

# PERBEDAAN RESPON SEROLOGIS ANTARA SAPI YANG MENDAPAT INFEKSI ALAMI, INFEKSI BUATAN, DAN YANG DIVAKSINASI DENGAN VAKSIN *BRUCELLA ABORTUS* GALUR 19

AGUS SUDIBYO

*Balai Penelitian Veteriner  
Jl. R.E. Martadinata 30, Kotak Pos 52, Bogor 16144, Indonesia*

(Diterima dewan redaksi 1 Maret 1995)

## ABSTRACT

SUDIBYO, A. 1995. The difference of serological responses between naturally infected, experimentally infected, and vaccinated cattle with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1 (2): 117-122.

The purposes of this research were to observe serological response differences of brucellosis between naturally infected, experimentally infected, and vaccinated cattle with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. Identification of naturally infected cattle with *B. abortus* was carried out bacteriologically on milk samples collected from sero-positive brucellosis, while to determine serological responses blood samples were collected with 2 week interval from naturally and experimentally infected, and vaccinated cattle. Furthermore, the collected serum was examined serologically by using complement fixation test (CFT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, indirect and competitive). The result indicated that antibody titres (ELISA unit) of vaccinated cattle reached the peak at week -6. This antibody titre was relatively lower and decreased quicker than naturally or experimentally infected cattle.

**Key words :** Brucellosis, naturally infected cattle, vaccinated cattle, serological response

## ABSTRAK

SUDIBYO, A. 1995. Perbedaan respon serologis antara sapi yang mendapat infeksi alami, infeksi buatan, dan yang divaksinasi dengan vaksin *Brucella abortus* galur 19. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1 (2): 117-122.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari perbedaan respon serologis antara sapi yang terinfeksi alami, yang diinfeksi buatan dan yang divaksinasi dengan vaksin *B. abortus* S19. Identifikasi sapi yang terinfeksi alami dilakukan dengan cara pemeriksaan bakteriologi terhadap contoh susu yang berasal dari sapi sero-positif brucellosis, sedangkan contoh serum dari sapi yang mendapat infeksi alami, infeksi buatan dan yang divaksinasi diambil dengan interval dua minggu. Selanjutnya, contoh serum diperiksa secara serologis dengan *complement fixation test* (CFT) dan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA, tidak langsung dan kompetitif). Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi (ELISA unit) sapi yang divaksinasi mencapai puncaknya pada minggu ke-6. Titer antibodi ini ternyata relatif lebih rendah dan menurun lebih cepat dibandingkan dengan sapi yang mendapat infeksi alami dan infeksi buatan.

**Kata kunci :** brucellosis, sapi terinfeksi alami, sapi yang divaksinasi, respon serologis

## PENDAHULUAN

Brucellosis sapi disebabkan oleh infeksi bakteri *Brucella abortus*. Dengan uji biokimia telah diketahui ada 7 biotipe *Brucella abortus*, yaitu biotipe 1 sampai 6 dan biotipe 9 (ALTON *et al.*, 1988). Di Indonesia brucellosis pada sapi terutama disebabkan oleh infeksi *B. abortus* biotipe 1, kemudian oleh biotipe 2 dan biotipe 3 (SUDIBYO, 1994). *B. abortus* bersifat fakultatif intraseluler, sehingga mampu hidup dan berkembang biak di dalam sel fagosit seperti sel neutrofil dan makrofag inang. Di dalam sel neutrofil, komponen 5-guanosin monofosfat dan adenin yang dimiliki oleh *B.*

*abortus* galur virulen menghambat degranulasi granula primer peroksidase, sehingga efek brucelasidal atau kompleks MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halida tidak terbentuk (BERTRAM *et al.*, 1986; CANNING *et al.*, 1986). Sementara itu, pembunuhan intraseluler di dalam makrofag yang kekurangan MPO terjadi terutama oleh letupan oksidatif dan generasi dari radikal superoksida (HARMON dan ADAMS, 1987). Di dalam sel makrofag, efek brucelasidal dihambat oleh lipopolisakarida (LPS) *B. abortus* galur virulen dengan cara menghambat penggabungan fagosoma dan lisosoma (KREUTZER dan ROBERTSON, 1979; FRENCHICK *et al.*, 1985), sehingga pengobatan brucellosis pada sapi dengan berbagai antibiotika

kurang efektif. Untuk itu, penanggulangan brucellosis dilakukan dengan pemotongan sapi reaktor positif dan vaksinasi sapi sehat di sekitarnya.

Vaksin aktif *B. abortus* S19 banyak digunakan di berbagai negara untuk program pengendalian dan pemberantasan brucellosis, karena vaksin ini yang diberikan hanya satu kali, telah mampu memberikan perlindungan sebesar 70% selama masa produksi (ALTON, 1978). Sementara itu, vaksin inaktif *B. abortus* S45/20 yang diberikan dua kali hanya mampu memberikan perlindungan kurang dari satu tahun. Namun demikian, penggunaan vaksin *B. abortus* S19 dapat menimbulkan infeksi laten dan titer antibodi berkepanjangan, sehingga dapat mengacaukan diagnosis serologis terhadap brucellosis. Hal ini terjadi karena vaksin *B. abortus* S19 mampu membentuk antibodi yang bereaksi silang dengan infeksi alami (HOLMAN *et al.*, 1983). Untuk itu, dalam penelitian ini dipelajari perbedaan reaksi dan respon serologis antara sapi yang mendapat infeksi alami, infeksi buatan dan yang divaksinasi *B. abortus* S19 dengan teknik enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, tidak langsung dan kompetitif).

## MATERI DAN METODE

### Respon serologis terhadap *B. abortus*

Dalam penelitian ini digunakan 12 ekor sapi FH betina umur antara 5-8 bulan dan 3-4 tahun milik Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) Bogor, yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok pertama terdiri dari 3 ekor sapi umur 3-4 tahun, divaksinasi dengan *B. abortus* S19 dosis rendah (1:20) (CORNER dan ALTON, 1981) dengan kandungan kuman sekitar  $3,8 \times 10^9$  cfu (colony forming unit). Kelompok kedua terdiri dari 3 ekor sapi umur 5-8 bulan yang telah divaksinasi *B. abortus* S19 (Pusvetma) dosis normal dengan kandungan kuman berkisar  $4-12 \times 10^{10}$  cfu (ALTON *et al.*, 1988), kemudian setelah satu tahun divaksinasi sapi ini ditantang dengan *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang (susu) dengan dosis  $10^8$  cfu (CONFER *et al.*, 1985). Kelompok ketiga terdiri dari 3 ekor sapi umur 3-4 tahun, tidak divaksinasi, tetapi diinfeksi secara buatan dengan *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang dengan dosis  $10^8$  cfu. Kelompok empat terdiri dari 3 ekor sapi umur 3-4 tahun yang dibeli dari peternak dan dipelihara di Balitvet sebagai sapi yang terinfeksi secara alami oleh *B. abortus* biotipe 1 *complement fixation test* (CFT), dan isolasi *B. abortus* positif).

Vaksin *B. abortus* S19 yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin produksi Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma), Surabaya. Vaksinasi dilakukan secara subkutan (di bawah kulit), sedangkan infeksi buatan dilakukan melalui selaput lendir mata (CONFER *et al.*, 1985). Setelah vaksinasi atau infeksi buatan, contoh darah diambil dari setiap kelompok setiap dua minggu yang berlangsung selama 18 minggu. Kemudian contoh darah atau serum diperiksa secara serologis (ELISA-tidak langsung).

### Sampel serum sapi vaksinasi S19 dan infeksi alami

Sebanyak 15 ekor sapi FH betina yang terdiri dari 12 ekor sapi umur 5-8 bulan dan 3 ekor sapi umur 3-4 tahun telah digunakan dalam penelitian ini. Sapi umur 5-8 bulan divaksinasi dengan *B. abortus* S19 (Pusvetma) dosis penuh dengan kandungan kuman berkisar antara  $4-12 \times 10^{10}$  cfu (ALTON *et al.*, 1988), sedangkan sapi umur 3-4 tahun divaksinasi dengan dosis rendah enceran 1:20 (CORNER dan ALTON, 1981). Kemudian dilakukan pengambilan contoh darah dengan interval satu bulan selama lima bulan. Selanjutnya, contoh serum diperiksa secara serologis (CFT dan ELISA-kompetitif).

Contoh serum sapi yang mendapat infeksi alami diambil dari sapi perah sero-positif brucellosis (CFT positif), yang dari susunya dapat diisolasi kuman *B. abortus*, sedangkan contoh serum sapi kontrol negatif brucellosis berasal dari sapi sero-negatif (CFT negatif dan isolasi *B. abortus* juga negatif). Kelompok sapi negatif brucellosis dan sapi terinfeksi alami tersebut diperiksa secara serologis dua kali dengan interval waktu empat bulan.

### Uji serologis brucellosis

Sampel serum diuji secara serologis, yaitu dengan menggunakan CFT menurut prosedur ALTON *et al.* (1988), ELISA tidak langsung menurut prosedur PLACKETT dan STEWART (1986) yang dimodifikasi oleh SUDIBYO dan PATTEN (1989), dan ELISA-kompetitif (ELISA-K) menurut prosedur NIELSEN *et al.* (1989) dengan modifikasi. Dalam uji ELISA-K digunakan antigen LPS *B. abortus* (PLACKETT dan STEWART, 1986), antibodi monoklonal spesifik terhadap LPS *Yersinia enterocolitica* yang bereaksi silang dengan LPS *B. abortus* yang telah dilabel dengan enzim *horse radish peroxidase* (HRPO) (NIELSEN *et al.*, 1989). Teknik ELISA-K yang digunakan dimodifikasi, terutama dalam

penentuan kriteria hasil reaksi dengan ketentuan sebagai berikut:

- Negatif (-) : % hambatan 30;
- Dubius (±) : % hambatan 30-40;
- Positif (+) : % hambatan 40.

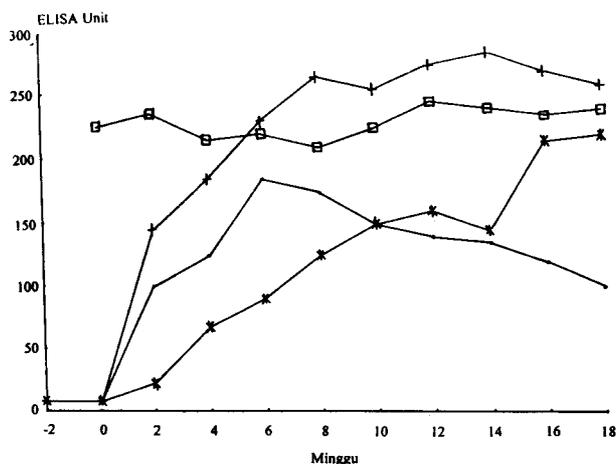
Persentase (%) hambatan dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ hambatan} = 100 - \frac{\text{OD serum uji} \times 100}{\text{OD kontrol bufer}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Respon serologis terhadap *B. abortus* pada sapi

Dalam penelitian ini diperoleh hasil bahwa antibodi yang terbentuk pada sapi yang divaksinasi dengan *B. abortus* S19 mulai terdeteksi pada minggu kedua dan mencapai puncaknya pada minggu ke-6. Setelah minggu ke-6, antibodi yang terbentuk oleh vaksinasi S19 mulai menurun. Sementara itu, titer antibodi sapi-sapi yang mendapat infeksi buatan dan infeksi alami justru cenderung semakin meningkat setelah minggu ke-6. Titer antibodi yang tinggi tersebut bertahan sampai akhir penelitian (Gambar 1).



#### Keterangan:

- \* = Infeksi buatan dengan *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang
- [] = Infeksi alami oleh *B. abortus* biotipe 1
- o = Vaksinasi *B. abortus* S19
- + = Vaksinasi *B. abortus* S19 dan ditantang dengan *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang

Gambar 1. Perbedaan respon serologis antara sapi yang divaksinasi *B. abortus* S19, divaksinasi kemudian ditantang, diinfeksi secara buatan dan secara alami dengan *B. abortus* isolat lapang

Hasil yang berbeda antara sapi-sapi yang divaksinasi S19 dan yang mendapat infeksi buatan atau infeksi alami tersebut dapat terjadi oleh perbedaan sifat virulensi antara *B. abortus* S19 dan *B. abortus* isolat

lapang. Menurut sifat virulensinya dapat dibedakan bahwa *B. abortus* S19 tidak bersifat virulen, sedangkan *B. abortus* S544 bersifat virulen (PHILLIP dan WILSON, 1965; VERSTREATE *et al.*, 1982), begitu juga *B. abortus* isolat lapang.

Di dalam tubuh inang, *B. abortus* galur virulen akan mampu berkembang biak di dalam sel fagosit dengan cara menghambat proses penggabungan fagosoma dan lisosoma dalam makrofag, sehingga efek bakterisidal tidak terbentuk (FRENCHICK *et al.*, 1985). Oleh karena itu, *B. abortus* galur virulen mampu hidup secara persisten di dalam tubuh inang dalam waktu yang lama, sehingga respon serologis yang ditimbulkan oleh infeksi buatan atau infeksi alami lebih tinggi dan berlangsung lebih lama dibandingkan dengan yang divaksinasi *B. abortus* S19. KANNENE *et al.* (1978) melaporkan bahwa sapi yang terinfeksi secara alami oleh *B. abortus* galur virulen memberi respon kebal lebih tinggi dibandingkan dengan sapi yang divaksinasi *B. abortus* S19.

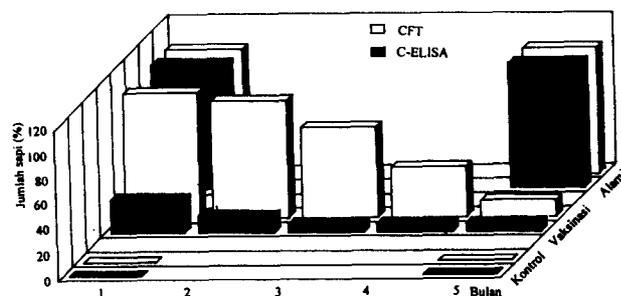
Dalam penelitian ini sapi yang divaksinasi S19 yang kemudian ditantang dengan *B. abortus* isolat lapang memperlihatkan antibodi yang paling cepat naik dalam kadar yang tinggi dan berlangsung lama. Kasus ini dipengaruhi oleh vaksinasi *B. abortus* S19, yang telah membentuk sel B memori dalam tubuh inang. Sel B memori tersebut dengan cepat membentuk antibodi pada saat ada antigen yang sama masuk ke dalam tubuh inang. CONFER *et al.* (1985) melaporkan bahwa rata-rata respon proliferasi sel limfosit lebih tinggi terjadi pada sapi yang divaksinasi dibandingkan dengan sapi normal. Terbentuknya antibodi dalam tubuh inang tidak terlepas dari peran sel makrofag. Sel makrofag berperan dalam memfagositosis, mencerna dan menghancurkan bakteri serta memproses antigen, sehingga dapat disajikan untuk merangsang pembentukan antibodi. Makrofag yang mempunyai antigen histokompatibilitas tipe II (Ia positif) pada membrannya akan mengikat sisa antigen. Sisa antigen yang terikat oleh makrofag ini mempunyai keefektifan 4 kali lebih baik dalam menstimulasi tanggap-kebal dibandingkan dengan antigen yang tidak terikat (TIZARD, 1982). Antigen tersebut akan menstimulasi limfosit B dan T untuk mengadakan pembelahan. Setelah mengalami pembelahan, sel B ini akan memproduksi antibodi dan juga membentuk sel B memori. Sel B memori ini akan membelah dengan cepat dan menghasilkan antibodi dalam kadar yang tinggi pada saat terinduksi kembali oleh antigen homolog yang dikenalnya, sehingga sapi yang divaksinasi biasanya akan memberi titer antibodi yang

tinggi apabila terjadi suatu infeksi kuman yang sejenis (TIZARD, 1982).

Konsentrasi antibodi yang terbentuk dipengaruhi oleh sifat dan lamanya antigen berada di dalam tubuh. Protein antigen dengan bobot molekul besar dengan sifat kimiawi kompleks akan lebih bersifat antigenik dibandingkan dengan antigen polimer besar sederhana dengan subunit berulang yang identik seperti lemak, asam nukleat dan karbohidrat (TIZARD, 1982). Pada umumnya antibodi yang dihasilkan oleh sapi yang divaksinasi *B. abortus* S19 atau yang mendapat infeksi alami ditemukan dalam kelas IgM, IgG1 dan IgG2 (RICE dan BOYES, 1971; BEH, 1974). Menurut CHAPPEL (1980), IgM merupakan antibodi predominan yang diproduksi 1-3 minggu setelah infeksi buatan, sedangkan IgG merupakan antibodi yang dominan pada brucellosis stadium khronis, yang dalam hal ini IgG1 lebih banyak dibandingkan dengan IgG2.

### Perbedaan reaksi ELISA-K pada sapi terinfeksi alami dan yang divaksinasi S19

Pada sapi yang divaksinasi *B. abortus* S19 diperoleh hasil bahwa pada bulan pertama setelah vaksinasi antibodi terdeteksi dengan CFT 100% dan ELISA-K 26,7%, pada bulan kedua CFT 93,3% dan ELISA-K 13,3%, pada bulan ketiga CFT 72,3% dan ELISA-K 6,7%, pada bulan keempat CFT 40,0% dan ELISA-K 6,7%, dan pada bulan kelima CFT 13,3% dan ELISA-K 6,7% (Gambar 2). Pada sapi yang mendapat infeksi alami pada pengambilan contoh serum pertama diperoleh hasil bahwa 100% sapi bereaksi positif CFT dan ELISA-K, sedangkan pada pengambilan kedua

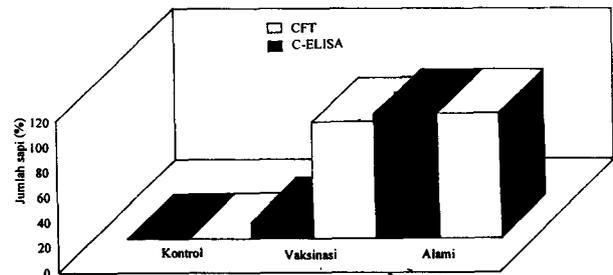


Gambar 2. Perbedaan hasil uji serologis antara sapi yang mendapat infeksi alami dan yang divaksinasi *B. abortus* S19 dengan uji CFT dan ELISA-kompetitif

(interval empat bulan) ternyata sapi-sapi tersebut masih tetap bereaksi positif CFT dan ELISA-K (Gambar 2). Pada sapi negatif brucellosis, pada pengambilan pertama diperoleh hasil bahwa 100% sapi bereaksi negatif CFT dan ELISA-K, sedangkan pada pengambilan kedua (interval 4 bulan) ternyata sapi-sapi tersebut masih tetap bereaksi negatif CFT dan ELISA-K (Gambar 2).

Secara ringkas perbedaan reaksi serologis (CFT, ELISA-K) antara sapi-sapi negatif brucellosis, terinfeksi alami dan divaksinasi *B. abortus* S19 dapat dilihat pada Gambar 3. Sapi negatif brucellosis (kontrol) bereaksi negatif CFT dan ELISA-K, sapi positif brucellosis (infeksi alami) bereaksi positif CFT dan ELISA-K, sedangkan sapi yang divaksinasi S19 bereaksi positif CFT tetapi negatif ELISA-K.

Menurut WRIGHT *et al.* (1990), antibodi terhadap



Gambar 3. Perbedaan jumlah sapi sero-positif (%) antara sapi yang mendapat infeksi alami dan yang divaksinasi dengan *B. abortus* S19

O-polisakarida (*tip* dan *length epitope*) terbentuk hanya pada infeksi aktif seperti yang terjadi pada infeksi alami, sedangkan pada sapi yang divaksinasi, infeksi *B. abortus* S19 dapat diatasi oleh pertahanan inang, sehingga infeksi ini hanya berlangsung singkat dengan akibat antibodi, terutama terhadap *length epitope* O-polisakarida, tidak terbentuk dan hanya terbentuk antibodi terhadap *tip epitope*. Oleh karena itu, serum sapi yang divaksinasi S19 tidak bereaksi pada uji difusi gel yang membutuhkan antibodi terhadap *length epitope* agar terjadi presipitasi (WRIGHT *et al.*, 1990). Hal-hal di atas dapat menerangkan

perbedaan reaksi CFT dan ELISA-K antara sapi yang mendapat infeksi alami dan sapi yang divaksinasi S19.

Sapi yang memberi reaksi positif dengan ELISA-K ini menunjukkan masih terjadinya infeksi aktif dalam tubuh inang, sehingga terbentuk antibodi yang tinggi terhadap O-polisakarida, terutama terhadap *length epitope*. Antibodi terhadap O-polisakarida tersebut mampu berikatan dengan antigen homolog yang digunakan dalam ELISA-K, sehingga memberi tingkat hambatan yang tinggi terhadap antibodi monoklonal untuk berikatan dengan antigen. Reaksi seperti itu ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada hasil reaksi dan dinyatakan bereaksi positif ELISA-K.

Dengan menggunakan uji konvensional RBPT dan CFT saja, ternyata tidak mampu secara jelas membedakan secara serologis antara sapi yang mendapat infeksi alami dan yang divaksinasi *B. abortus* S19. Hal ini terjadi karena pada uji konvensional (RBPT dan CFT) menggunakan antigen seluruh sel (*whole cell*) *B. abortus* sehingga akan mendeteksi antibodi terhadap kedua *epitope* O-polisakarida dan tidak ada kompetisi antibodi tersebut untuk berikatan dengan antigen O-polisakarida. Dengan uji ELISA-K yang digunakan bersama-sama dengan CFT sejak satu bulan pasca-vaksinasi sudah dapat membedakan reaksi serologis antara sapi yang divaksinasi *B. abortus* S19 dan yang mendapat infeksi alami.

Terbentuknya antibodi terhadap O-polisakarida sangat dipengaruhi oleh virulensi *B. abortus*, karena *B. abortus* yang virulen akan mampu tumbuh dan berkembang biak di dalam sel fagosit, sehingga infeksiya akan berlangsung lama atau khronis. Menurut TIZARD (1982), terbentuknya antibodi di dalam tubuh inang tidak terlepas dari peranan sel makrofag. Sisa antigen yang terikat pada membran makrofag (Ia positif) akan menstimulasi limfosit B (sel B) untuk memperbanyak diri dan kemudian memproduksi antibodi dan sel B memori, sehingga apabila terjadi infeksi laten akan berakibat antigen *B. abortus* (O-polisakarida) akan tetap tinggal di dalam tubuh inang dalam jangka waktu yang lama. Dengan demikian, proses pembelahan sel B dan produksi antibodi terus berlangsung dan dapat dideteksi oleh uji serologis (TIZARD, 1982).

Pengendalian dan pemberantasan brucellosis dengan vaksin *B. abortus* S19 dapat menimbulkan permasalahan, terutama dalam membedakan antibodi akibat vaksinasi S19 dan akibat infeksi alami, sehingga perlu tindakan hati-hati untuk menetapkan sapi yang harus dipotong paksa atau diafkir.

Dengan dikembangkannya uji ELISA-K ini diharapkan akan dapat mengurangi kesulitan diagnosis untuk menetapkan sapi-sapi yang harus dipotong akibat infeksi alami atau infeksi persisten oleh *B. abortus* S19. Dengan demikian, tingkat kekeliruan diagnosis serologis terhadap brucellosis akan dapat ditekan, terutama untuk beberapa wilayah Indonesia yang melakukan program pengendalian dan pemberantasan dengan menggunakan vaksin *B. abortus* S19. Selain itu, uji ini pun dapat dipakai sebagai pemacu dalam pengembangan produksi antibodi monoklonal dalam negeri yang lebih murah dan mudah didapat.

## KESIMPULAN

Puncak respon antibodi pada sapi yang divaksinasi *B. abortus* S19 terjadi pada minggu keenam, sedangkan titer antibodinya relatif lebih rendah dan menurun cepat dibandingkan dengan sapi yang mendapat infeksi alami dan infeksi buatan. Sejak dua bulan setelah vaksinasi S19, reaksi serologis dengan uji ELISA-kompetitif pada sebagian besar sapi dapat dibedakan dengan sapi yang mendapat infeksi alami, sedangkan pemeriksaan serologis konvensional dengan CFT tidak dapat membedakan antibodi dari kedua kelompok sapi tersebut.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR-PN8907) dan Kepala Balai Penelitian Veteriner yang telah memberikan dana dan fasilitas penelitian. Ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Dr. Klaus Nielsen dari Animal Diseases Research Institute Agriculture Canada, yang telah memberi antibodi monoklonal. Ucapan terima kasih tidak lupa penulis sampaikan kepada segenap teknisi Bakteriologi Balitvet yang telah membantu dalam penelitian laboratorium.

## DAFTAR PUSTAKA

- ALTON, G.G. 1978. Recent development in vaccination againsts bovine brucellosis. *Aust. Vet. J.* 54:551-556.
- ALTON, G.G., L.M. JONES, R.D. ANGUS, and J.M. VERGER. 1988. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institute National de la Recherche, Agronomicque, Paris.

- BEH, K.J. 1974. Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet. Sci.* 17:1.
- BERTRAM, T.A., P.C. CANNING, and J.A. ROTH. 1986. Preferential inhibition of primary granule release from bovine neutrophils by a *Brucella abortus* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 47:570-572.
- CANNING, P.C., J.A. ROTH, and B.L. DEYOE. 1986. Release of 5-guanosine monophosphate and adenin by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J. Infect. Dis.* 154:464-470.
- CORNER, L.A. and G.G. ALTON. 1981. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res. Vet. Sci.* 31:342-344.
- CHAPPEL, R.J. 1980. Towards improved serological diagnosis of bovine brucellosis. W.H.O. Bulletin. Seri 353 No.1.
- CONFER, A.A., S.M. HALL, C.B. FAULKNER, B.H. ESPE, B.L. DEYOE, R.J. MORTON, and R.A. SMITH. 1985. Effect of challenge dose on the clinical and immune response of cattle vaccinated with reduced doses of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Microbiol.* 10:561-575.
- FRENCHICK, P.J., R.J.F. MARKHAM and A.H. COCHRANE. 1985. Inhibition of phagosome lysosome fusion in macrophages by soluble extract of virulent *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 46:332-335.
- HARMON, B.G. and L.G. ADAMS. 1987. Assessment of bovine mammary gland macrophage oxidative burst activity in a chemiluminescence assay. *Am. J. Vet. Res.* 48:119-125.
- HOLMAN, P.J., L.G. ADAM, D.M. HUNTER, F.C. HECK, K.H. NIELSEN and G.G. WARGER. 1983. Derivation of monoclonal antibodies against *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 4:603-614.
- KANNENE, J.M.B., R.K. ANDERSON, D.W. JOHNSON, C.C. MUSCOPLAT, P. NICOLETTI, R.D. ANGUS, D.E. PIET, and D.J. KLAUSNER. 1978. Whole-blood lymphocyte stimulation assay for measurement of cell-mediated immune responses in bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 7:550.
- KREUTZER, D.L. and D.C. ROBERTSON. 1979. Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope component of smooth and rough strains *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 23:819-828.
- NIELSEN, K.W., W. CHERWONOGRODZKY, R. DUNCAN, and D.R. BUDLE. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am. J. Vet. Res.* 50(1):5-9.
- PHILLIP, J.B. and J.B. WILSON. 1965. Chemical composition and biological properties of the endotoxin of *Brucella abortus*. *J. Bact.* 90(4):895-902.
- PLACKETT, P. and J. STEWART. 1986. Standard ELISA test for bovine brucellosis. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Disease No. 6, D.P.I. Canberra, Australia.
- RICE, C.E. and B. BOYES. 1971. Serum immunoglobulins in bovine brucellosis. *New Zealand Vet. J.* 19:146.
- SUDIBYO, A. 1994. Studi brucellosis dan karakterisasi protein antigenik *Brucella abortus* isolat lapang pada sapi perah. Tesis Magister Sain. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- SUDIBYO, A. and B. PATTEN. 1989. The use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of brucellosis in cattle in Indonesia. *Penyakit Hewan* 21(37):18-21.
- TIZARD, I. 1982. *An Introduction to Veterinary Immunology*. 2nd Ed. Saunders Company. Philadelphia.
- VERSTREATE, D.R., M.T. CREAY, N.T. CAVENY, C.L. BALDWIN, M.W. BALD, and A.J. WINTER. 1982. Outer membrane protein of *Brucella abortus*: Isolation and characterization. *Infect. Immun.* 35:979-989.
- WRIGHT, P.F., K.H. NIELSEN, and W.A. KELLY. 1990. Primary binding techniques for the serodiagnosis of bovine brucellosis: Enzyme immunoassay. In : Nielsen, K.W., ed. *Animal Brucellosis*. 1st Ed. Animal Diseases Research Institute Agriculture Canada, Nepean, Ontario. p.199-235.