aprile 2009).
4. Chukwu C.C. 1987. Differentiation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype O9 infections in cattle: the use of specific lymphocyte transformation and brucellin skin tests. *Vet Q*, **9**, 134-142.
5. Commissione Europea (CE) 2002. Decisione della Commissione del 15 luglio 2002, che autorizza vaccini contro la brucellosi bovina nel quadro della direttiva 64/432/CEE del Consiglio. *Gazz Uff*, **L 194**, 23.07.2002, 45-16 ([eur-lex.europa.eu/lexuriserv/lexuriserv.do?uri=OJ:L:2002:194:0045:0046:it:pdf](http://eur-lex.europa.eu/lexuriserv/lexuriserv.do?uri=OJ:L:2002:194:0045:0046:it:pdf) accesso 14 aprile 2009).
6. De Massis F., Giovannini A., Di Emidio B., Ronchi G.F., Tittarelli M., Di Ventura M., Nannini D. & Caporale V. 2005. Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet Ital*, **41**, 291-299.
7. Jones S.M. & Winter A.J. 1992. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect Immun*, **60**, 3011-3014.
8. Kittelberger R., Reichel M.P., Joyce M.A. & Staak C. 1997. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 III. Specificity of the *in vitro* antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* 0:9-infected cattle. *Vet Microbiol*, **57**, 361-371.
9. Nicoletti P. & Winter A.J. 1990. The immune response to *B. abortus*. The cell mediated response to infections. In *Animal brucellosis* (K. Nielsen & J.R. Duncan, eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, 83-95.

10. 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 Invest*, **9**, 363-367.
11. Schurig G.G., Roop R.M. 2nd, Bagchi T., Boyle S., Buhrman D. & Sriranganathan N. 1991 Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, **28**, 171-188.
12. Sivia D.S. 1996. Data analysis. A Bayesian tutorial. Clarendon, Oxford, 189 pp.
13. Stevens M.G., Pugh G.W. & Tabatabai L.B. 1992. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun*, **60**, 4407-4409.
14. 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.
15. Stevens M.G., Olsen S.C. & Cheville N.F. 1995. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunopathol*, **44**, 223-235.
16. Vose D. 2000. Risk analysis: a quantitative guide, 2nd Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 418 pp.
17. Weynants V., Godfroid J., Limbourg B., Saegerman C. & Letesson J.-J. 1995. Specific bovine brucellosis diagnosis based on *in vitro* antigen-specific gamma interferon production. *J Clin Microbiol*, **33**, 706-712.
18. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2004. Bovine brucellosis. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th Ed. OIE, Paris, 598-601.