

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DA CEPA
MUTANTE S2308 Δ *virB10* DE *Brucella abortus* EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Cheyenne Santana Jácomo

CAMPO GRANDE, MS
2014

2014 AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DA CEPA MUTANTE
S2308 Δ *virB10* DE *Brucella abortus* EM CAMUNDONGOS BALB/C.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DA CEPA MUTANTE
S2308 Δ *virB10* DE *Brucella abortus* EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

**EVALUATION OF ADMINISTRATION OF MUTANT
STRAIN S2308 Δ *virB10* OF *Brucella abortus* in BALB /c**

**Cheyenne Santana Jácomo
Orientadora: Prof. Dra. Grácia Maria Soares Rosinha**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de mestre em
ciência animal.

Área de concentração: saúde animal

CAMPO GRANDE, MS
2014

Certificado de aprovação

CHEYENNE SANTANA JACOMO

AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DA CEPA MUTANTE S2308 Δ virB10 DE
Brucella abortus EM CAMUNDONGOS BALB/c

EVALUATION OF ADMINISTRATION OF MUTANT STRAIN S2308 Δ virB10 OF *Brucella*
abortus in BALB /c

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal

Aprovado (a) em: 28/02/2014

BANCA EXAMINADORA:



Doutora Grácia Maria Soares Rosinha
(EMBRAPA/CNPGC/Orientadora)



Doutora Carina Elisei de Oliveira
(UCDB)



Doutora Lenita Ramires dos Santos
(EMBRAPA/CNPGC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por fortalecer minha fé a cada dia e por todas as bênçãos concedidas. Aos meus pais, Osmar e Cláudia, pelos esforços declinados na minha educação, pelo amor, compreensão e exemplo de força de vontade, que me encoraja ir mais além.

À minha orientadora, Prof. Dra. Grácia Maria Soares Rosinha, pela dedicação e por me proporcionar a oportunidade de fazer parte da sua equipe, minha sincera gratidão.

À minha irmã Carollayne pelo companheirismo.

À toda minha família pela motivação e paciência.

À Dra. Gisele Brasiliano de Andrade, pelo carinho e dedicação, disponibilizando seu tempo para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade e aos mestres pela dedicação.

À Embrapa Gado de Corte, pela possibilidade de utilização dos laboratórios e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de pós-graduação.

Aos colegas do laboratório de engenharia genética animal pelo apoio do dia-a-dia nos experimentos.

Aos meus amigos, Leticia Umeda, Ingrid, Paula Priscila, Diana Lima, Juliana Gomes, Leticia Carvalho, Cleber Galvão, Cristiane Sanches, Renata Guerra, Beth Vital, Thais Fruguli, Kellen Zarbieli, Lidiane Basso, Sandra Regina Nunes, Julia Bittencourt, pelo carinho, sempre me dando palavras de conforto e ânimo.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

Obrigada.

“Até aqui me ajudou o Senhor”.
(Samuel; 7,12)

Resumo

JÁCOMO, C. S. Avaliação da administração da cepa mutante S2308 Δ virB10 de *Brucella abortus* em camundongos BALB/c. Ano. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

A brucelose bovina é uma zoonose de importância mundial causada principalmente por *Brucella abortus*. Estas são bactérias gram-negativas intracelulares facultativas, sendo uma das principais causas de aborto e infertilidade em bovinos, além de causar grandes perdas econômicas ao setor agropecuário e ser de grande risco à saúde pública. A vacinação contra brucelose bovina é feita pela administração da cepa lisa atenuada B19 ou cepa rugosa RB51, ambas de *Brucella abortus*. Porém estas possuem algumas desvantagens, a B19 interfere no diagnóstico sorológico e a RB51 é resistente ao antibiótico rifampicina. Sistemas seguros e eficazes de imunização são necessários para superar essas desvantagens. Em virtude disto, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito protetor bem como as alterações anatomohistopatológicas pós-administração da cepa mutante S2308 Δ virB10 de *B. abortus* em camundongos BALB/c. Para a avaliação da unidade de proteção (UP) camundongos BALB/c foram inoculados via intraperitoneal com 1×10^6 UFC com a vacina B19 e a cepa mutante S2308 Δ virB10 de *B. abortus*. Após seis semanas foram desafiados com 1×10^5 UFC com cepa virulenta S2308 de *B. abortus*. A cepa mutante S2308 Δ virB10 apresentou 0,62 unidade de proteção ($p=0,0047$) frente ao desafio com a cepa virulenta S2308 quando comparada ao grupo controle, porém sua proteção foi menor do que a vacina B19 (1,66 UP) (0,003). Para as análises anatomohistopatológicas, vinte e um camundongos BALB/c de 6 a 8 semanas de idade foram distribuídos em quatro grupos experimentais os quais foram inoculados com 1×10^6 UFC, por via intraperitoneal, com as cepas de *B. abortus* B19, S2308 Δ virB10, S2308 e grupo controle PBS. Os grupos foram formados por seis camundongos cada (os quais foram separados em 2 caixas com 3 animais em cada uma), exceto o grupo inoculado com S2308, que conteve apenas 3 animais. Duas semanas após a inoculação, 3 animais de cada um dos grupos foram eutanasiados para coleta de baço e fígado. Nos animais eutanasiados duas semanas após a inoculação das cepas, observou-se que os inoculados com a cepa mutante S2308 Δ virB10, apresentaram esplenomegalia leve e apenas focos inflamatórios no fígado, resultados melhores que as demais cepas. Os animais restantes deste grupo, que foram desafiados com a cepa virulenta também apresentaram esplenomegalia leve, porém, apresentaram lesões irreversíveis e mais severas como fibrose no baço e presença de granuloma no fígado, quando comparado aos animais inoculados com a cepa vacinal B19. Estes dados demonstram que a cepa mutante S2308 Δ virB10 induz uma fraca proteção, provavelmente evidenciada pelas lesões irreversíveis causadas no baço e fígado após o desafio com a cepa virulenta.

Palavras-chave: *Brucella abortus*, vacinas, gene *virB10*, proteção

Abstract

JÁCOMO, C. S. Evaluation of administration of mutant strain S2308 Δ virB10 OF *Brucella abortus* in BALB/c. Ano. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Brucellosis bovine is a zoonosis of global importance caused by *Brucella abortus*. These bacteria are facultative intracellular gram-negative bacteria, and a major cause of abortion and infertility in cattle besides causing huge economic losses to the agricultural sector and be of great public health risk. Vaccination against bovine brucellosis is made by the administration of attenuated strain B19 smooth or rough strain RB51, both of *Brucella abortus*, but these have some drawbacks, B19 interferes in serological diagnosis and RB51 is resistant to the antibiotic rifampicin. Safe and effective immunization systems are needed to overcome these disadvantages. Because of this, this study aimed to evaluate the protective effect as well as changes anatomical histopathological post administration S2308 Δ virB10 mutant strain of *B. abortus* in BALB/c mice. For the evaluation of the protection unit (PU) BALB/c mice was inoculated intraperitoneally with 1×10^6 CFU with B19 vaccine and mutant strain of *B. abortus* S2308 Δ virB10. After six weeks were challenged with 1×10^5 CFU with virulent strain of *B. abortus* S2308. The mutant strain S2308 Δ virB10 presentation UP 0.62 protection unit ($p = 0.0047$) against challenge with the virulent strain S2308 when compared to the controlled group, although its protection was lower to the vaccine S19 (1,66 PU) (0,003). For histopathological anatomical analysis, twenty-one BALB/c mice, with 6 to 8 weeks old were distributed in four experimental groups which were inoculated with 1×10^6 UFC, intraperitoneally, with strains of *B. abortus* S19, S2308 Δ virB10, S2308 and control group PBS. The groups were matched for six mice each (which were separated into 2 boxes with 3 animals each), except the group inoculated with S2308, which contained only 3 animals. Two weeks after inoculation, 3 animals of each group were euthanized were euthanized for spleen and liver collection. In animals euthanized two weeks after inoculation of strain, was observed that animals inoculated with mutant strain S2308 Δ virB10 showed mild splenomegaly and only inflammatory foci in the liver, best results than other strains. The remaining animals in this group, which were challenged with virulent strain, also showed mild splenomegaly, however, showed more severe and irreversible lesions such as fibrosis in the spleen and liver granuloma, when compared to inoculated animals with strain S19. These data demonstrate that mutant strain S2308 Δ virB10 induces a weak protection, probably evidenced by the irreversible damage caused by the virulent strain, after challenge.

key words: *Brucella abortus*; vaccine; gene *virB10*; protection

Lista de abreviaturas

WHO	Organização Mundial da saúde
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
OIA	Organização Internacional de Epizoonoses
MAPA	Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento
PNCEBT	Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose
T4SS	Sistema de secreção do tipo 4
ORF	<i>Open Reading frame</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
PRRS	<i>Pattern recognition receptor</i>
PAMPS	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
TOLL	<i>Toll like receptor</i>
TIR	<i>Receptor toll II-1</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
RIFI	Imunoflorescência indireta
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
IFN- γ	<i>Interferon gama</i>
P.I.	Pós infecção
R.E.	Retículo endoplasmático
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade formadora de colônias
H&E	Hematoxilina e eosina
UP	Unidade de proteção
DP	Desvio padrão
PBS	Tampão fosfato salino

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
1. Histórico.....	12
2. Agente etiológico.....	13
3. Patogênese.....	15
4. Resposta imunológica do hospedeiro.....	17
5. Diagnóstico.....	19
6. Sinais clínicos.....	20
7. Epidemiologia.....	21
8. Vacinas.....	22
9. Vacinas geneticamente modificadas contra <i>Brucella</i> spp.....	24
REFERÊNCIAS.....	26
ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINADO PELA PESQUISA.....	31

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), Organização de Agricultura e Alimentação (FAO), e a Organização Internacional de Epizoonoses (OIA) uma das zoonoses reemergentes mais importantes e difundidas no mundo, é a brucelose. Também conhecida como febre de Malta, a brucelose acomete animais causando aborto, redução da taxa de fertilidade, orquite, epididimite e lesões granulomatosas em diversos sistemas de criação (Nicoletti, 1990). No homem a doença é crônica caracterizada por um estado febril recorrente, debilitante, podendo levar a complicações como meningite, endocardite, espondilite e artrite (YOUNG, 1983).

Por não haver vacina para humanos contra a brucelose, a vacinação dos animais é uma das medidas mais adequadas para preservar a saúde humana em regiões endêmicas para a doença (ZINSSTAG et al., 2007).

Para o controle desta enfermidade, em 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) tendo como foco principal o diagnóstico e a vacinação contra a brucelose bovina (BRASIL, 2006). A vacinação contra infecções causadas por *Brucella abortus* é feita pela administração da cepa lisa atenuada B19 ou a cepa rugosa RB51 (GRILLÓ et al., 2006). A B19 quando utilizada em fêmeas gestantes pode causar aborto, interfere nos diagnósticos sorológicos, e por ser uma vacina viva de alta persistência, é patogênica ao homem (CHEVILLE et al., 1996). A cepa rugosa vacinal RB51 de *B. abortus* possui efeito protetor semelhante a B19, porém, esta cepa tem a desvantagem de ser resistente a rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana, além de ser patogênica para os seres humanos (BRASIL, 2006)

O desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas mantêm as vantagens das propriedades naturais do microrganismo patogênico, incluindo a invasão celular e disseminação para órgãos específicos do hospedeiro. Para o desenvolvimento deste tipo de vacina os genes responsáveis pela virulência e patogenicidade são deletados por técnicas moleculares (FICHT et al., 2009).

Cepa *knockout* de *B. abortus* obtida pela deleção do gene *virB10* de seu genoma apresentou sobrevivência intracelular diminuída em células do tipo *HeLa*. Este gene codifica uma proteína que faz parte do aparato de transporte que tem homólogos em sistemas de secreção do tipo IV (Do inglês, Type IV secretion system- T4SS). O sistema de secreção do tipo IV é uma família de complexos multiproteicos responsáveis pela secreção de moléculas bacterianas e proteínas através do envelope celular bacteriano (CASCALES; CHRISTIE, 2003). A regulação transcricional dos genes da região *virB* ocorre pelas janelas abertas de leituras (ORF, do inglês, Open Reading Frame) que formam um *operon virB*, sendo sua expressão regulada por sinais ambientais. O operon *virB* de *B. abortus* é um arranjo colinear de 12 genes (BOSCHIROLI et al. 2002).

Construções moleculares mutacionais de deleção em genes do *operon virB* podem alterar somente o gene que corresponde a deleção, sendo assim genes posteriores e anteriores são mantidos inalterados e sem modificações, esse tipo de mutação é chamado de apolar. Para mutantes que contém o cassetes de resistência inserido no gene *virB10* e que possuem sequências fortes no sítio de terminação que afetam a transcrição não somente de *virB10* mas igualmente de *virB11* e de sequências posteriores, sugerem que o mutante polar de *B. abortus virB10* tem um complexo *virB* não-funcional. O complexo *virB* juntamente com suas moléculas efetoras secretadas por este sistema estão envolvidas em evitar a fusão do vacúolo contendo a *Brucella* spp. com os lisossomos (COMERCI et. al, 2001).

Segundo Adams (1990), a vacina ideal contra a brucelose deve apresentar as seguintes características: não deve provocar a doença nos animais vacinados; deve prevenir a infecção pela bactéria em ambos os sexos; prevenir aborto e esterilidade; promover proteção contra a infecção por um longo tempo com uma simples dose; não induzir a produção de anticorpos persistentes os quais interferem no sorodiagnóstico de infecções a campo; ser biologicamente estável; não apresentar risco de reversão da virulência *in vitro* e *in vivo*; não ser patogênica para humanos e, ser facilmente produzida em grande escala e baixo custo.

O desenvolvimento de um potencial imunógeno contra *B. abortus*, é objetivo de diversos pesquisadores e de grande importância visto que as vacinas existentes não correspondem como um imunógeno ideal (ARENAS-GAMBOA et al., 2009). Uma das linhagens vacinais utilizadas, *B. abortus* B19, confere proteção aos animais imunizados porém causa interferência no diagnóstico dos animais imunizados (CHEVILLE et al, 1996). Tentando solucionar este problema foi desenvolvida uma linhagem rugosa que não interfere no diagnóstico de animais infectados, mas apresenta resistência ao antibiótico utilizado no tratamento da doença em humanos (UGALDE et al., 2003).

Em virtude do exposto acima, Souza et al., (2009), desenvolveram a cepa mutante S2308 Δ *virB10* de *B. abortus* para posteriores testes desta como imunógeno. A interrupção do gene *virB10* no operon *virB* nesta cepa, foi caracterizada como apolar, o que implicou na manutenção da capacidade do patógeno em invadir as células do hospedeiro. A baixa persistência da cepa mutante S2308 Δ *virB10* em camundongos BALB/c indicaram a avaliação desta como um potencial imunógeno (SOUZA et al., 2009). No presente estudo avaliou-se o efeito protetor bem como alterações histopatológicas pós-administração da cepa mutante S2308 Δ *virB10* de *B. abortus* em camundongos BALB/c, como uma ferramenta eficaz na prevenção da brucelose experimental.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Histórico

O primeiro relato de possíveis lesões semelhantes com àquelas causadas por *Brucella* spp. foram obtidas após uma erupção vulcânica que destruiu vidas ao redor do Monte Vesúvio durante as noites de 24 e 25 de agosto de 79 AD (*Anno Domini*), soterrando os habitantes por lama vulcânica. Foi feito um exame antropológico dos vestígios ósseos desses habitantes, que revelaram lesões ósseas típicas de brucelose. Além disso, foi encontrado um queijo carbonizado e através da análise de microscopia, detectaram a presença de várias bactérias, dentre elas, algumas com morfologia e estrutura parecida com a de *Brucella* spp. (CAPASSO, 2002).

Em 1887, obteve-se a primeira descrição desta bactéria. O médico militar David Bruce isolou *Micrococcus melitensis* e descreveu a presença do agente no baço de soldados britânicos da base naval da Ilha de Malta, que veio a óbito em virtude de uma doença na época denominada “Febre de Malta” (BRUCE, 1987; GODFROID et al., 2005). Este microrganismo foi denominado de *Micrococcus melitensis* por causa das características coloniais e microscópicas da bactéria, sendo “*Micrococcus*”, em virtude do tamanho e “*melitensis*” em homenagem à Ilha, melita é o nome em latim de Malta (PAULIN, 2003).

Em 1897, na Dinamarca, Bang e Stribolt identificaram uma bactéria intracelular em fetos abortados de vacas, a qual denominaram de *Bacillus abortus bovis*. Somente em 1918, nos EUA, a bacteriologista Alice Evans publicou informações com evidência da relação entre o *Bacillus abortus* e o *Micrococcus melitensis*. Chegaram à conclusão que as bactérias isoladas de caprinos, bovinos e humanos eram similares. Conseqüentemente, Meyer e Shaw confirmaram a demonstração de Evans e alteraram a designação (*Micrococcus*) para *Brucella*, em homenagem a David Bruce (PAULIN, 2003; PAULIN & Ferreira Neto, 2008).

O primeiro caso relatado de brucelose humana no Brasil foi no ano de 1913, por Gonçalves Carneiro e, no ano seguinte, Danton Seixas realizou o primeiro diagnóstico clínico da brucelose bovina no país no estado do Rio Grande do Sul. Três anos depois, no Ceará, Thomaz Pompeu Sobrinho observou alguns casos de abortamento em bovinos. Em 1933, César Pinto propôs a implementação de um protocolo de testes em animais importados como forma de impedir a disseminação da doença no país (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BOLETIM, 1998).

Vários estudos sorológicos foram conduzidos no Brasil entre 1950 e 1974. Em 1975, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou o primeiro inquérito sorológico nacional (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Considerada uma doença endêmica no país, tem sido diagnosticada em todos os Estados da federação (POESTER et al., 2002). Com a importância e o reconhecimento dessa zoonose o governo brasileiro, por meio do MAPA, criou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o objetivo de baixar a prevalência e a incidência de brucelose e tuberculose e com isso criar um número significativo de propriedades certificadas ou monitoradas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário.

2. Agente etiológico

Reino Monera

Filo Proteobactéria

Classe Alphaproteobactéria

Ordem Rhizobiales

Família Brucellaceae

Gênero *Brucella*

O agente etiológico da brucelose é um cocobacilo Gram-negativo do gênero *Brucella* (YOUNG, 1988), pertencente à subdivisão alpha-2 Proteobactéria, assim como *Ochrobactrum* spp., *Rhizobium* spp., *Rhodobacter* spp.,

Agrobacterium spp., *Bartonella* spp., e *Rickettsia* spp. (YANAGI, YAMASATO, 1993).

São bactérias resistentes a fatores ambientais, podem permanecer por um longo período quando se encontram em ambientes com a presença de sombra, umidade e temperaturas baixas, ou permanecem em materiais de parto ou abortos nas pastagens por períodos de seis meses ou mais (BRASIL, 2006).

No leite e produtos lácteos a sobrevivência da bactéria depende da temperatura e pH, podem permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação e a viabilidade é mantida mesmo no congelamento (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

O patógeno *Brucella* spp. é definido como intracelular facultativo, não formador de esporos e cápsulas, embora esta bactéria seja descrita como imóvel, possui todos os genes exceto o sistema quimiotático, necessário para a formação de flagelos funcionais (FRETIN et al., 2005). Sua multiplicação é lenta em temperatura ótima de 37°C e o crescimento ocorre em meio base (ágar triptose de soja, ágar sangue ou ágar columbia), por um período de 5 a 7 dias de incubação (WHO, 1975).

São sensíveis ao calor e à acidez, se submetidas à ação de desinfetantes comuns como compostos fenólicos a 2,5%, permanganato de potássio (1:5000), soluções de formaldeídos a 2%, a eliminação de *Brucella* ocorre em no máximo 15 minutos. O álcool 70% elimina imediatamente as bactérias (OIE, 2008).

As espécies do gênero *Brucella* são classificadas de acordo com o hospedeiro preliminar, sendo assim reconhecidas dez espécies como: *Brucella melitensis* que infecta caprinos (podendo infectar bovinos, ovinos, canídeos e humanos), *Brucella abortus* em bovinos (podendo infectar bubalinos, cervídeos, canídeos e seres humanos), *Brucella ovis* em ovinos, *Brucella suis* em suínos (podendo infectar seres humanos), *Brucella neotomae* e *Brucella microti* em ratos do deserto (CORBEL & MORGAN, 1984), *Brucella canis* em canídeos (podendo infectar o homem, contudo a sua incidência é relativamente baixa) (CARMICHAEL, 1990), *Brucella ceti* em golfinhos e baleias, *Brucella pinnipedialis* em focas e leões marinhos e por último *Brucella inopinata* que foi recentemente isolada de uma infecção do implante de mama em uma mulher idosa com quadro clínico de brucelose (GODFROID et al., 2010). Apesar de *B.*

melitensis ser a mais patogênica, *B. abortus* por ser a espécie mais difundida no mundo é a principal fonte de infecção (CORBEL, 1997).

Membros do gênero *Brucella* podem ser divididos em dois grupos antigenicamente distintos: o grupo de bactérias lisas e o grupo de bactérias rugosas. O fenótipo liso de *Brucella* spp. é devido a presença de um lipopolissacarídeo (LPS) completo na membrana celular que é composta por três domínios, uma porção glicolípídica chamada de lipídeo A, outro domínio o núcleo oligossacarídeo, e uma porção imuno-dominante externa, chamada antígeno-O. Cepas rugosas de *Brucella* spp. não contém a cadeia do antígeno O no LPS fazendo com que ocorra um enfraquecimento da resposta imune do hospedeiro contra a bactéria (SELEEM et al., 2008).

Brucella abortus subdivide-se em oito biovars (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19), a *B. melitensis* em três (1, 2, 3) e *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4, 5). As rugosas embora apresentem variantes, não se subdividem em biovars (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

3. Patogênese

A patogenicidade de *Brucella* spp. é diferente de outras bactérias patogênicas, ela não apresenta fatores clássicos de virulência, como: exotoxinas, citolisinas, flagelo, cápsula, fímbria, plasmídeos, fagos lisogênicos, formas de resistência, variação antigênica, lipopolissacarídeo endotóxico ou indutores apoptóticos (MORENO & MORIYÓN, 2002).

Brucella é capaz de infectar animais e seres humanos. Sua virulência é dependente das propriedades de sobrevivência e replicação, em diferentes tipos de células. Esta controla a maturação do vacúolo das células do hospedeiro para evitar respostas imunes inatas, atingindo seu nicho replicativo associado com o retículo endoplasmático (GORVEL & MORENO, 2002).

Fatores envolvidos com a patogenicidade permitem a invasão, a sobrevivência e a multiplicação nas células do hospedeiro, sendo estas fagocíticas ou não fagocíticas (GORVEL & MORENO, 2002). Porém ela apresenta capacidade de adaptação às condições ambientais, encontradas no nicho de replicação intracelular, que tem baixos níveis de nutrientes e oxigênio, pH ácido e intermediários reativo de oxigênio (KOHLENER et al., 2005).

Existem vários mecanismos de virulência que já foram verificados no gênero *Brucella*, entre eles o sistema de secreção do tipo IV (T4SS), que corresponde a uma família de proteínas. Este sistema é codificado pelo *locus virB*, um operon de 12 genes (*virB1* a *virB12*), localizado no cromossomo II, importante para a sobrevivência e replicação intracelular da *Brucella* (BOSCHIROLI et al., 2002; DEN HARTIGH et al., 2004).

Outro artifício importante usado pela *Brucella*, que auxilia sua persistência por longos períodos nas células dos hospedeiros, está relacionado ao tráfego intracelular, que corresponde ao β -1,2 glucans cíclicos (C β G), que evita a fusão do vacúolo com lisossomos. O composto β -1,2 glucans cíclicos de *Brucella* interferem com a maturação do vacúolo contendo *Brucella*, atrapalhando ou bloqueando as plataformas lipídicas alterando a expressão de proteínas na membrana vacuolar e impedindo a fusão com o lisossomo (ARELLANO-REYNOSO et al., 2005).

Fator também relacionado à virulência é o LPS. Quando é expresso a cadeia O de polissacarídeo no LPS, conectada a um oligossacarídeo central ligado ao lipídeo A, a bactéria apresenta conformação lisa, como ocorre nas cepas: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti* e *B. pinnipedialis*. *B. ovis* e *B. canis*, não possuem a cadeia O, apresentando a conformação estrutural rugosa (LAPAQUE et al., 2005). A cadeia O parece ser uma molécula chave na invasão e sobrevivência intracelular, inibindo a apoptose, protegendo a bactéria de peptídeos catiônicos e metabólitos de oxigênio das células inflamatórias (PORTE et al., 2003).

O'Callaghan et al. (1999) evidenciaram que o T4SS atua como um aparato transportador localizado na membrana externa, responsável pelo transporte de proteínas efetoras para o interior das células. O T4SS é essencial para estimular resposta inflamatória, assim como no sistema imunológico de camundongos durante a infecção por *Brucella*. Roux et al. (2007) demonstraram que a infecção por *Brucella* induz a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório e este padrão de indução do gene é dependente da função T4SS.

Estudos funcionais e caracterização detalhada dos componentes do T4SS, além de melhorar a compreensão das diversas funções dos mecanismos de secreção bacteriana, fornecem informações para a escolha de

potenciais imunógenos para serem utilizados como possíveis vacinas contra microrganismos patogênicos (JUHAS et al., 2008).

Para a sobrevivência e multiplicação nas células hospedeiras, a bactéria ativa vários genes e secreta proteínas que facilitam a sua adaptação no ambiente intracelular. Sua replicação dentro das células fagocíticas é a chave para a patogênese (ESKRA et al., 2001).

A acidificação do fagossomo faz com que o patógeno expresse fatores de virulência específicos como os *virB*, necessários para a proliferação de *Brucella* spp. O *operon virB* codifica o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) encontrado em várias bactérias (MARIA-PILAR et al., 2005). Uma das funções efetora do *locus virB* é a injeção de moléculas efectoras que podem ajudar no estabelecimento do nicho de replicação dentro da célula hospedeira. (BOSCHIROLI et al., 2002).

O processo de invasão celular não é afetado em mutantes *virB*, mas é indispensável para a maturação do nicho replicativo intracelular de *Brucella* (ROLAN et al., 2007). O mutante *virB10* é capaz de se disseminar no organismo de camundongos, porém incapaz de se replicar e persistir no hospedeiro (COMERCI et al., 2001).

4- Resposta imunológica do Hospedeiro

Os microrganismos invasores são controlados pelo sistema imune, que age pela imunidade inata e a adquirida. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa e é caracterizada por uma resposta que ocorre nas etapas iniciais da infecção, atuando na redução do patógeno, sem memorização, porém ela é essencial para o desencadeamento da resposta imune adquirida. (KO & SPLITTER, 2003).

Brucella spp. são bactérias intracelulares facultativas que ocasionam infecções crônicas, limitando o reconhecimento do patógeno pelo sistema imunológico inato (TERWAGNE et al., 2013).

A primeira linha de defesa começa com o reconhecimento pelo hospedeiro através da interação dos receptores de reconhecimento padrão PRRs (do inglês, Pattern recognition receptors-PRRs) e PAMPs (do inglês, Pathogen associated molecular patterns-PAMPs). No grupo dos PRRs, os

principais são os receptores semelhantes a TOLL (do inglês, *Toll like receptor*-TLR), que são expressos em diversos tipos celulares como macrófagos e células epiteliais. O reconhecimento feito por estes receptores ativa as vias de sinalização intracelular, provocando a indução de citocinas, quimiocinas, interferons e moléculas co-estimulatórias (MACEDO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

Já foram identificados 13 tipos de TLRs nos mamíferos, localizados na membrana plasmática ou em compartimentos endossomais (KAWAI & AKIRA, 2006). A *Brucella* é reconhecida pelo TLR-2, TLR-4 e TLR-9, que são receptores de lipoproteínas, LPS e CpG-DNA (AKIRA et al., 2006).

O reconhecimento pelos TLRs, estimula o recrutamento de grupos intracelulares de adaptadores contendo o domínio TIR (Receptor Toll II-1), entre eles, o MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM, mediante a interação TIR-TIR inicia a sinalização (OLIVEIRA et al., 2008).

Estudos relatam que *Brucella* interfere na sinalização dos TLRs, contra a produção de proteínas que contém domínio semelhante à TIR, interferindo na sinalização via TLR/MyD88, suprimindo a imunidade inata durante a infecção (CIRL et al., 2008).

Existem vários efetores que fazem parte da imunidade inata, atuando durante a infecção por *Brucella*, dentre eles, o sistema complemento, neutrófilos, macrófagos, citocinas e células natural Killer (NK). O complemento corresponde a um sistema de proteínas plasmáticas que interagem com fragmentos de anticorpos ou pela superfície bacteriana, para opsonizar ou eliminar o patógeno (LAPAQUE et al., 2005).

A ativação do sistema complemento ocorre por três vias: a clássica, complexo antígeno-anticorpo; a via alternativa e a via das lectinas, ativada pela ligação das lectina manose a hidratos de carbono na superfície do microrganismos (MORGAN & HARRIS, 2003; LAPAQUE et al., 2005).

A resposta imunológica adquirida ou adaptativa pode ser do tipo celular ou humoral, sendo que a resposta do tipo celular é desencadeada pela ativação dos linfócitos T específicos (OLIVEIRA et al., 1998). Ficht e Adams (2009) verificaram que tanto a resposta imune celular quanto a humoral participam na proteção contra a brucelose.

A resposta adaptativa contra *Brucella* atua através de três mecanismos, sendo eles: a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ ativando as funções bactericidas dos macrófagos; ativação da citotoxicidade das células T CD8⁺ e $\gamma\delta$ e troca de isotipos de anticorpos como IgG2a e IgG3 que opsonizam o patógeno para facilitar a fagocitose (KO & SPLINTTER, 2003).

Essa resistência a patógenos intracelulares como a *Brucella* depende da capacidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune celular (Th1), que é mediada por citocinas como IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF α (JANEWAY et al., 2001).

A resposta humoral é importante, porém com menor significância que a via celular. A transferência passiva de soro que tenha anticorpos anti-LPS para camundongos, pode proteger contra a infecção por cepas virulentas de *B. abortus* (IgG2a) (KO & SPLITTER, 2003). A opsonização do agente patogênico, juntamente com o aumento da morte intracelular, é considerado principal papel protetor de anticorpos contra a brucelose (SCHURIG et al., 1991).

5- Diagnóstico

A brucelose pode ser diagnosticada por diferentes métodos. O diagnóstico clínico, fundamentado nos sinais clínicos de abortamento, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de machos e fêmeas; dados epidemiológicos; isolamento e identificação do agente etiológico e também pela detecção de anticorpos nos fluidos orgânicos (POESTER et al., 2005).

Os testes de diagnósticos são realizados em fêmeas de idade igual ou superior a 24 meses, desde que vacinadas entre 3 e 8 meses, em machos e fêmeas não vacinadas, realiza-se a partir dos 8 meses de idade. Os testes para diagnósticos indiretos reconhecidos como oficiais são: teste do antígeno acidificado tamponado; 2-Mercaptoetanol (teste confirmatório); teste de fixação em complemento e o teste do anel em leite (BRASII, 2006).

Alguns métodos menos utilizados são a imunofluorescência indireta (IFI) e teste de fixação pelo complemento (FC). A reação de fixação pelo complemento identifica a presença de IgG, tornando-se positiva após três a

quatro semanas do início clínico da doença. A IFI é o meio de diagnóstico mais frequentemente positivo na brucelose crônica, ajudando a corrigir possíveis erros do teste de aglutinação. O teste imuno-enzimático (teste tipo ELISA) está entre as melhores provas de diagnóstico para neuro-brucelose, brucelose crônica, sendo sua vantagem ter maior sensibilidade e maior especificidade (PESSEGUEIRO et al., 2003).

6- Sinais clínicos

A brucelose é uma infecção crônica, normalmente adquirida por inalação ou ingestão da bactéria *Brucella* spp. Após penetrar no hospedeiro, através da mucosa epitelial, a bactéria é transportada livremente ou dentro das células fagocíticas, para linfonodos regionais, fígado, baço, medula óssea, glândula mamária e órgãos reprodutores, onde ela expressa sua patogenicidade (CORBEL, 1997).

Conforme o hospedeiro, a brucelose pode apresentar-se de diferentes modos. Nos bovinos e bubalinos a principal manifestação clínica é o aborto, que normalmente ocorre no terço final da gestação. Retenção de placenta, secreção vaginal, que pode ser purulenta ou não, frequentemente fétida, de coloração cinza ou vermelho-pardo. Não há nenhuma lesão patognomônica da brucelose nos fetos abortados, mas observa-se com frequência broncopneumonia supurativa. Em machos existe uma fase inflamatória aguda, seguida de cronificação, geralmente é assintomática. A bactéria instala-se nos testículos, epidídimos e vesículas seminais. O sinal visualizado é a orquite uni ou bilateral com aumento ou diminuição do volume dos testículos, lesões articulares também são observadas (BRASIL, 2006).

Em humanos, os sintomas mais comuns são aqueles observados na fase de bacteremia, nos casos de infecção generalizada, tais como: febre contínua e intermitente, respiração acelerada, calafrios e suores noturnos. Na fase aguda observa-se astenia, fadiga, constipação, anorexia, cefaleia, artralgia e um forte impacto ao sistema nervoso levando a neurastenia. Com agravamento do quadro surgem artrites, espondiloses, bursites, dores reumáticas e neuralgia lombar, inflamação da medula óssea. O diagnóstico

clínico da brucelose humana é difícil, pois os sintomas são inespecíficos (YOUNG, 1983; PESSEGUEIRO et al., 2003).

7- Epidemiologia

A brucelose bovina esta distribuída mundialmente. Esta doença foi erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Canadá, Austrália, Japão e Nova Zelândia (OIE, 2008), porém em alguns países como Israel, Kuwait, Arábia Saudita, Brasil e Colômbia, ela tem se tornado um problema re-emergente (CORBEL, 1997).

Entre os ruminantes, o modo de infecção ocorre pela ingestão de pastagens e águas contaminadas, mas também ocorre pelo contato direto com o animal ou sêmen infectado. Para o controle de uma doença infecciosa em uma propriedade, é necessário interromper a cadeia de transmissão pela eliminação dos indivíduos infectados ou aumentar o número de indivíduos resistentes da população (NICOLETTI, 1980).

A prevalência da brucelose nos animais domésticos está relacionada com os animais selvagens sendo eles os principais reservatórios da doença. Estudos mostram que o problema é improvável de ser rapidamente resolvido, com a necessidade do desenvolvimento de novas vacinas, diagnósticos e eliminação inicial de todas as vacas positivas no momento da vacinação (HERRERA et al., 2010).

Brucella abortus é a mais prevalente infecção por *Brucella* spp. no Brasil, seguida por *B. suis* em suínos. A brucelose é responsável pela diminuição de 25% na produção de leite e carne e de 15% na redução da produção de bezerros. No Brasil o último diagnóstico da situação da brucelose bovina foi realizado em 1975, tendo sido estimada a porcentagem de animais soropositivos em 4% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte. A situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil não é adequadamente conhecida (BRASIL, 2006).

Em um estudo realizado por Chate et al. (2009), onde foram amostrados 14.849 bovinos provenientes de 1.004 propriedades do estado de Mato Grosso

do Sul, com o teste do antígeno acidificado tamponado, a prevalência de focos foi de 41,5%.

Um das estratégias para o controle da brucelose é a vacinação do rebanho, vacinação de fêmeas jovens com B19, associada à vacinação estratégica com RB51 em fêmeas com idade superior a oito meses. Determinado um aumento da cobertura vacinal, diminuindo a percentagem de indivíduos susceptíveis da população, diminui a taxa de abortos e diminui a taxa de infecção (POESTER et al., 2005).

A brucelose no homem é acidental, acomete pessoas que desenvolvem atividades com maior risco de exposição, diretamente com animais infectados (tratadores, proprietários e médicos veterinários) ou aqueles que trabalham com produtos e subprodutos (LAWINSKY et al., 2010). Em países menos desenvolvidos, vários casos de brucelose ainda ocorrem pela ingestão de produtos lácteos contaminados (PAULIN, 2006).

8- Vacinas

O PNCEBT introduziu a vacinação obrigatória contra brucelose bovina e bubalina em todo o território nacional e definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas onde essas enfermidades são controladas (BRASIL, 2006).

A vacinação contra brucelose é realizada pela administração das cepas lisas atenuadas B19 de *B. abortus* e Rev.1 de *B. melitensis*, além da cepa rugosa RB51 de *B. abortus* (GRILLÓ et al., 2006). A RB51 é uma cepa atenuada da cepa virulenta S2308, sendo esta obtida naturalmente por várias passagens em meio com rifampicina e seleção de colônias que possuíam morfologia rugosa. Ela não possui a cadeia O do LPS de membrana e assim não induz a produção de anticorpos que interferem nos testes diagnósticos (OLSEN et al., 1999). As vacinas B19 e RB51 utilizadas são derivadas de cepas de *Brucella abortus* na forma atenuada, sendo que ambas podem induzir o aborto e são excretadas no leite. A B19 interfere em testes sorológicos e a RB51 tem a desvantagem de ser resistente a rifampicina, um dos antibióticos utilizados no tratamento contra a brucelose humana (GRILLÓ et al., 2006).

O desenvolvimento de vacinas vivas incide em estudos que determinam o papel de genes individuais na sobrevivência e virulência do microrganismo. Estes métodos envolvem a inativação ou deleção de um gene de forma aleatória ou específica e testes de persistência e proteção imune. Podem ocorrer mutações com efeitos enérgicos na sobrevivência podendo atenuar o microrganismo de tal forma que o nível de proteção gerado não seja suficiente. O nível de atenuação requer uma combinação adequada para proporcionar uma resposta imune protetora, mantendo a segurança (FIORENTINO et al., 2008; FITCH et al., 2009).

As vacinas vivas atenuadas, até o momento tem se mostrado superiores as vacinas mortas para a prevenção da brucelose animal. Estudos usando a cepa de *B. abortus* B19 viva ou morta pelo calor foram realizados com o objetivo de testá-las quanto a capacidade de induzir a produção das citocinas IL-12 e IFN- γ , que são indispensáveis ao controle da infecção por *Brucella*. Os resultados mostram que somente a bactéria viva leva a produção de níveis consideráveis de IL-12, capazes de induzir uma imunidade mediada por células responsáveis pelo controle da infecção por *Brucella abortus* (ZHAN & CHEERS, 1998).

A Organização Mundial de Saúde define que a vacina viva ideal contra *B. abortus*, não deve provocar doença nos indivíduos vacinados, deve prevenir a infecção em ambos os sexos, prevenir aborto, promover proteção contra a infecção por um longo tempo com apenas uma dose, não induzir a produção de anticorpos persistentes os quais interferem no sorodiagnóstico de infecções de campo, ser biologicamente estável, não apresentar risco de reversão da virulência *in vitro* e *in vivo*, não ser patogênica para humanos, e ser facilmente produzida em grande escala (WHO, 1975).

Segundo Olsen et al. (1999), os critérios de biossegurança para vacina viva contra brucelose em bovinos, são: após a vacinação não serem detectados sinais clínicos da doença; as bactérias persistirem nos gânglios linfáticos durante mais de 6 semanas e inferior a 12 semanas; a bacteremia ser menor de três dias; a bactéria não ser detectada em secreções nasais, salivar ou urina; os anticorpos séricos aparecerem 14 dias após a infecção; a imunossupressão não levar ao aparecimento da doença; não serem observadas alterações inflamatórias ou degenerativas nos tecidos e na

recuperação bacteriana do hospedeiro após 12 dias as bactérias serem geneticamente idênticas a cepa vacinal.

9- Vacinas vivas geneticamente modificadas contra *Brucella* spp.

As vacinas vivas atenuadas induzem boa imunidade celular e humoral, não precisam de adjuvantes, os antígenos conseguem multiplicar-se no organismo, assim aumentando o tempo entre as aplicações das doses (Quinn et al., 2005).

Denisov et al. (2010), mostraram que a identificação de novos adjuvantes ou combinações de adjuvantes podem melhorar e modular a resposta imune específica para o antígeno, o que se torna importante no desenvolvimento de vacinas vivas mais eficazes.

Utilizando as estratégias para identificar e caracterizar genes envolvidos nos mecanismos de virulência, como os estudos de mutação e de complementação, há possibilidade de atenuação dos microrganismos, importante estratégia molecular para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas (LAI et al., 1990; MCQUISTON et al., 1995).

Um estudo realizado por Lavigne et al. (2005), que teve como objetivo encontrar efetores secretados pelo VirB/T4SS, foi desenvolvida uma estratégia que utiliza fusões traducionais aleatórias do DNA da *Brucella* spp. concluíram que o gene *bvfa* é responsável pela codificação do fator A de virulência de *Brucella* spp. Ele pode ter participação no estabelecimento do nicho de replicação intracelular.

Sieira et al. (2000), analisaram o papel do gene *virB10* de *B. abortus* na replicação intracelular. Para isto dois mutantes de inserção foram construídos: *B. abortus virB10:Kan* que apresenta o cassete de canamicina polar interrompendo a sequência *virB10* em um sítio de restrição *NruI*, e *B. abortus virB10:GM* mutante, cassete de resistência a gentamicina apolar, interrompendo a sequência *virB10* no mesmo local de restrição. O comportamento de ambos os mutantes foi estudado em células *HeLa*. Vinte e quatro horas pós-infecção (p.i.) os dois mutantes *virB10* polar e apolar foram afetados na sua capacidade de sobrevivência dentro das células. Quarenta e oito horas p.i. não foi obtida recuperação viável dos mutantes.

Segundo Comerci et al. (2001), cassete de resistência a antibióticos inserido no gene *virB10*, afeta a transcrição não somente do *virB10*, mas sequências posteriores a ele. O mutante *virB10* polar foi capaz de escapar da via endocítica, mais incapaz de alcançar o RE, supondo que o mutante *virB10* de *B. abortus* pode ter uma falha, porém o T4SS é parcialmente funcional. Estudos anteriores realizados pelos mesmo autores, mostram que em células HeLa a *Brucella* spp. segue duas etapas: I) Um período de latência de 10 ±12 horas, o qual as bactérias são encontradas no interior das células, mas não se replicam; II) período exponencial de crescimento no RE.

Souza et al., (2009), desenvolveram a cepa mutante S2308Δ*virB10* de *B. abortus* para posteriores testes desta como imunógeno. A interrupção do gene *virB10* do operon *virB* nesta cepa, foi caracterizada como apolar, o que implicou na manutenção da capacidade do patógeno em invadir as células do hospedeiro. A baixa persistência da cepa mutante S2308Δ*virB10* em camundongos BALB/c indicaram a avaliação desta como um potencial imunógeno (SOUZA et al., 2009). No presente estudo avaliou-se o efeito protetor bem como alterações histopatológicas pós-administração da cepa mutante S2308Δ*virB10* de *B. abortus* em camundongos BALB/c, como uma ferramenta eficaz na prevenção da brucelose experimental.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. Development of live *Brucella* vaccine, from *Advances in Brucellosis*. **Texas A&M University Press**, p. 250-276,1990.
- AKIRA,S.; UEMATSU,S.; TAKEUCHI,S. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**. V.124; p.783-801, 2006.
- ARELLANO-REYNOSO,B.;LAPAQUE,N.SALCEDO,S.; et al. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required forintracellular survival. **Natural Immunology**.V.6,p.618-625,2005.
- KAWAI,T.; AKIRA,S. TLR signaling. **Cell Death & Differentiation**. V.13; p.816-825, 2006.
- BOSCHIROL, M. L. et al. Type IV secretion and *Brucella* virulence. **Veterinary Microbiology**. V.90, p.341-348, 2002.
- BOSCHIROLI, M. L., et al. The *Brucella suis* operon *virB* is induced intracellularly in macrophages. **Proceeding of a National Academy of Scientific USA**. 7, p 248-254, 2002.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações. Brasília, 1998.
- BRASIL. Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose- PNCEBT. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília, p.190, 2006.
- BRUCE,D. Note on the Discovery of a microorganism in Malta fever. **Practitioner,Lond**. N.39,p.161-170,1887.
- CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). *Animal Brucellosis*. **CRC Press**. Inc. p. 335-350, 1990.
- CAPASSO,L. Bactéria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **Journal of Infection**. V.45, p.122-127, 2002.
- CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems. **National Veterinary Microbiology**. v. 1, n. 2, p. 137-149, 2003.
- CHATE, S. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovino no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.61, p. 46-55, 2009.
- CHEVILLE, N.F.; Olsen, S.C.; Jensen, A.E. et al. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**. V.57(8). P.1153-6. 1996.

CHEVILLE, N. F. et al. Bacterial persistence and immunity in goats vaccinated with a *purE* deletion mutant or the parental 16M strain of *Brucella melitensis*. **Infection Immunity**. v. 7, n. 64, p.2431-9, 1996.

CIRL, C.; WIESER, A., YADAV, M.; et al. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. **Nature Medicine**. V.14, p.399-406, 2008.

COMERCI, D. J. et al. Essential role of the *VirB* machinery in the maturation of the *Brucella abortus* containing vacuole. **Cellular Microbiology**. v.3, n. 3, p. 159-68, 2001.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**. v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

CORBEL, M. J.; MORGAN, W. J. B. Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173AL. In: HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of systematic Bacteriology**. v. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins. p. 377-388, 1984.

DEN HARTIGH, A. B. et al. Differential requirements for *virB1* and *virB2* during *Brucella abortus* infection. **Infection and immunity**. V.72, p.5143-5149, 2004.

DENISOV, A.A; KOROBOVTSEVA, Y.S.; KARPOVA, O.M., et al. Immunopotential of live brucellosis vaccine by adjuvants. **Vaccine**. V.28. p.17-22, 2010.

ESKRA, L., CANAVESSI, A., CAREY, M. and SPLITTER, G. *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophages infection. **Infection and Immunity**. V.69, p. 7736-7742, 2001.

FICHT, T. A. et al. Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. **Vaccine**. V. 5, n. 27, p.3-40, 2009.

FICHT, T. A.; ADAMS, G. Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases. In: BARRETT, A. D. T.; STANBERRY, L. R. (Ed.). *Brucellosis*. Amsterdam: **CRC Press**. Cap. 42, p. 807-29, 2009.

FIORENTINO, M., A. et al. Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2. **Emerging Infectious Diseases**. V.132, n.3-4, p.302-311, 2008.

FRETIN, D. et al. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. **Cellular Microbiology**. n.7, p.687-698, 2005.

ARENAS-GAMBOA, A. M. et al. The *Brucella abortus* S19 $\Delta vjbR$ live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. **Infection Immunity**. V. 77, n. 2, p.877-884, 2009.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**. V.36, p.313-326, 2005.

GODFROID, J. et al. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. **Croatian Medical Journal**. V.51, p. 296-305, 2010.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**. V.90, p. 281-297, 2002.

GRILLÓ, J. M. et al. Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth bvrS/bvrR and rough wbkA mutants. **Vaccine**. V. 24, p. 2910–2916, 2006.

HERRERA-LOPEZ, E. ; Suárez-Güemes, F.; Hernández-Andrade ,L. et al. Epidemiological study of brucellosis in cattle, immunized with *Brucella abortus* RB51 vaccine in endemic zones. **Vaccine**, v.28, p. 59–63, 2010.

JANEWAY, C.A.; TRAVES, P; WALPORT, M.; et al. Immunobiology: The immune system in health and disease. 5 ed. New York: **Garland publishing**, 2001.

JUHAS, M.; CROOK, D. W.; HOOD, D. W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. **Cellular Microbiology**. V.12, n.10, p.2377-2386, 2008.

KOHLER, S. et al. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. **Veterinary Microbiology**. V.8, p.60-66, 2005.

KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 16, p.65-78, 2003.

LAI, F.; SCHURIG, G.G.; BOYLE, S.M. et al. Electroporation of a suicide plasmid bearing a transposon into *Brucella abortus*. **Microbial Pathogenesis**. V.9, p.363-368, 1990.

LAPAQUE, N. et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Current Opinion In Microbiology**. V.8, p. 60-66, 2005.

LAVIGNE, J.P.; PATEY, G., SANGARI, F.J.; et al. Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. **Infection and Immunity**. n.73, p.5524-5529, 2005.

LAWINSKY, J.L.M.; OHARA, M.P.; ELKHOURY, R.M.; et al. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. V. 1(4). p. 75-84, 2010.

MACEDO,G.C.; MAGNANI,D.M; CARVALHO,N.B.; et al. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **The Journal of Immunology**. V.180,p.1080-1087, 2008.

MARIA-PILAR, J. B., DUDAL, S, DORNAND, J. AND GROSS, A. Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. **Clinical Immunology**. V.114, p. 227-238, 2005.

McQUISTON, J.R.; SHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; et al. Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host-range plasmids. **Methods in Molecular Biology**. V.47,p.143-148, 1995.

McDonagh,M.M. and FICHT,T.A.; Evaluation of Protection Afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Unmarked Deletion Mutants Exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. **Infection and Immunity**. V.74.p4048-4057,2006.

MENEGHI, D. Wildlife, environment and (re)-emerging zoonoses, with special reference to sylvatic tick-borne zoonoses in North-western Italy. **Ann Ist Super Sanità**. V.42, n.4, p. 405-09, 2006.

MONTEIRO, L. A. R. C. et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n.26(4), p.217-222, 2006.

MORENO, E.; MORI YON, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V.99, p.1-3, 2002.

MORGAN,B.P.;HARRIS,C.L.; Complement therapeutics; history and current progress. **Molecular Immunology**.v.40.p.159-170, 2003.

NICOLLETI,P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary science an comparative medicine**. V.24,p.69-98, 1980.

NICOLETTI, P.; WINTER A. J. The immune response to *Brucella abortus* – the cell-mediated response to infection. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: **CRC Press**, p.83-96, 1990.

O'CALLAGHAN,D. et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* *VirB* *Bordetella pertussis* *Ptl* type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. **Molecular Microbiology**. V.33, p. 1210-1220, 1999.

OIE/WHO. Bovine brucellosis. *In*: MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris, 6. ed. p. 624-659. 2008.

OLIVEIRA,S.C.;HARMS,J.S;RECH,E.L.; et al. Tthe role of T cell subsets nd cytokines in the regulation of intracelular bacterial infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V.31,p.77-84, 1998.

OLIVEIRA,S.C; DE OLIVEIRA,F.S; MACEDO,G.C.; et al. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. **Microbes and Infection**.,v.10,p.1005-1009,2008.

OLSEN, C. S. et al. **Informe Técnico sobre la vacunación del Ganado Com La Cepa RB51 De *Brucella abortus***. P. 1-7, 1999.

PAULIN,L.M.S.; Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**.V.70,p.239-249, 2003.

PAULIN, L.M.S.; Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnostico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). São Paulo. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.P.93, 2006.

PAULIN,L.M.S.;FERREIRA NETO,J.S. Brucelose em búfalos. **Arquivo do Instituto Biológico**. V.75, p.389-401,2008.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIRA, J. Brucelose- uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**. V. 10, p. 91-100, 2003.

PORTE, F. A. et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in innibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophage. **Infection and Immunity**. V.71, p.1481-1490, 2003.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brasil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62, 2002.

POESTER,F.P.; SAMARTINO,L.E.; LAGE,A.P. Diagnóstico da brucelose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. N. 47, p.13-29, 2005.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C.. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, P.512, 2005.

ROUX, C. M. et al. *Brucella* requires a functional type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. **Cellular Microbiology**. V.9, p.1851-1869, 2007.

ROLÁN H.G, TSOLIS R.M. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus* virB mutant colonization. **Infection Immunity**. V.75(6), p. 2965-73, 2007.

SCHURIG, G. G.;R. M. Roop, Jr.; T. Bagchi., et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinay Microbiology**. V.28,p.171–188,1991.

SIEIRA, R. et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. **Journal of Bacteriology**. v. 182, n. 17, p. 4849-4855, 2000.

Seleem, M. N.; Boyle, S. M.; Sriranganathan, N.; *Brucella*: A pathogen without classic virulence genes. *Veterinary Microbiology*, (129) p. 1–14, 2008.

SMITH, L. D.; FICHT, T. A. Pathogenesis of *Brucella*. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 17, n. 3, p. 209-230. Mar. 1990.

SOUZA, F.G.; OSÓRIO, A.L.A.R., GSORDAS, B.G., et al. Desenvolvimento e avaliação de uma cepa *Knockout* de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene *virB10*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V.11.p.943-950, 2009.

TERWAGEM, M. et al. Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella*. **Cellular Microbiology**. V. 15(6), p.942-960, 2013.

UGALDE, J.E., COMERCÍ, D. J., LEGUIZAMÓN, M. S. et al. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. **Infection and Immunity**. V.71, p. 6264-6269, 2003.

WHO. Laboratory Techniques in Brucellosis. **2ª edição. Geneva**. p.161, 1975.

YANAGI, M.; YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**. n.107, p.115–120. 1993.

YOUNG, E. J. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. **APMIS. Supplement.**, v. 3, p. 17-20. 1988.

YOUNG, E. J. Human brucellosis. **Reviews Infectious Diseases**. v. 5, n. 5, p. 821-842, 1983.

ZHAN, Y.; CHEERS, C. Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. **Journal Immunology**. V.161, n.161, n.3, p. 1447-1453, 1998.

ZINSSTAG, J. et al. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. **Emerging Infectious Diseases**. V.13, p. 527–531, 2007.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Avaliação da administração da cepa mutante S2308~~Avir~~B10 de *Brucella abortus* em camundongos BALB/c.

Cheyenne Santana Jácomo¹, Cleber Oliveira Soares², Gisele Braziliano Andrade³,
Grácia Maria Soares Rosinha^{2*}

*Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte. Avenida Rádio Maia, 830,
CEP 79106-550, Campo Grande, MS; Telefone: +55 (67) 3368-2168; E-mail:
gracia.rosinha@embrapa.br

Periódico: Veterinary Research Communications

25

26 **Avaliação da administração da cepa mutante S2308 Δ virB10 de *Brucella abortus* em**
27 **camundongos BALB/c.**

28

29 (1) Mestranda da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS

30 (2) Pesquisador (a) da Embrapa Gado de Corte.

31 (3) Universidade Católica Dom Bosco- UCDB

32 * Autor para correspondência: Telefone: +55 (67) 3368-2168; E-mail:

33 gracia.rosinha@embrapa.br

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

Abstract

50 Brucellosis is a zoonosis of global importance which abortion and infertility is the
51 mainly the symptoms of the disease. Nowadays, the vaccines licensed for use in cattle
52 have disadvantages and the level of protection achieved is still not ideal. This study
53 evaluated the protector effect and histopathological anatomical changes of mutante
54 strain S2308 Δ virB10 of *B. abortus* in BALB/c mice. For the evaluation of the
55 protection, groups of mice were inoculated intraperitoneally with the vaccine S19 and
56 S2308 Δ virB10 from *B. abortus* and control group with PBS. After six weeks, they were
57 challenged with virulent strain S2308 of *B. abortus*. S2308 Δ virB10 presentation 0,62
58 protection unit PU ($p=0,0047$) upon challenge with strain S2308 of *B. abortus* when
59 compared to the control group, although it's protection was lower than S19 vaccine
60 (1,66 UP) (0,003). For histopathological anatomical analysis, mice was inoculated
61 intraperitoneally with strains S19, S2308 Δ virB10 and S2308 and control group PBS.
62 Two weeks after inoculation and two weeks after challenge, animals were euthanized
63 for spleen and liver collection. In animals euthanized two weeks after inoculation of
64 strains, was observed that animals inoculated with S2308 Δ virB10 showed mild
65 splenomegaly and only inflammatory foci in the liver, best results than other strains.
66 The remaining animals in this group, which were challenged with virulent strain, also
67 showed mild splenomegaly, however, showed more severe and irreversible lesions such
68 as fibrosis in the spleen and liver granuloma, when compared to inoculated animals with
69 strain S19. These data evidence that mutant strain S2308 Δ virB10 induces a weak
70 protection, probably demonstrate by the irreversible damage caused by the virulent
71 strain after challenge.

72

73 **key words:** *Brucella abortus*; vaccine; gene *virB10*; protection.

74

75

76

77

78

79

Resumo

80 Brucelose bovina é uma zoonose de importância mundial, sendo aborto e infertilidade
81 os principais sintomas da doença. As vacinas atualmente licenciadas para o uso em
82 bovinos possuem desvantagens e o nível de proteção alcançado ainda não é ideal. Neste
83 estudo avaliou-se o efeito protetor e alterações anatomopatológicas da cepa mutante
84 S2308 Δ virB10 de *B. abortus* em camundongos BALB/c. Para a avaliação da proteção,
85 grupos de camundongos foram inoculados intraperitonealmente com a vacina B19,
86 S2308 Δ virB10 e grupo controle PBS. Após seis semanas foram desafiados com cepa
87 virulenta S2308 de *B. abortus*. S2308 Δ virB10 apresentou 0,62 Unidade de proteção
88 (UP0 ($p=0,0047$) frente ao desafio com a cepa S2308 quando comparada ao grupo
89 controle, porém sua proteção foi menor que a vacina B19 (1,66UP) ($p=0,003$). Para as
90 análises anatomopatológicas, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com
91 as cepas B19, S2308 Δ virB10, S2308 e grupo controle PBS. Duas semanas pós-
92 inoculação e duas semanas pós-desafio, os animais foram eutanasiados para a coleta de
93 baço e fígado. Nos animais eutanasiados duas semanas pós-inoculação das cepas,
94 observou-se que os inoculados com S2308 Δ virB10 apresentaram esplenomegalia leve e
95 apenas focos inflamatórios no fígado, resultados melhores que as demais cepas. Os
96 animais restantes deste grupo, que foram desafiados com a cepa virulenta, também
97 apresentaram esplenomegalia leve, porém apresentaram lesões mais severas e
98 irreversíveis como fibrose no baço e presença de granuloma no fígado, quando
99 comparado aos animais inoculados com a cepa B19. Estes dados demonstram que a cepa
100 mutante S2308 Δ virB10 induz uma fraca proteção, provavelmente evidenciada pelas
101 lesões irreversíveis causadas pela cepa virulenta após o desafio.

102

103 **Palavras-chave:** *Brucella abortus*, vacina, gene *virB10*, proteção.

104

105

106

107

108

109

110 **INTRODUÇÃO**

111 A brucelose bovina é uma das zoonoses reemergentes mais importantes e
112 difundidas no mundo, sendo causada principalmente pela bactéria *Brucella abortus*.
113 Esta acomete principalmente o sistema reprodutivo dos animais, causando abortos no
114 terço final da gestação, infertilidade, orquite, epididimite e lesões granulomatosas
115 (Nicoletti, 1990). Em humanos os sinais mais comuns são: febre contínua e
116 intermitente, sudorese, dores articulares, hepatomegalia, esplenomegalia e
117 manifestações osteoarticulares (Franco et al., 2007).

118 *Brucella* spp. é capaz de infectar animais e seres humanos. Sua virulência é
119 dependente das propriedades de sobrevivência e replicação, em diferentes tipos de
120 células. Esta controla a maturação do vacúolo das células do hospedeiro para evitar
121 respostas imunes inatas, atingindo seu nicho replicativo associado com o retículo
122 endoplasmático (Gorvel & Moreno, 2002).

123 Fatores envolvidos com a patogenicidade permitem a invasão, a sobrevivência e
124 a multiplicação nas células do hospedeiro, sendo estas fagocíticas ou não fagocíticas
125 (Gorvel & Moreno, 2002). Porém ela apresenta capacidade de adaptação às condições
126 ambientais, encontradas no nicho de replicação intracelular, que tem baixos níveis de
127 nutrientes e oxigênio, pH ácido e intermediários reativo de oxigênio (Kohler et al.,
128 2005).

129 Existem vários mecanismos de virulência que já foram verificados no gênero
130 *Brucella*, entre eles o sistema de secreção do tipo IV (T4SS), que corresponde a uma
131 família de proteínas. Este sistema é codificado pelo *locus virB*, um operon de 12 genes
132 (*virB1 a virB12*), localizado no cromossomo II, importante para a sobrevivência e
133 replicação intracelular de *Brucella* (Boschiroli et al., 2002; Den Hartigh et al., 2004).

134 Em estudos utilizando camundongos inoculados com *Brucella* spp., foi
135 observado que o principal órgão afetado é o baço, apresentando elevada colonização
136 bacteriana e como alterações mais importantes: esplenomegalia, na fase aguda
137 infiltração neutrofílica e na fase crônica, infiltração histiocitária. Nas alterações
138 hepáticas são observados infiltrados neutrofílicos e histiocitários com microgranulomas
139 multifocais (Tobias et al. 1993).

140 Para o controle desta enfermidade em 2001 o Ministério da Agricultura Pecuária
141 e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da
142 Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) tendo como foco principal o diagnóstico, e a
143 vacinação contra a brucelose bovina. A vacinação contra infecções causadas por
144 *Brucella* é feita pela administração das cepas lisas atenuadas B19 de *B. abortus*
145 (bovinos), Rev.1 de *B. melitensis* (pequenos ruminates) e a cepa rugosa RB51 de *B.*
146 *abortus* (bovinos) (Brasil, 2006).

147 A brucelose é um problema de saúde pública devido à sua possibilidade de
148 transmissão aos seres humanos. A prevenção no homem depende até o momento da
149 erradicação ou controle da doença em animais hospedeiros, visto que não existe vacina
150 para humanos para o controle desta zoonose.

151 O desenvolvimento de um potencial imunógeno contra *B. abortus*, é de grande
152 importância visto que as vacinas existentes para bovinos não correspondem ao
153 imunógeno ideal como orientado pela OMS (Arenas-Gamboa et al., 2009).

154 O desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas mantém as vantagens das
155 propriedades naturais do microrganismo patogênico, incluindo invasão celular e
156 disseminação para órgãos específicos do hospedeiro em que os genes responsáveis pela
157 virulência e patogenicidade são deletados por técnicas moleculares (Ficht et al., 2009).

158 Em virtude do exposto acima, Souza et al., (2009), desenvolveram a cepa
159 mutante S2308 Δ *virB10* de *B. abortus*. A interrupção do gene *virB10* do operon *virB*
160 nesta cepa, foi caracterizada como apolar, o que implicou na manutenção da capacidade
161 do patógeno em invadir as células do hospedeiro. A baixa persistência da cepa mutante
162 S2308 Δ *virB10* em camundongos BALB/c indicou a avaliação desta como um potencial
163 imunógeno (Souza et al., 2009). Sendo assim, no presente estudo avaliou-se o efeito
164 protetor, as alterações anatomohistopatológicas pós-administração da cepa mutante
165 S2308 Δ *virB10* de *B. abortus* em camundongos BALB/c, como uma ferramenta eficaz
166 na prevenção da brucelose experimental.

167

168 **MATERIAIS E MÉTODOS**

169 Cepas bacterianas e condições de cultivo

170 As cepas bacterianas de *B. abortus* utilizadas neste estudo estão listadas na
171 (Tabela 1). Estas foram cultivadas em meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB), por três
172 dias a 37°C sob agitação de 200 RPM. Para o preparo do meio sólido utilizou-se o meio

173 TSB suplementado com ágar bacteriológico a 0,8% e quando necessário foi adicionado
 174 eritritol e canamicina nas concentrações de 0,1% e 50mg/ml respectivamente.

175

176 **Tabela 1.** Cepas de *Brucella abortus* utilizadas neste estudo.

Cepas	Características	Fonte
<i>B. abortus</i> S2308	Cepa lisa e virulenta	Estoque do laboratório LEGA*
<i>B. abortus</i> B19	Cepa lisa, atenuada	Produto comercial
<i>B. abortus</i> S2308 Δ <i>virB10</i>	kan ^r , Cepa lisa	Souza et al. 2009 LEGA

177 *LEGA: Laboratório de Engenharia genética Animal/EMBRAPA Gado de Corte

178

179

180 Estudos de proteção

181 Camundongos BALB/c fêmeas com idade de 6 a 8 semanas foram inoculados
 182 por via intraperitoneal com 1×10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas
 183 em tampão fosfato-salino PBS (PBS, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*, 137mM
 184 NaCl, 10mM Fosfato, 2,7mM KCl e pH de 7,4) com a vacina B19 e com a cepa
 185 mutante S2308 Δ *virB10* (n= 5 animais por grupo). Um grupo de 5 camundongos foi
 186 inoculado da mesma forma com 100 μ L de PBS como controle. Após seis semanas os
 187 camundongos foram desafiados intraperitonealmente com 1×10^5 UFC com a amostra
 188 virulenta S2308 em PBS e duas semanas após o desafio foi realizada a eutanásia por
 189 deslocamento cervical desses animais. O baço de cada animal foi removido e macerado
 190 para posterior determinação do número de UFC. Feitas as diluições seriadas 10^{-2} , 10^{-3} e
 191 10^{-4} , estas foram plaqueadas em meio TSB suplementado com ágar e canamicina para o
 192 grupo que foi inoculado com a cepa mutante e TSB suplementado com ágar e eritritol
 193 para o grupo inoculado com a cepa vacinal B19. Os níveis de infecção foram expressos
 194 em média \pm desvio padrão de \log^{10} UFC/baço. A eficácia da vacina nos animais
 195 inoculados foi comparada aos animais inoculados com PBS e a unidade de proteção foi
 196 determinada subtraindo-se a média das UFC/baço recuperado com a média da

197 UFC/baço dos animais controle inoculados com PBS. Este experimento foi realizado
198 em duplicata.

199

200 Análises Anatomohistopatológicas

201 Para estas análises, vinte e um camundongos BALB/c de 6 a 8 semanas de idade
202 foram distribuídos em 4 grupos experimentais os quais foram inoculados com 1×10^6
203 UFC, por via intraperitoneal, com as cepas de *B. abortus*, B19, S2308 Δ *virB10*, S2308 e
204 grupo controle PBS. Os grupos foram formados por seis camundongos cada (os quais
205 foram separado em 2 caixas com 3 animais em cada uma), exceto o grupo inoculado
206 com S2308, que conteve apenas 3 animais. Duas semanas após a inoculação, 3 animais
207 de cada um dos grupos foram eutanasiados para coleta de baço e fígado.

208 O desafio experimental foi realizado apenas nos animais dos grupos inoculados
209 inicialmente com *B. abortus* B19, S2308 Δ *virB10* e PBS, por via intraperitoneal, com
210 1×10^5 UFC da cepa virulenta S2308, seis semanas após a inoculação inicial. Então, duas
211 semanas após o desafio, todos os animais foram eutanasiados para a coleta de baço e
212 fígado.

213 O material coletado foi avaliado quanto às alterações macroscópicas e
214 posteriormente foram fixados em formalina a 10% durante 48 horas e, por conseguinte,
215 lavados em água corrente e armazenados em álcool 70%.

216 Para as análises histopatológicas, os fragmentos foram clivados, colocados no
217 processador automático de tecidos, e em seguida emblocados em parafina. Os blocos
218 foram seccionados em micrótomo a uma espessura de 5 μ m, e as lâminas foram coradas
219 em Hematoxilina e Eosina (H&E) para a descrição histopatológica. As lâminas foram
220 observadas com o auxílio de um microscópio óptico de luz e as imagens foram obtidas
221 por um sistema de captura de imagens adequado.

222

223 Análise estatística

224 Foi utilizado o teste t *student* pelo programa estatístico GraphPad Prism sendo
225 valores para $p < 0.05$ considerados significantes estatisticamente.

226

227 Ética na utilização dos animais experimentais

228 O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética para utilização do uso de animais
229 em experimentos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e aprovado com nº
230 de registro: CEUA nº 554/2013.

231

232

233 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

234

235 Avaliação da eficácia protetora da cepa S2308 $\Delta virB10$

236

237 Observou-se que a cepa mutante S2308 $\Delta virB10$ de *B. abortus* apresentou 0,62
 238 unidades de proteção (UP) ($p=0,0047$) frente ao desafio com a cepa virulenta S2308 de
 239 *B. abortus* quando comparado ao grupo controle PBS, porém sua proteção foi menor
 240 que a cepa vacinal B19 (1,62 UP) ($p=0,003$), conforme apresentado na (Tabela 2).

241

242 **Tabela 2.** Análise da proteção de camundongos BALB/c inoculados com a cepa
 243 mutante S2308 $\Delta virB10$ de *B. abortus* e com a cepa vacinal B19 contra o desafio com a
 244 cepa virulenta S2308 de *B. abortus*.

Grupos	Log ₁₀ de UFC da <i>B. abortus</i> (média ± DP)*	Unidades de proteção (log ₁₀)
PBS	6,38 ± 0,07	
B19	4,72 ± 0,56	1,66 ^a
S2308 $\Delta virB10$	5,76 ± 0,14	0,62 ^a

245

*Camundongos imunizados com 10⁶ UFC e seis semanas após foram desafiados via intraperitoneal com 10⁵ UFC da cepa S2308.

246

^a $P < 0,05$, significante comparado ao grupo controle PBS.

247

248 Palomares-Resendiz et al. (2012), avaliaram a resposta protetora de *Brucella*
 249 *canis* $\Delta virB10:Gm$ e $\Delta virB11:Gm$, frente ao desafio com a cepa virulenta de *B. canis*,
 250 pois não existe nenhuma vacina contra brucelose canina. Estudos com a mutante *virB*
 251 demonstrou que nas cepas de *B. abortus* e *B. melitensis* sua capacidade de sobreviver e se
 252 replicar foi reduzida (Rolan & Tsolis, 2008). Quando comparado ao grupo controle PBS
 253 foi obtida 1,72 UP para a cepa mutante $\Delta virB10:Gm$ e 0,76 UP para a cepa mutante
 254 $\Delta virB11:Gm$. Neste estudo, os dados obtidos com a cepa S2308 $\Delta virB10$ de *B. abortus*
 255 não estão de concordância com estes resultados, pois a UP obtida pela cepa
 256 S2308 $\Delta virB10$ foi menor comparada à UP obtida pela cepa mutante $\Delta virB10:Gm$.
 257 Ressaltando que as condições experimentais utilizadas no desafio diferem entre os

258 trabalhos sendo a dose neste estudo ter sido duas vezes maior que a usada por
259 Palomares-Resendiz et al. (2012).

260 Os mecanismos de virulência de *Brucella* spp. não são completamente
261 compreendidos, mas a capacidade de causar a infecção está relacionada com a
262 sobrevivência intracelular da bactéria, o que tem sido associado com o sistema de
263 secreção do tipo IV (Celli et al., 2003).

264 Souza et al., (2009), realizaram a deleção apolar do gene *virB10* da cepa S2308
265 de *B. abortus* gerando uma cepa *knockout*. Os autores avaliaram a virulência da cepa
266 mutante em camundongos BALB/c, comparada à virulência da cepa selvagem S2308 e
267 cepas vacinais B19 e RB51. Os resultados mostraram que a mutante S2308*virB10*,
268 apresentou comportamentos semelhantes a RB51 com menor virulência em relação às
269 demais cepas. A persistência da cepa mutante foi baixa quando avaliada uma, três e seis
270 semanas pós-infecção, demonstrando que o gene *virB10* é essencial para a manutenção
271 da virulência de *B. abortus*.

272 Comerci et al. (2001) utilizaram as mutações apolares para demonstrar que
273 *virB4*, *virB8*, e *virB10* são genes necessários para a persistência de infecção por
274 *Brucella* spp. Sieira et al. (2000) em seu trabalho com S2308*virB10* de *B. abortus*
275 observou que o número de bactérias recuperadas no baço de camundongos inoculados
276 somente com o gene de mutação apolar de *virB10* foi significativamente mais baixo do
277 que o número recuperado de camundongos inoculados com a cepa selvagem. Quarenta e
278 oito horas pós-infecção a cepa mutante S2308*virB10* não foi recuperada, enquanto que
279 a cepa virulenta S2308 aumentou exponencialmente, porém nenhum dano à célula
280 hospedeira foi observado em ambas as cepas. A ausência do gene *virB10* impossibilita
281 cepas mutantes de replicar em macrófagos e sobreviver em camundongos.

282 Mutantes de *B. abortus virB1* e *virB10* são incapazes de persistir em baços de
283 camundongos de duas a oito semanas após infecção, sugerindo que a atenuação no
284 modelo animal é devida a uma incapacidade destas estirpes em crescer no meio
285 intracelular (Hong et al., 2000).

286 Construções moleculares mutacionais de deleção de genes do *operon virB* que
287 podem alterar somente o gene que corresponde a deleção, sendo que os genes
288 posteriores e anteriores são mantidos inalterados, este tipo de mutação é chamada de
289 apolar. Para mutantes que contém a deleção do *virB10* e que possuem sequências fortes
290 no sítio de terminação que afetam a transcrição não somente de *virB10* mais igualmente
291 de *virB11* e de sequências posteriores, são mutantes polares. Mutações polares no *locus*

292 *virB* reduzem significativamente a capacidade de *B. abortus* de sobreviver em cultura de
293 macrófagos, ou persistir em órgãos de camundongos. A deleção apolar do gene *virB2*
294 reduziu a sobrevivência em cultura de macrófagos e a persistência em órgãos de
295 camundongos, enquanto uma deleção apolar do gene *virB1* só reduziu a sobrevivência
296 em macrófagos . Os autores concluíram que *virB2* , *virB3* , *virB4*, *virB5*, *virB6* , *virB8* ,
297 *virB9* , *virB10* e *virB11* são essenciais para a virulência de *B. abortus* em camundongos,
298 enquanto que as funções codificadas pelos genes *virB1* , *virB7* e *virB12* não são
299 necessários para a persistência da *Brucella* spp. em órgãos de camundongos (Den
300 Hartigh et al., 2004;Den Hartigh et al., 2008;).

301 Neste estudo, o potencial protetor da cepa mutante S2308 Δ *virB10*, frente ao
302 desafio com a cepa virulenta S2308, demonstrou níveis mais baixos de proteção em
303 camundongos BALB/c, quando comparada a cepa vacinal B19. Uma vez que o gene
304 *virB10* está relacionado com a virulência e sobrevivência intracelular, a sua deleção
305 pode ter levado a um nível de atenuação exacerbado, o que pode ter impossibilitado a
306 cepa mutante de causar uma resposta inflamatória em camundongos e desta forma
307 induzir uma imunidade protetora e conseqüentemente uma proteção mais significativa
308 frente ao desafio com a cepa virulenta

309

310 Análises Anatomohistopatológicas

311

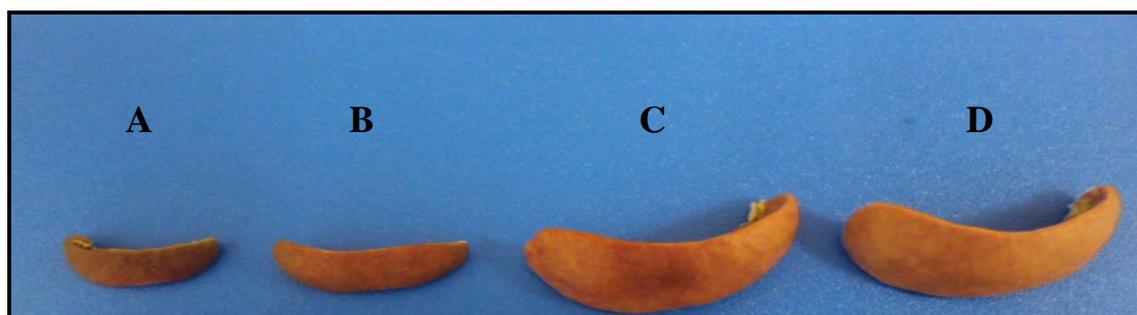
312 Na análise macroscópica realizada (Fig. 1), nos animais eutanasiados duas
313 semanas após a inoculação, os animais inoculados com a cepa vacinal B19 e a cepa
314 virulenta S2308 apresentaram esplenomegalia exacerbada, o que sugere um aumento
315 da resposta inflamatória à infecção sendo esta confirmada apenas pelo exame
316 histopatológico. Os animais inoculados com a cepa mutante S2308 Δ *virB10*
317 apresentaram uma esplenomegalia leve.

318 Na avaliação macroscópica (Fig. 2) realizada nos animais eutanasiados duas
319 semanas após o desafio com a cepa virulenta S2308, foi observada esplenomegalia mais
320 acentuada nos animais controle inoculados com PBS, quando comparado aos demais.
321 No entanto, os animais inoculados com as cepas B19 e S2308 Δ *virB10* também
322 apresentaram esplenomegalia, porém de forma mais leve.

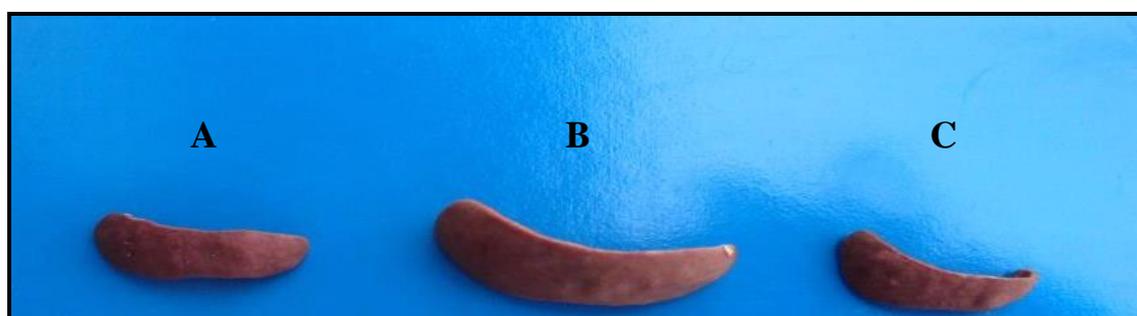
323 Stevens et al., (1994) evidenciaram em seu trabalho que o aumento da segurança
324 de uma cepa se dá pela ausência da esplenomegalia em camundongos que foram
325 inoculados com cepas de *Brucella* spp., resultados em concordância com o presente

326 estudo, mas quando a ausência de esplenomegalia é associada com as alterações
 327 histopatológicas a cepa mutante não é segura para proteger os camundongos contra a
 328 brucelose experimental.

329 Arenas-Gamboa et al. (2012) demonstraram que existem diversos parâmetros para
 330 analisar a eficácia protetora de uma cepa mutante, tais como a redução bacteriana do
 331 baço, diminuição das alterações patológicas do baço e fígado, redução na resposta
 332 inflamatória, evidenciada por uma redução na esplenomegalia. Estes resultados estão de
 333 concordância com os do presente estudo, pois a cepa mutante S2308 Δ virB10 apresentou
 334 esplenomegalia leve, tanto nos animais somente inoculados e nos animais inoculados e
 335 desafiados. Porém na avaliação histopatológica, os animais inoculados com a cepa
 336 mutante apresentaram alterações hepáticas e quando estes animais foram desafiados
 337 com a cepa virulenta S2308 as lesões histopatológicas foram mais severas e
 338 irreversíveis do que as observadas no grupo inoculado com a cepa vacinal B19.
 339



340
 341 **Fig. 1.** Morfologia do baço de camundongos BALB/c inoculados com PBS e as cepas
 342 B19, S2308 Δ virB10 e S2308 de *Brucella abortus*. Os animais foram inoculados por via
 343 intraperitoneal com 1×10^6 UFC de cada amostra e eutanasiados duas semanas após.
 344 Observa-se em A o grupo controle PBS; (B) a cepa mutante S2308 Δ virB10; (C) cepa
 345 vacinal B19 e (D) cepa virulenta S2308 de *B. abortus*. Os animais inoculados com a
 346 cepa vacinal B19 e a cepa virulenta apresentaram esplenomegalia exacerbada e os
 347 inoculados com a cepa S2308 Δ virB10 apresentaram esplenomegalia leve.
 348



349
 350 **Fig. 2.** Morfologia do baço de camundongos BALB/c inoculados com a cepa mutante
 351 S2309 Δ virB10, cepa vacinal B19 e PBS. Os animais foram inoculados por via
 352 intraperitoneal com 1×10^6 UFC de cada amostra e seis semanas após desafiados com
 353 1×10^5 UFC com a cepa virulenta S2308 de *B. abortus*, sendo eutanasiados duas semanas

354 após. Observa-se em (A) a cepa mutante S2308 Δ virB10, (B) grupo controle PBS e (C)
 355 cepa vacinal B19. Todos os grupos apresentam esplenomegalia, porém a do grupo
 356 controle PBS foi mais exacerbada.

357

358

359 Nas análises histopatológicas nos animais eutanasiados duas semanas após a
 360 inoculação, os animais inoculados com PBS não apresentaram alteração histopatológica
 361 no baço (Fig. 3A) e fígado (Fig. 3B). Os animais inoculados com a cepa S2308 Δ virB10
 362 apresentaram hepatite multifocal, sendo o infiltrado inflamatório composto
 363 predominantemente por células monucleares (Fig. 3C), e baço sem alterações (Fig. 3D).
 364 Os animais inoculados com a cepa virulenta S2308 de *B. abortus*, apresentaram
 365 desorganização do parênquima esplênico (Fig. 3E) e no fígado formação de granuloma
 366 (Fig. 3F). Os animais inoculados com a cepa vacinal B19, apresentaram no baço, fusão
 367 da zona marginal para a polpa vermelha (Fig. 3G) e no fígado, granuloma em formação
 368 e hepatite multifocal (Fig. 3H). As alterações observadas nos animais destes grupos
 369 estão apresentadas de forma resumida na (Tabela 3).

370

371

372 **Tabela 3.** Alterações histopatológicas encontradas no baço e fígado de camundongos
 373 eutanasiados duas semanas após a inoculação com as cepas de *Brucella abortus* B19,
 374 S2308 Δ virB10 e S2308.

ALTERAÇÕES OBSERVADAS		
Grupo	Baço	Fígado
PBS	-	-
S2308 Δ virB10	-	Hepatite multifocal infiltrado inflamatório, células monucleares
S2308	Desorganização do parênquima	Formação de granuloma
B19	Fusão da zona marginal para a polpa vermelha	Granuloma em formação Hepatite multifocal

375

376 Nos animais eutanasiados duas semanas após o desafio com a cepa virulenta
 377 S2308, as alterações mais severas foram observadas no grupo inoculado com PBS, que
 378 apresentou fibrose no baço (Fig. 4A) e no fígado, reação inflamatória constituída por
 379 células mononucleares, células epitelioides e fibroblastos caracterizando o granuloma
 380 (Fig. 4B). Os animais inoculados com a cepa S2308 Δ virB10, apresentaram lesões mais
 381 severas e irreversíveis quando comparados ao animais inoculados com a cepa B19,
 382 como: desorganização do parênquima esplênico e fibrose (Fig. 4C) e no fígado,
 383 formação de granuloma e vários focos inflamatórios (Fig. 4D). Os animais, inoculados
 384 com a cepa vacinal B19, apresentaram no baço desorganização do parênquima (Fig. 4E)
 385 e focos inflamatórios constituídos de células polimorfonucleares e monucleares no
 386 fígado (Fig. 4F). As alterações observadas nos animais deste grupo estão apresentadas
 387 de forma resumida na Tabela 4.

388

389 **Tabela 4.** Alterações Histopatológicas encontradas nos camundongos eutanasiados duas
 390 semanas após o desafio com a cepa virulenta S2308 *de B. abortus*

ALTERAÇÕES OBSERVADAS		
Grupo	Baço	Fígado
PBS	Fibrose	Reação inflamatória, células monucleares, epitelióides. Presença de fibroblastos caracterizando o granuloma
B19	Desorganização do parênquima	Focos inflamatórios, células polimorfonucleares e monucleares
S2308VirB10	Desorganização do parênquima Fibrose	Formação de granuloma Focos inflamatórios

391

392

393 Os achados histopatológicos dos animais inoculados com a B19 deste estudo
394 foram semelhantes aos encontrados por Arenas-Gamboa et al. (2009) que relata lesões
395 no baço e fígado de camundongos eutanasiados três semanas pós-inoculação. Os
396 camundongos inoculados com a cepa B19 apresentaram no fígado focos inflamatórios,
397 neutrófilos e linfócitos aumentados, já no baço foi observado desorganização do
398 parênquima esplênico. Esses resultados demonstram que a cepa vacinal B19 mesmo
399 sendo efetiva em sua proteção, pode causar alterações histopatológicas em
400 camundongos.

401 Nos animais inoculados com a cepa mutante S2308*virB10* de *B. abortus* e
402 eutanasiado duas semanas pós-inoculação, não houve alteração histopatológicas no
403 baço, apenas foco inflamatório no fígado. Já o grupo inoculado com a B19 apresentaram
404 desorganização do parênquima esplênico e presença de granuloma em formação no
405 fígado. Estes resultados mostram que a cepa vacinal B19 é efetiva em sua proteção,
406 porém ela provocou lesões mais graves do que a cepa mutante S2308*virB10* de *B.*
407 *abortus*.

408 Silva et al. (2011), observou um discreto infiltrado neutrofilíco no baço e fígado
409 de camundongos BALB/c, sete dias após a infecção com a cepa de *B. ovis*. Após sete
410 dias da infecção, foi verificada a presença de microgranulomas multifocais, composto
411 por macrófagos no baço e fígado desses animais. Alterações semelhantes foram
412 encontradas nos animais eutanasiados duas semanas pós-inoculação, que foram
413 inoculados com as cepas B19, S2308 e S2308*virB10* de *B. abortus*.

414 Rólan et al. (2009), verificaram nas análises histopatológicas do baço de
415 camundongos C57BL/6, inoculados com a cepa S2308 de *B. abortus* presença de
416 microgranulomas, já nos animais inoculados com a cepa mutantes *virB*, (inserção de
417 1.232 nucleotídeos após o gene *virB1*) não teve presença de microgranulomas e não foi
418 observado alterações morfológicas no baço destes, com 21 dias pós-infecção. Esses
419 resultados diferem do presente estudo, pois animais inoculados com a cepa mutante
420 S2308*virB10*, tanto os animais inoculados como os desafiados, apresentaram
421 esplenomegalia leve e presença de lesões histopatológicas quando estes foram
422 desafiados. As lesões observadas na análise histopatológica do grupo inoculado com a
423 cepa mutante indicam que frente ao desafio com a cepa virulenta S2308 de *B. abortus*, a
424 mutante não protegeu os camundongos dos danos causados pela cepa virulenta. Lesões

425 irreversíveis, como fibrose e granuloma, foram observadas nos animais inoculados com
426 esta cepa mutante, indicando impossibilidade de recuperação tecidual pelo organismo
427 do animal. Estes resultados demonstram que a cepa mutante *S2308 Δ virB10* induz uma
428 fraca proteção, o que pode ser provavelmente evidenciada pelas lesões irreversíveis
429 causada pela cepa virulenta após o desafio.

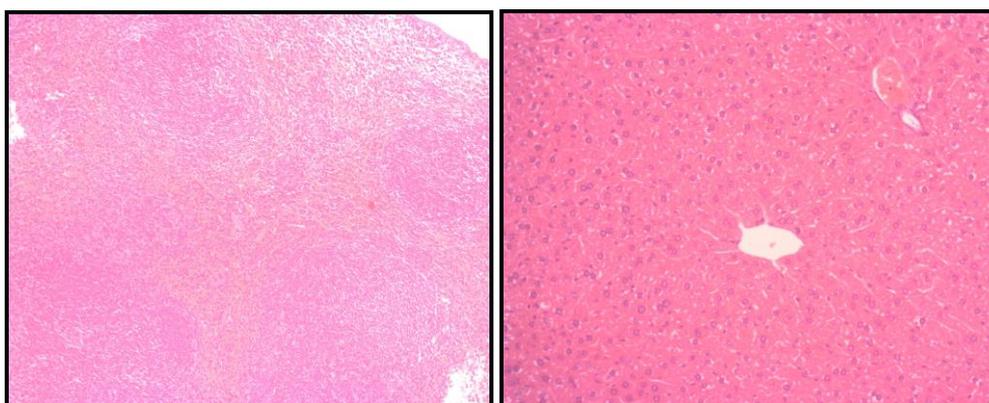
430

431

432

3A PBS

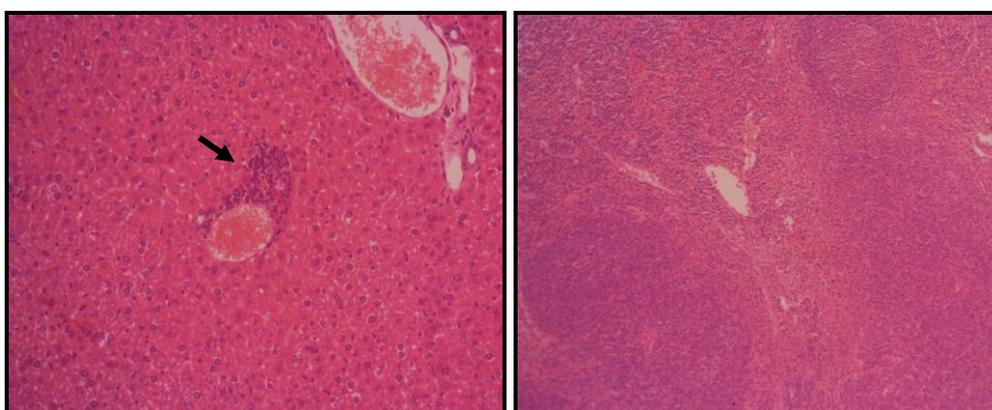
3B PBS



433

434

435

3C *S2308 Δ virB10*3D *S2308 Δ virB10*

436

437

438

439

440

441

442

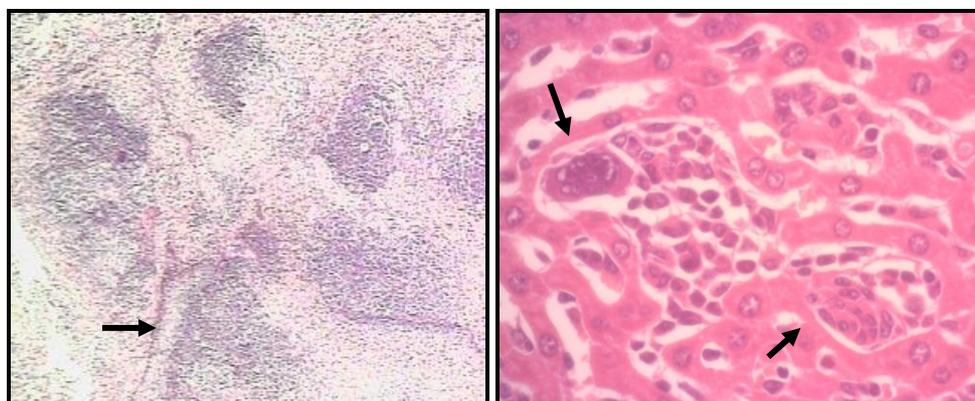
443

444

445

446

447

3E S2308 de *B. abortus*3F S2308 de *B. abortus*

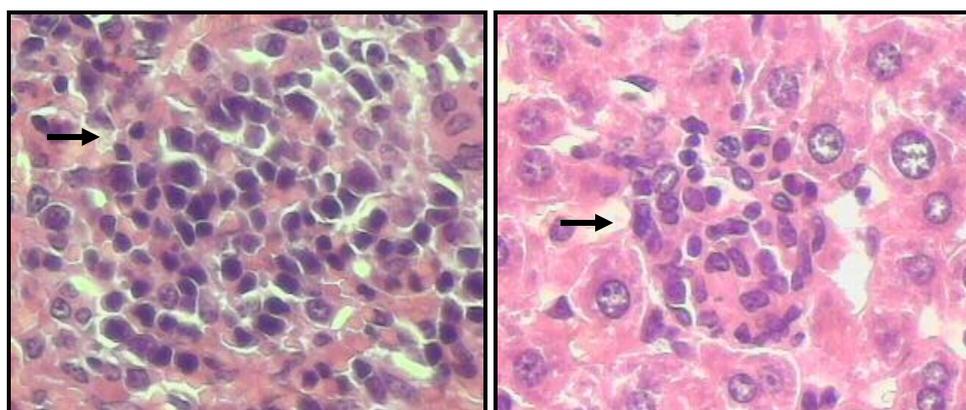
448

449

450

3G B19

3H B19



451

452 **Fig. 3.** Análise histopatológica do baço e fígado de camundongos BALB/c inoculados453 com a mutante S2308 Δ VirB10, cepa vacinal B19, cepa virulenta S2308 e PBS. (1A-

454 objetiva 10x) e (1B-objetiva 20x) baço e fígado: PBS sem alterações; (1C-objetiva 10x)

455 S2308 Δ virB10 fígado: hepatite multifocal sendo infiltrado inflamatório composto

456 predominantemente por células mononucleares; (1D-objetiva 20x) baço: sem alterações;

457 (1E-objetiva 40x) S2308, baço: desorganização do parênquima; (1F-objetiva 63x)

458 fígado: formação de granuloma; (1G-objetiva 40x) B19 baço: fusão da zona marginal

459 para a polpa vermelha e desorganização do parênquima; (1H-objetiva 40x) fígado:

460 granuloma em formação e hepatite multifocal.

461

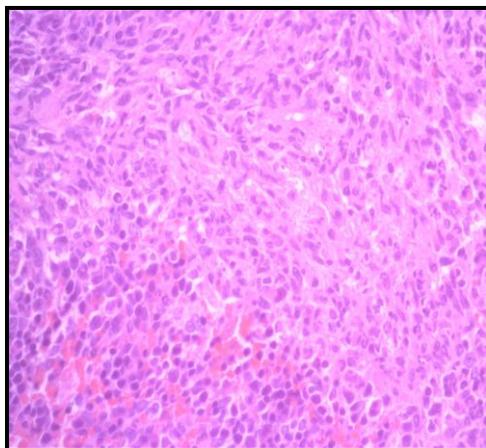
462

463

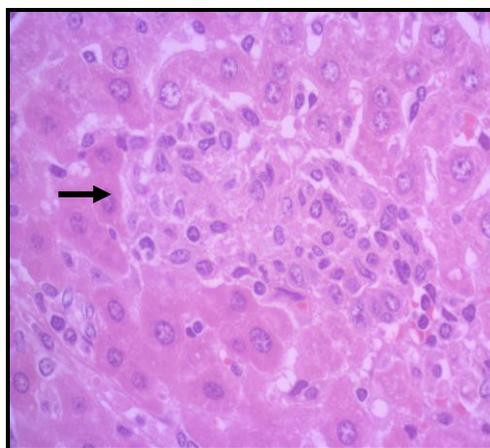
464

465

4A PBS



4B PBS

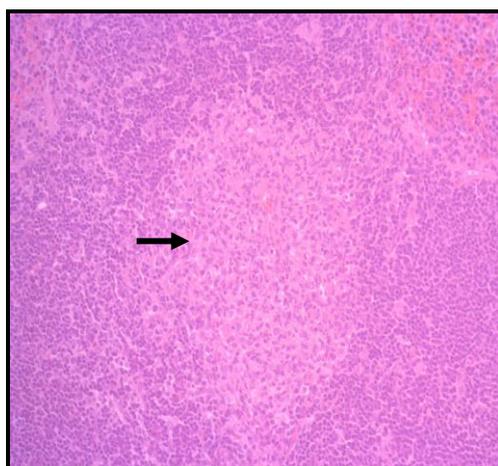


466

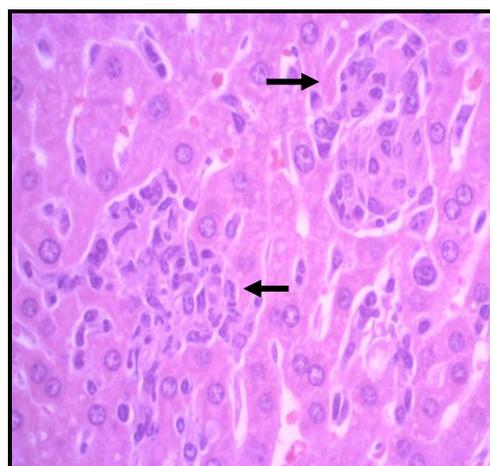
467

468

4C S2308 Δ *virB10*



4D S2308 Δ *virB10*

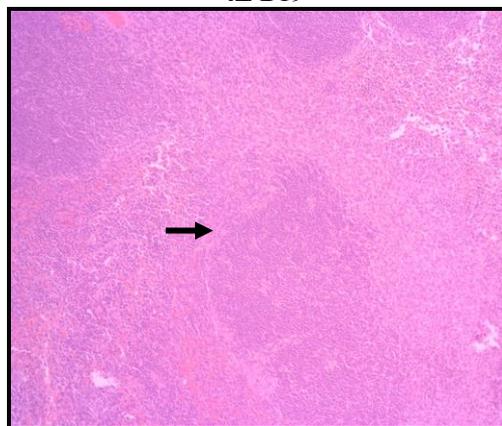


469

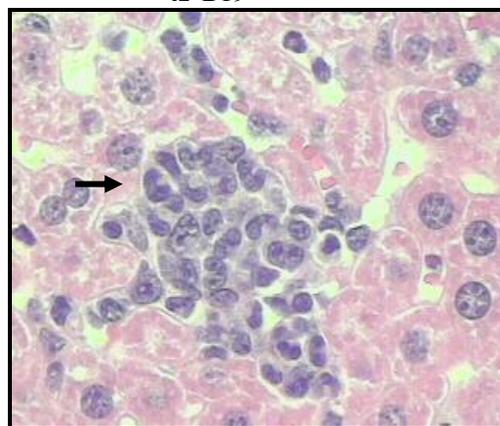
470

471

4E B19



4F B19



472

473 **Fig. 4.** Análise histopatológica do baço e do fígado de camundongos BALB/c
474 inoculados com a cepa mutante *S2308ΔVirB10* de *B. abortus*, cepa vacinal B19 de *B.*
475 *abortus* e PBS após o desafio com a cepa virulenta *S2308* de *B. abortus*. ; (2A-objetiva
476 40x) PBS, baço: fibrose; (2B-objetiva 40x) fígado: Reação inflamatória constituída por
477 células monucleares, células epitelióides e fibroblastos caracterizando o granuloma (2C-
478 objetiva 20x) *S2308ΔVirB10*, baço: desorganização do parênquima e fibrose; (2D-objetiva
479 63x) fígado: formação de granuloma e vários focos inflamatórios ; (2E-objetiva 10x) B19,
480 baço: desorganização do parênquima; (2F-objetiva 40x) fígado: focos inflamatórios
481 constituídos de células polimorfonucleares e monucleares.

482

483

484 **AGRADECIMENTOS:** À Embrapa gado de corte pelo apoio financeiro ao projeto e
485 espaço cedido para a realização do trabalho, a CAPES pela bolsa concebida, à
486 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Universidade Católica Dom Bosco.

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

Referências

- 501
- 502
- 503 Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Kahl-McDonagh MM et al (2008) Immunization with a
504 single dose of a microencapsulated *Brucella melitensis* mutant enhances protection
505 against wild-type challenge. *Infect Immun* 76:2448-2455
- 506
- 507 Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Kahl-McDonagh MM et al (2009) The *Brucella*
508 *abortus* S19 $\Delta vjbR$ live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against
509 wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle.
510 *Infect Immun* 77:877-884
- 511
- 512 Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht AC, Fan Y et al (2012) Extended safety and efficacy
513 studies of the attenuated *Brucella* vaccine candidates 16M $\Delta vjbR$ and S19 $\Delta vjbR$ in the
514 immunocompromised IRF-1^{-/-} mouse model. *Clin Vaccine Immunol* 19:249-260
- 515
- 516 Boschioli, ML., Quarani-Bettache, S, Foulongne, V, et al (2002) The *Brucella suis*
517 operon *virB* is induced intracellularly in macrophages *PNAS*. 7: 248-254
- 518
- 519 Brasil (2006) Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da
520 brucelose e tuberculose- PNCEBT Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
521 Brasília 190
- 522
- 523 Carmichael LE (1990) *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR (eds) *Animal*
524 *Brucellosis*, CRC Press. Inc., pp 335-350
- 525
- 526 Celli J, De Chastellier C, Franchini DM et al (2003) *Brucella* Evades Macrophage
527 Killing via VirB-dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum.
528 *Journal Exp Med* 198:545-556
- 529
- 530 Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R et al (2001) Essential role of the VirB
531 machinery in the maturation of the *Brucella abortus* containing vacuole. *Cell Microbiol*
532 3:159-68
- 533

- 534 Corbel MJ (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3:213-221
535
- 536 Corbel MJ, Morgan WJB (1984) Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173AL. In:
537 Holt JG. (ed) *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, Baltimore (MD), Williams
538 and Wilkins, pp 377-388
539
- 540 Den Hartigh AB, Rolán HG, Jong MF et al (2008) VirB3 to VirB6 and VirB8 to
541 VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the
542 reticuloendothelial system. *J Bacteriol* 190:4427-4436
543
- 544 Den Hartigh AB, Sun YH, Sondervan D et al (2004) Differential requirements for
545 virB1 and virB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 72:5143-5149
546
- 547 Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Rice-Ficht AC (2009) Brucellosis: the case for live,
548 attenuated vaccines. *Vaccine* 5:3-40
549
- 550 Franco MP, Mulder M, Gilman RH et al (2007) Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*
551 7:775-786
552
- 553 Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C (2010) Diagnosis of Brucellosis in Livestock and
554 Wildlife. *Croat Med J* 51:296-305
555
- 556 Gorvel JP, Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular
557 replication. *Vet Microbiol* 90:281-297
558
- 559 Grilló MJ, Manterola L, de Miguel MJ et al (2006) Increases of efficacy as vaccine
560 against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent
561 smooth bvrS/bvrR and rough wbkA mutants. *Vaccine* 24:2910-2916
562
- 563 Hong PC, Tsolis RM, Ficht TA (2000) Identification of genes required for chronic
564 persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 68:4102-4107
565
- 566 Kohler S, Porte F, Jubier-Maurin V et al (2005) The intramacrophagic environment of
567 *Brucella suis* and bacterial response. *Vet Microbiol* 8:60-66

- 568
569 McDonagh, M.M. and Ficht, T.A.; 2006. Evaluation of protection afforded by *Brucella*
570 *abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of
571 clearance in BALB/c mice. *Infect Immun* 74:4048-4057
572
- 573 Nicoletti P, Winter AJ (1990) The immune response to *Brucella abortus* – the cell-
574 mediated response to infection. In: Nielsen K, Duncan JR *Animal Brucellosis*, Boca
575 Raton: CRC Press, pp 83-96.
576
- 577 Palomares-Resendiz E, Arellano-Reyonoso B, Hernández-Castro R et al (2012)
578 Immunogenic response of *Brucella canis virB10* and *virB11* mutants in a murine
579 model. *Front Cell Infect Microbiol* 2:1-5
580
- 581 Rolan HG, Tsolis RM (2008) Inactivation of the Type IV Secretion System Reduces
582 the Th1 Polarization of the Immune Response to *Brucella abortus*
583 Infection. *Infect. Immun.* 76 , 3207-3213
584
- 585 Rolán HG, Xavier MN, Santos RL et al (2009) Natural antibody contributes to host
586 defense against an attenuated *Brucella abortus virB* mutant. *Infect Immun* 77:3004-3013
587
- 588 Sieira R, Comerci DJ, Sánchez DO et al (2000) A homologue of an operon required for
589 DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and
590 intracellular multiplication. *J Bacteriol.* 182:4849-4855
591
- 592 Silva TMA, Paixão TA, Costa EA et al (2011) Putative ATP-Binding Cassette
593 Transporter is Essential for *Brucella ovis* Pathogenesis in Mice. *Infect Immun* 79:1706-
594 1717
595
- 596 Souza FG, Osório ALAR, Gsordas BG et al (2009) Desenvolvimento e avaliação de
597 uma cepa *Knockout* de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene *virB10*. *Pesq. Vet.*
598 *Bras.* 11:943-950
599
- 600 Stevens MG, Olsen SC, Pugh JW et al (1994) Immune and pathologic responses in mice
601 infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or S2308. *Infect Immun* 62:3206-3212

602

603 Tobias L, Cordes DO, Schurig GG (1993) Placental pathology of the pregnant mouse
604 inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. *Vet Pathol* 30:119-129

605

606 Trant CG, Lacerda TL, Carvalho NB et al (2010) The *Brucella abortus*
607 Phosphoglycerate Kinase Mutant Is Highly Attenuated and Induces Protection Superior
608 to That of Vaccine Strain 19 in Immunocompromised and Immunocompetent Mice.
609 *Infect Immun* 78:2283-2291

610

611 WHO. 1997. The Development of New/Improved Brucellosis vaccines: Report of WHO
612 Meeting. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.14.](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.14.pdf)
613 [pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.14.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2014

614

615