

Fernando Padilla Poester

T686-089 69

P 745e

2006



EFICÁCIA DA VACINA RB51 EM NOVILHAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia.

Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2006

414320

P745e Poester, Fernando Padilla, 1945-

Eficácia da vacina RB51 em novilhas / Fernando Padilla Poester. -2006.
52 p. :il.

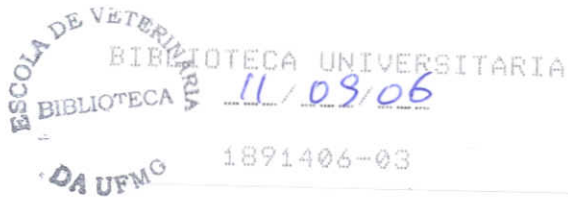
Orientador: Andrey Pereira Lage

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária

Inclui bibliografia


1. Novilho – Doenças – Teses. 2. Brucelose em bovino – Vacinação -
Teses. 3. Brucelose em bovino – Controle – Teses. 4. Aborto nos animais –
Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692 6



Tese defendida e aprovada em 26 de maio de 2006, pela Comissão Examinadora constituída por:





Prof. Andrey Pereira Lage
Orientador



Prof. Ernst Eckehardt Müller



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Prof. José Soares Ferreira Neto



Prof. Vitor Salvador Picão Gonçalves

Aos meus pais (in memoriam),
minha esposa Regina e meus
filhos André e Daniela

AGRADECIMENTOS

À Shering-Plough Coopers do Brasil Ltda. pelo financiamento do projeto.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pelo apoio ao projeto.

Ao Dr. Vitor Salvador Picão Gonçalves por seu empenho e interesse na aprovação do projeto.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo financiamento parcial do projeto.

Ao Prof. Marc Henry e equipe e em especial à Dra. Ana Cláudia Cottorello pela assistência com a inseminação artificial dos animais.

Ao Prof. Renato Lima Santos e Dra. Tatiane Alves da Paixão pela assistência nas necropsias.

Ao Dr. Paulo M.S. Filho, Dra. Eliane Waranabe, Dra. Isabella B.F. Ferraz, Dra. Ana Paula R. Stynen, Dra. Karina L. Miranda pela assistência técnica no laboratório.

Ao Dr. Pedro M.P.C. Mota e Dr. Thomás A. Porfírio pelo apoio técnico.

Aos Drs. R.M.H. Leite, G.P. Hermann, L.B. Lopes, T.M.Alves, P.A Konrad, C.A.G.Pelegriño, C.A.S Bispo, C.P.T.Brito, P. Rios, A.M.Campos, J.V.Nobre e a todo o grupo de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG pelo apoio e assistência nas diversas etapas do projeto.

Ao pessoal de campo e de laboratório do Lanagro/MG pela ajuda e assistência nas diversas etapas do projeto.

Ao meu orientador, Dr. Andrey Pereira Lage um agradecimento especial pelo tempo a mim dedicado, pelo incentivo e estímulo.

À minha esposa Regina, a quem dedico este trabalho, pelo suporte, apoio e companheirismo durante toda uma vida.

“Um especialista é aquele que num campo específico do conhecimento já cometeu todos os erros”.
Niels Bohr

SUMÁRIO

RESUMO	9
SUMMARY	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. Breve Histórico	10
2.2. Epidemiologia da Brucelose no Brasil	12
2.3. Características Gerais do Gênero <i>Brucella</i>	12
2.4. Características Específicas da <i>Brucella abortus</i>	13
2.5. Características Genéticas da <i>Brucella</i> sp	15
2.6. Patogênese da <i>Brucella abortus</i>	16
2.7. Fatores de Virulência	17
2.7.1. Lipopolissacarídeo (LPS)	17
2.7.2. Proteínas de Membrana Externa (OMPs)	18
2.7.3. Proteínas de Choque Térmico (HSP)	19
2.7.4. Sistema Regulatório de Dois Componentes (BvrR/S)	19
2.7.5. Sistema Secretório Tipo IV	19
2.7.6. Genes Dependentes de Fase Estacionária (<i>hfq</i>)	20
2.7.7. Sistema Regulatório ligado à percepção de <i>quorum</i> (QS)	20
2.7.8. Outros fatores de virulência	20
2.8. A Vida Intracelular da <i>Brucella</i> sp	21
2.9. A Resposta Imune da <i>Brucella abortus</i>	22
2.9.1. Imunidade Celular	22
2.9.2. Imunidade Humoral	24
2.10. Prevenção e Controle da Brucelose Bovina	25
2.10.1. Testes de Eficácia em Vacinas Contra Brucelose Bovina	25
2.10.2. Vacina com <i>Brucella abortus</i> amostra B19	27
2.10.3. Vacina com <i>Brucella abortus</i> amostra 45/20	29
2.10.4. Vacina com <i>Brucella abortus</i> amostra RB51	29
2.10.5. Outras vacinas contra a Brucelose	30
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Local	31
4.2. Animais e Grupos Experimentais	31
4.3. Vacinas e Vacinações	31
4.4. Manejo Reprodutivo	31
4.5. Desafio	32
4.6. Sorologia	32
4.7. Abortos, Partos e Necropsias	33
4.8. Bacteriologia	33
4.9. Análise Estatística	34
5. RESULTADOS	34
5.1. Controle das Vacinas	34
5.2. Testes Sorológicos	34
5.3. Análise dos abortos e Isolamentos	35
5.4. Análise Estatística	36
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resposta sorológica dos animais vacinados contra a brucelose com a vacina RB51 e controles após o desafio com <i>B.abortus</i> 2308	34
Tabela 2- Resumo dos isolamentos de <i>B. abortus</i> de vacas e fetos positivos à bacteriologia nos grupos vacinado contra a brucelose com a vacina RB51 e controle após o desafio com <i>B.abortus</i> 2308	35
Tabela 3- Número de vacas que abortaram e que pariram por grupo experimental após o desafio com <i>B.abortus</i> 2308	36
Tabela 4- Isolamento de <i>B. abortus</i> de vacas, após aborto ou parto, e fetos abortados/bezerras, após desafio com <i>B.abortus</i> 2308	36
Tabela 5 - Fração de prevenção e risco relativo de abortos, infecção das vacas e infecção dos fetos nos animais não vacinados versus grupo de animais vacinados com RB51	36

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação da eficácia da vacina RB51 em novilhas, visando utilizá-la como uma estratégia adicional no controle da brucelose bovina no Brasil. Trinta e três fêmeas bovinas com aproximadamente 24 meses de idade foram divididas em dois grupos. Um grupo (n=20) recebeu a vacina RB51 e o outro grupo (n=13) foi usado como controle não vacinado. Os animais do grupo vacinado com RB51 foram divididos em dois sub-grupos. Um sub-grupo (n=12) foi vacinado subcutaneamente com $1,5 \times 10^{10}$ UFC no dia 0 do experimento e o outro sub-grupo (n=8) foi vacinado com $1,6 \times 10^{10}$ UFC aos 60 dias de gestação (dia 260 do experimento). Todos os animais foram desafiados entre seis e sete meses de gestação com $3,0 \times 10^7$ UFC da amostra 2308 de *B. abortus* por via conjuntival. A vacinação com RB51 não resultou na produção de anticorpos detectáveis pelos testes sorológicos de rotina, antígeno acidificado tamponado e 2-mercaptoetanol. O grupo vacinado apresentou uma taxa de incidência acumulada de abortos de 25%, no grupo controle esta taxa foi de 62%. Após o sacrifício dos animais, *B. abortus* amostra RB51 não foi isolada em nenhum material e não houve aborto em nenhum animal vacinado aos 60 dias de gestação. Os resultados indicaram que a vacinação com RB51 previniu 59,4% dos abortos, 58,6% da infecção das vacas e 61,0% da infecção dos fetos. O risco relativo revelou que os animais não vacinados apresentaram 2,5 vezes mais risco de abortarem que os animais vacinados (IC 95% 1,029-5,889).

Palavras-chave: *Brucella abortus* RB51, vacinação, bovinos, novilhas

SUMMARY

With the goal of providing an additional tool for controlling bovine brucellosis in Brazil and evaluating the full calf dose in adult cattle, the efficacy of the rough *Brucella abortus* strain RB51 vaccine was tested in heifers. Thirty-three females of approximately 24 months of age were divided in two groups: one group (n=20) received the RB51 vaccine and the other group (n=13) were used as non-vaccinated control. Animals in the vaccinated group were split in two sub-groups. One sub-group (n=12) was vaccinated subcutaneously with $1,5 \times 10^{10}$ colony forming units (CFU) of RB51 at day 0 of the experiment and the other sub-group (n=8) was vaccinated subcutaneously with $1,6 \times 10^{10}$ CFU of RB51 at 60 days of gestation (day 260 of the experiment). All cattle were challenged between 6 and 7 months of pregnancy with 3×10^8 CFU of the virulent strain 2308 of *B. abortus* by the conjunctival route. Vaccination with RB51 vaccine did not result in the production of any antibodies against the O-side chain of lipopolysaccharide, as measured by conventional serological tests (rose bengal plate agglutination test, standard tube agglutination test, and 2-mercaptoethanol test). A cumulative incidence of 25% of abortions was found in the vaccinated group, whereas in the control group the cumulative incidence was 62%. *B. abortus* RB51 was not isolated from any sample, and no abortions were produced by RB51 vaccination of females at 60 days of pregnancy. The results indicate that vaccination with RB51 prevented 59.4% of abortions, 58.6% of cow infections, and 61.0% of fetal infections. The relative risk revealed that non-vaccinated animals have 2.462 (95% CI - 1.029 to 5.889) times higher risk of aborting than RB51-vaccinated animals.

Keywords: *Brucella abortus* RB51, vaccination, heifers, cattle

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma importante zoonose bacteriana que se encontra disseminada por muitos países, sendo o seu agente etiológico constituído por cocobacilos Gram-negativo pertencentes ao gênero *Brucella* (Young, 1995).

A brucelose nos animais causa abortos, redução da taxa de fertilidade, nascimento de crias fracas, presença de higomas, orquite, epididimite e no homem caracteriza-se por ser uma doença debilitante e prolongada (Nicoletti, 1990).

A epidemiologia da brucelose é bastante complexa e alguns fatores que contribuem para a sua disseminação incluem diferentes sistemas e práticas criatórias, baixa atenção sanitária, grande movimentação e intenso intercâmbio de animais (Omer et al., 2000). Além disso, o quadro pode complicar-se devido a possíveis reservatórios representados por animais silvestres, os quais podem ajudar a manter e a disseminar o agente da doença (Godfroid, 2002).

A transmissão de animais para o homem ocorre seja por contato direto com animais infectados, seja indiretamente pelo consumo de produtos de origem animal não processados (Acha e Szyfres, 1986).

Controlar a brucelose animal reveste-se da maior importância, pois além de prevenir a doença na espécie humana e de diminuir as perdas econômicas ao setor primário, contribui decisivamente para eliminar barreiras ao comércio internacional de produtos de origem animal. Sendo uma antropozoonose, a brucelose humana é, na grande maioria dos casos, originada a partir de focos da doença provenientes de animais infectados, logo a sua eliminação é uma responsabilidade eminentemente restrita às atividades da medicina veterinária (Nicoletti, 1990).

O controle da brucelose envolve a aplicação de medidas higiênicas e preventivas. Existem boas vacinas disponíveis no

mercado para a sua prevenção. Em virtude da *Brucella* sp. ser um parasita intracelular facultativo, as vacinas elaboradas com amostras vivas são mais efetivas, de menor custo e apresentam imunidade mais duradoura que as vacinas inativadas, sendo por isso as mais empregadas na imunização maciça de bovinos e bubalinos. Entre elas, a vacina B19 e, mais recentemente, a RB51 têm sido usadas com maior êxito em programas de controle da brucelose (Schurig et al., 2002).

O presente trabalho teve como objetivos: 1) avaliar o efeito protetor da vacina RB51 em novilhas não previamente imunizadas; 2) avaliar o efeito abortivo da RB51 em fêmeas com 60 dias de gestação; 3) avaliar a indução da resposta sorológica em fêmeas vacinadas com RB51.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Breve Histórico

De acordo com Pacheco e Melo (1956), a história da brucelose é marcada por três etapas distintas: a primeira desde Hipócrates, a segunda começa com Bruce e Bang e a terceira, de Alice Evans até hoje. Poder-se-ia acrescentar uma quarta etapa advinda do período pós-genômico.

Segundo relatos, Hipócrates (460 A.C.), referia a existência, no verão e no outono, de febres de tipo contínuo, mas não violentas, atacando pessoas que ficavam indispostas durante muito tempo, porém sem gravidade (Pacheco e Melo, 1956).

Durante o antigo Império Romano, o leite de pequenos ruminantes como ovelhas e cabras era muito usado na elaboração de queijos, um dos principais ingredientes da cozinha romana (Godfroid et al., 2005). Capasso (2002) encontrou lesões típicas de brucelose em ossos de esqueletos remanescentes de pessoas mortas durante a erupção do vulcão Vesúvio, ocorrida no ano de 79 D.C. em Herculano, Itália. Nesta mesma publicação, a análise realizada por microscopia eletrônica num

fragmento de queijo carbonizado, comprovou a presença de formas bacterianas com aspecto cocóide, morfológicamente consistentes com *Brucella* sp.

A maioria dos autores está de acordo que foi Marston, um médico da marinha inglesa em Malta, quem, em 1859, teria primeiro descrito com detalhes a brucelose como uma doença autônoma, pois ele próprio padeceu da enfermidade (León, 1993). Até então, a sua etiologia não era conhecida, sendo atribuída à emanções da matéria orgânica em decomposição, putrefação interna do organismo, efeitos do frio, etc.

Alguns anos mais tarde, o médico britânico David Bruce, liderando uma comissão de especialistas enviados à ilha de Malta, isolou o agente etiológico da "Febre de Malta" do baço de soldados que morreram desta enfermidade (Bruce, 1887). Esta bactéria foi denominada "*Micrococcus melitensis*", devido ao seu reduzido tamanho e em homenagem ao antigo nome romano da ilha (Melita = mel).

Cerca de dez anos após a descoberta de Bruce, dois veterinários dinamarqueses, Bang e Stribolt, identificaram o agente etiológico do aborto infeccioso bovino, isolando de fetos e anexos fetais procedentes de vacas que abortaram, uma bactéria que denominaram "*Bacillus abortus*". Em homenagem ao seu descobridor, a enfermidade chamou-se "Doença de Bang" (León, 1992). Esta descoberta ficou restrita ao interesse apenas de veterinários e fazendeiros, pois até então aparentemente não havia correlação entre a "Doença de Bang" e a "Febre de Malta".

Vinte e um anos mais tarde, em 1918, a microbiologista americana Alice Evans, relatou que havia um estreito relacionamento entre o *Bacillus abortus* e o *Micrococcus melitensis*. A partir de então, a bactéria de Bruce foi confirmada como sendo um coco-bacilo e a pesquisadora sugeriu pela primeira vez um novo nome para a "Febre de Malta", chamando-a de "Brucelose" em homenagem ao seu

descobridor (Hall, 1989). Em 1920, Meyer e Shaw, rejeitando a sugestão de Evans que incluía as novas bactérias no gênero *Bacterium*, propuseram inserí-las num novo gênero chamado *Brucella*, o qual se mantém até hoje (Meyer, 1990).

Em 1914, Traum isolou, a partir de fetos abortados de suínos, uma bactéria que, a princípio, foi confundida com a que provocava abortos em bovinos. Posteriormente, ficou comprovado que se distinguia daquela por algumas propriedades culturais, bioquímicas e antigênicas e por isto foi incluída no gênero como *Brucella suis* (Pacheco e Melo, 1956).

Foi somente em 1953 que uma nova espécie foi acrescentada ao gênero. Buddle e Boyes (1953), na Austrália, e Simmons e Hall (1953), na Nova Zelândia, descreveram quase simultaneamente uma nova espécie de *Brucella*, isolada de carneiros portadores de epididimite. A princípio houve certa confusão pelo caráter rugoso das colônias desta bactéria. Posteriormente foi incluída no gênero com o nome de *Brucella ovis*. Poucos anos depois, Stoenner e Lackman (1957) isolaram outra *Brucella* de um rato do deserto do oeste dos Estados Unidos da América (*Neotoma lepida*) que se chamou *Brucella neotomae*.

Em 1967, Carmichael e Bruner (1968) descreveram outra espécie de *Brucella*, responsável por abortos e distúrbios reprodutivos na espécie canina, recebendo a denominação de *Brucella canis*.

Mais recentemente, novas amostras de *Brucella* foram isoladas de mamíferos marinhos. Ross et al. (1994), na Escócia, e Ewalt et al. (1994), nos Estados Unidos da América, isolaram respectivamente de focas e golfinhos amostras de bactérias que, segundo estudos biomoleculares, apresentam características suficientes para serem incluídas como duas novas espécies (Clockaert et al., 2001). Embora não exista consenso a respeito da denominação definitiva destas bactérias, alguns autores sugerem, com base no polimorfismo do locus *omp2* do seu DNA, os nomes de *Brucella cetaceae* e *Brucella pinnipediae*

para os isolamentos realizados respectivamente de cetáceos (baleias e golfinhos) e de pinípedes (focas) (Clockaert et al., 2001).

2.2. Epidemiologia da brucelose no Brasil

Embora escassos, os poucos trabalhos disponíveis sobre a presença e distribuição da brucelose no Brasil indicam que as doenças provocadas por *B. abortus* e *B. canis* estão distribuídas em todo o território nacional, que as espécies *B. suis* e *B. ovis* estão mais localizadas na Região Sul e que a *B. melitensis* nunca foi identificada no país (Poester et al., 2002).

Um levantamento nacional realizado em 1975 demonstrou que a brucelose bovina estava disseminada, revelando que era mais alta em algumas regiões como na Sudeste (7,5%) e Cento-Oeste (6,8%) e menor na Sul (4,0%) e Norte (4,1%) e relativamente baixa na Nordeste (2,5%) (Anselmo e Pavez, 1977).

Dados oficiais sobre notificação da brucelose bovina no Brasil, coletados no período entre 1988 e 1998, indicam que a prevalência média de animais soropositivos oscilou entre 4% e 5% (Brasil, 2001). Estes valores, no entanto, por serem estatisticamente pouco consistentes, devem ser considerados apenas como uma estimativa da enfermidade no país.

A partir de 2002, em função do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou um projeto para estudos da prevalência e fatores de risco da brucelose bovina em todo o país. Estes estudos já foram concluídos em 14 estados, estando programado para breve levantamentos em alguns estados do norte (Acre e Pará) e nordeste (Maranhão). Os resultados até agora levantados e compilados pelo MAPA¹ revelaram uma

¹ LOBO, J.R.. Comunicação pessoal, 2005. (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Departamento de Saúde Animal, Divisão de Brucelose e

prevalência extremamente baixa em Santa Catarina (0,06% de animais positivos e 0,02% de propriedades positivas). No Paraná, a prevalência de animais positivos foi baixa no sul (0,34%), porém alta no oeste (14,7%). A prevalência de animais positivos no estado de Minas Gerais foi estimada em 1,09% com 6,04% de focos. Esta prevalência baixa é creditada à implantação de um programa de vacinação obrigatória e progressiva iniciado em 1992, o qual culminou com a cobertura total do estado em 1998². No Rio Grande do Sul, onde a vacinação também é praticada desde longa data, os resultados foram baixos com 1,01% de animais positivos e 2,17% de focos. Em São Paulo, os resultados apresentaram 3,81% de animais positivos e 9,7% de focos. No Espírito Santo, 3,53% de animais e 9,0% de focos. No Distrito Federal, 0,14% de animais e 2,79% de focos. Na Bahia, 1,34% de animais e 4,3% de focos. No Rio de Janeiro, 4,1% de animais e 15,48% de focos. Em Sergipe, 2,14% de animais e 11,24% de focos. Em Goiás, 3,01% de animais e 16,2% de focos. Em Tocantins, 5,27% de animais e 20,99% de focos. Em Rondônia, 6,22% de animais e 34,57% de focos. O estado de Mato Grosso, com 10,25% de animais e 41,19% de focos foi o que apresentou maior prevalência dentre os estudados, donde se conclui, preliminarmente, que a brucelose pode estar mais disseminada na região Centro-Oeste do Brasil, região que concentra o maior número de bovinos no país, principalmente com vocação para produção de carne.

2.3. Características gerais do gênero *Brucella*

O gênero *Brucella* está composto por seis espécies: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, sendo que as três primeiras estão sub-divididas em diversas biovariedades. Apresentam como

Tuberculose, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo A, 70043-900, Brasília, DF.

² PORTO, T.B. Comunicação pessoal, 2005. (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Instituto Mineiro Agropecuário, Belo Horizonte, MG)

hospedeiros principais, respectivamente, pequenos ruminantes, bovinos, suínos, caninos, ovinos e roedores podendo, as quatro primeiras, infectar o homem (Alton et al., 1988). Este quadro, no entanto, não está completo pois amostras isoladas de mamíferos marinhos tendem a aumentar o número de componentes do gênero, bem como o seu espectro como zoonose (Corbel, 1997). Embora Verger (1985), baseado em estudos de hibridização DNA-DNA, tenha proposto que todas as espécies de *Brucella* devam ser agrupadas como biovariedades de uma única espécie, a *Brucella melitensis*, a classificação tradicional em espécies relacionadas a seus diferentes hospedeiros e patogenicidades tem sido mantida (Clockaert et al., 2001; Moreno et al., 2002).

As bactérias que compõem o gênero *Brucella* são coco-bacilos, Gram-negativo, intracelulares facultativos, com capacidade de multiplicar dentro dos macrófagos, medindo 0,5 a 0,7 μm de largura por 0,5 a 1,5 μm de comprimento, podendo aparecer em formas isoladas, aos pares ou em pequenas cadeias; não formam esporos nem cápsulas verdadeiras e são invariavelmente imóveis e aflageladas (Corbel e Brinley-Morgan, 1984). São aeróbias e não crescem em condições de anaerobiose estrita, mas muitas amostras, especialmente algumas biovariedades de *B. abortus* e *B. ovis*, exigem a suplementação de CO_2 para crescimento. Seu metabolismo é oxidativo e a energia é produzida pela utilização de vários substratos de aminoácidos e carboidratos. Para algumas espécies, o *D*-eritritol é a fonte preferida de energia. A maioria das espécies exige, para isolamento primário, meios de cultura complexos, contendo diversos aminoácidos, tiamina, biotina, nicotinamida e ácido pantotênico. A produção de H_2S , a partir de aminoácidos contendo enxofre varia bastante entre as espécies e biovariedades, sendo de grande valor para a sua diferenciação na rotina. A atividade proteolítica não é uma característica saliente, e a produção de urease é consistentemente alta em *B. suis* e *B. canis*, variável nas outras espécies e fraca ou negativa na *B. ovis*. Não há produção de

ácido a partir da glicose e o *o*-nitrofenol- β -D-galactosídeo não é usualmente hidrolizado. O crescimento ocorre entre 20°C e 40°C, sendo 37°C a temperatura ótima. O pH ótimo de crescimento é entre 6,6 e 7,4. As amostras de *Brucella* são relativamente resistentes ao dessecação e podem sobreviver no ambiente, em materiais biológicos por longos períodos, especialmente se mantidas em temperaturas baixas. São sensíveis a um grande número de desinfetantes incluindo formaldeído, hipoclorito, iodoforos e fenóis, desde que não estejam presentes grandes quantidades de material orgânico. *Brucella* sp é morta pelo calor e pela pasteurização. A sensibilidade a antibióticos é variável, mas a maioria das espécies são sensíveis, *in vitro*, ao cloranfenicol, à gentamicina, às tetraciclina e às ansamicinas (Corbel e Brinley-Morgan, 1984). Nenhuma espécie fermenta a lactose, logo não crescem em ágar MacConkey, são indol, catalase e oxidase positivo, citrato negativo e com exceção da *B. ovis* e algumas amostras de *B. abortus* são urease positivo (Alton et al., 1988).

As diferenças entre os componentes protéicos das espécies, ou mesmo de amostras ou biovariedades, podem ser demonstradas empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a composição antigênica entre as várias espécies e biovariedades (epitopos A e M) tem sido comprovada como sendo muito semelhante entre elas, embora a sua caracterização necessite da aplicação de técnicas nucleares de ressonância magnética de alta resolução (Meikle et al., 1989).

2.4. Características específicas da *Brucella abortus*

A *B. abortus* infecta um grande número de bovinos e pessoas ao redor do mundo, ocasionando perdas econômicas importantes ao setor primário, bem como sofrimento à espécie humana (Young, 1995).

Está classificada em sete biovariedades e pode ser diferenciada das outras espécies

do gênero por uma combinação de testes como sensibilidade a corantes (fuccina básica e a tionina), requerimento de CO₂, produção de H₂S, presença de antígenos de superfície (A ou M), tipagem com bacteriófago e alguns poucos laboratórios especializados fazem ainda a diferenciação entre as biovariedades usando testes de metabolismo oxidativo com substratos de carboidratos e aminoácidos selecionados (Alton et al., 1988) ou técnicas moleculares como PCR (Bricker e Halling, 1994; Bricker, 2002) e HOOF-print (Bricker et al., 2003).

A imunistoquímica tem sido usada como técnica auxiliar em estudos de patogenia e diagnóstico da brucelose por sua versatilidade e praticidade. Possui a vantagem de não necessitar que a bactéria esteja viável nos tecidos, bastando que ao material preparado para histopatologia seja adicionado um anticorpo específico com um determinado marcador (Santos et al., 1998).

Técnicas de amplificação de ácidos nucléicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm-se popularizado nos últimos anos na identificação da *Brucella* sp, especialmente quando usadas a partir de materiais como abortos, sangue, secreções nasais e sêmen (Bricker, 2002). Estas técnicas têm permitido a identificação das amostras em espécies e biovariedades, bem como a determinação de genótipos que são importantes para o conhecimento mais detalhado da epidemiologia da doença (Tcherneva et al., 2000; Bricker et al., 2003). A utilização da análise de perfis de restrição em campo pulsátil (Jensen et al., 1995) e a determinação de "HOOF-Prints" (Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Prints) (Bricker et al., 2003) têm-se revelado técnicas muito promissoras, permitindo inclusive a diferenciação de amostras vacinais.

B. abortus pode também ser classificada pela morfologia colonial em lisa e rugosa, em função da presença ou ausência da cadeia O do polissacarídeo. A cadeia O do polissacarídeo de *B. abortus* lisa, foi caracterizada por Caroff et al. (1984) e está composta por resíduos de um homopolímero linear de 4,6-dideoxi-4-

formamido-alfa-D-manopiranosil, sendo mais conhecida por sua nomenclatura simplificada como perosamina.

Colônias lisas de *B. abortus* podem ser diferenciadas das rugosas pela incapacidade de aglutinarem numa solução de acriflavina a 0,1% (Braun e Bonestell, 1947), ou pela não absorção de uma solução de cristal violeta a 0,05% (White e Wilson, 1951) ou ainda por apresentarem reação positiva no teste chamado "colony blot BRU38" que utiliza um anticorpo monoclonal (BRU38) específico para cadeia O (Roop et al., 1987).

Nas amostras lisas de *B. abortus*, a cadeia O está intimamente ligada ao lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, sendo o componente da bactéria que primeiro interage com o sistema imune (Diaz et al., 1968). Baseado nesta observação, diversos testes foram desenvolvidos e a maioria das provas sorológicas usadas na rotina, têm por objetivo detectar anticorpos contra a cadeia O. No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), estabeleceu os testes do antígeno acidificado tamponado (AAT) e o teste do anel em leite (TAL) como testes de triagem e os testes do 2-mercaptoetanol (ME) e fixação do complemento (FC) como testes confirmatórios (Brasil, 2004). A combinação de testes de triagem com testes confirmatórios tem por objetivo obter o máximo de especificidade do diagnóstico. Recentemente, novos e sofisticados testes sorológicos foram desenvolvidos e validados. Entre eles, um ensaio enzimático de competição (Nielsen et al., 1995) e o teste da polarização fluorescente (Nielsen et al., 1996; Nielsen e Gall, 2001; McGiven et al., 2003) revelaram sensibilidade e especificidade mais altas quando comparados aos testes convencionais. As vantagens destas provas são a rapidez na obtenção dos resultados e a possibilidade de reagirem somente com soros de animais infectados. As desvantagens são a dificuldade atual na obtenção de reagentes, pela falta de registro de kits de diagnóstico no país, e o relativo alto investimento inicial

para a aquisição dos equipamentos (Poester et al., 2005).

A cadeia O das amostras lisas de *Brucella* sp é muito semelhante à encontrada em outras bactérias como *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter fetus*, *Moraxella* sp, *Acinetobacter* sp e *Yersinia enterocolitica* do sorotipo 0:9, resultando em reações sorológicas cruzadas, responsáveis por resultados falso-positivos nas provas sorológicas de rotina (Alton et al., 1988; Corbel, 1989). Amostras verdadeiramente rugosas de *Brucella* não contém perosamina, logo não produzem uma resposta imunológica contra a cadeia O do LPS.

2.5. Características genéticas de *Brucella* sp

A composição do DNA é muito semelhante entre as espécies de *Brucella*, apresentando entre 55 e 59 mol % de guanina mais citosina, muito parecida ao observado para *Escherichia coli* e todas as amostras das várias espécies de *Brucella* apresentam homologia de DNA acima de 94% (Hoyer e McCulloch, 1968). Conforme os resultados obtidos pela técnica de eletroforese de campo pulsado, o genoma de *Brucella* sp apresenta $2,5 \times 10^6$ pares de bases, bem menor que o de *E. coli* (Allardet-Servent et al., 1988). Trabalhos de hibridização DNA-DNA, falharam em mostrar uma diferenciação entre as espécies de *Brucella*, mas a análise eletroforética realizada com enzimas de restrição mostrou uma interessante diferenciação entre elas, a qual tem sido usada para a caracterização e biotipagem de amostras (Vergier et al., 1985; Grimont et al., 1992). Com base em estudos sobre a sequência 16S do rRNA, o gênero *Brucella* foi classificado como membro da sub-divisão alfa-2 da classe *Protobacteria* que inclui *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhodobacter* e *Rizobium* (Moreno et al., 1990). O estudo completo do genoma da *B. melitensis*, da *B. suis* e da *B. abortus*, consideradas as espécies de *Brucella* mais importantes do ponto de vista da patogenicidade, já foi concluído e publicado (DelVecchio et al., 2002; Pausen et al., 2002; Halling et al., 2005), permitindo reunir um grande número de informações que têm

contribuído para melhorar o entendimento dos mecanismos de patogenicidade destas bactérias (Ko e Splitter, 2003).

Diferentemente do que acontece com outras bactérias do grupo, como o *Agrobacterium* sp por exemplo, a patogenicidade da *Brucella* sp não é regulada por plasmídeos e diversas tentativas em detectar DNA extracromossomal em *Brucella* têm falhado, embora seja possível, em condições experimentais, infectar *B. abortus* com plasmídeo derivado de *E. coli* e assim transferir resistência a antibióticos (Corbel, 1987).

As espécies de *Brucella* apresentam dois cromossomos circulares contendo 2,1 Mbp e 1,15 Mbp respectivamente, com pequenas variações em algumas biovariedades, sendo a *B. suis* biovariedade 3 a única exceção, apresentando apenas um cromossomo circular de 3.3 Mb (Michaux-Charachon et al., 1997).

As primeiras observações sobre variações genéticas em amostras de *Brucella* datam do início do século passado e se concentraram na análise de mutações espontâneas, mais especificamente no caráter fenotípico das colônias bacterianas, estabilidade, metabolismo e virulência destas alterações que culminaram com a seleção e utilização destas amostras no preparo de vacinas. As mais importantes foram a amostra B19 de *B. abortus* e a amostra Rev 1 de *B. melitensis*, que ainda hoje são usadas em muitos países como vacinas de eleição no controle da brucelose bovina e caprina e, mais recentemente, a amostra RB51 de *B. abortus* empregada sozinha ou associada à B19 (Schurig et al., 2002).

A morfologia lisa ou rugosa está diretamente relacionada à maior ou menor virulência das amostras, pois mutantes rugosas são menos virulentas e não estimulam a produção de anticorpos contra a cadeia O nos hospedeiros (Moryián et al., 2004).

Todas as amostras de *Brucella* sp contém, em ambos cromossomos, de 8 a 35 cópias de uma sequência de inserção chamada

IS711 (também conhecida como IS6501) (Halling, 1997). Sequências de inserção (IS) são segmentos discretos de DNA que podem migrar de um local a outro dentro do genoma, estando associados ao polimorfismo da bactéria e por isso são usados na diferenciação entre amostras de *Brucella* (Ouahrani et al., 1993; Bricker e Halling, 1994).

2.6. Patogênese da *B.abortus*

B. abortus tem nos bovinos o seu hospedeiro preferencial e a manifestação clínica nesta espécie caracteriza-se por abortos nas fêmeas e orquites ou epididimites nos machos, podendo eventualmente provocar a doença no homem (Acha e Szyfres, 1986). Uma característica comum da *Brucella* sp é que todas as espécies produzem infecção persistente do sistema reticuloendotelial nas espécies acometidas, inclusive no homem.

A transmissão de pessoa a pessoa não é comum e a maioria dos autores a considera insignificante do ponto de vista epidemiológico (Godfroid et al., 2005). Além dos bovinos e do homem, *B. abortus* também pode causar infecção em outras espécies animais como suínos, cervídeos silvestres, bubalinos e bisões (Nicoletti, 1990).

Brucella sp. é um parasita intracelular facultativo e a infecção que ela ocasiona em seus hospedeiros depende do número e da virulência das bactérias infectantes, assim como da resistência do hospedeiro determinada pelos mecanismos de imunidade inata e adquirida (Thoen et al., 1993).

Tem sido observado que aproximadamente 18% de bovinos de raças mestiças são naturalmente resistentes à brucelose (Templeton e Adams, 1990). Pesquisas realizadas em bovinos, indicam que dois ou mais genes controlam os fenótipos resistentes e pelo menos um gene, o *Nramp1* (Natural Resistance Associated Macrophage Protein1), parece desempenhar um papel importante na resistência à brucelose, tendo sido já

clonado e sequenciado (Adams e Templeton, 1995; Feng et al., 1996).

B. abortus penetra em seus hospedeiros principalmente pela mucosa oral, nasofaringe, conjuntivas, pequenos cortes ou abrasões da pele ou ainda pelo aparelho genital, sendo posteriormente encontrada no interior das células do sistema reticuloendotelial como macrófagos/monócitos, quando é transportada ao linfonodo regional. O insucesso do hospedeiro em destruir o agente nos linfonodos, contribui para a disseminação da bactéria por via sanguínea e linfática, podendo permanecer nos linfonodos, causando infecção crônica (Enright, 1990).

Os bovinos apresentam uma placenta do tipo cotiledonária e as unidades placentárias, chamadas placentomas, estão restritas às áreas onde o alantocóron se relaciona com as carúnculas, formando os cotilédones, com as vilosidades coriônicas penetrando nas criptas carunculares (Santos e Marques Júnior, 1996).

Havendo prenhez, a bactéria localiza-se inicialmente no interior dos trofoblastos eritrofagocíticos do placentoma, difundindo-se a seguir, levando estas células à necrose, vasculite, com separação da placenta fetal da materna e ulceração da membrana córioalantóidea, com a bactéria e as células inflamatórias presentes no lume do útero (Anderson et al., 1986a).

A localização de *Brucella* sp no trato reprodutivo de fêmeas e machos tem sido atribuída ao tropismo desta bactéria por tecidos com alta concentração de eritritol. Estudos que comprovam a presença deste açúcar nos tecidos dos órgãos reprodutivos dos ruminantes, sugerem ser esta a razão da preferência de *Brucella* sp pela colonização destes tecidos (Smith et al., 1962; Smith e Fitzgeorge, 1964).

Tem sido comprovado que o eritritol estimula o crescimento de algumas amostras de *Brucella* sp. No entanto, outras amostras, incluindo a amostra B19, são inibidas por este açúcar, apesar de serem

capazes de causar infecção genital e abortos. Por outro lado, animais de laboratório como roedores apresentam a bactéria na placenta e aborto apesar de não apresentarem níveis detectáveis de eritritol em seus tecidos (Enright, 1990).

Estudos que utilizam técnicas imunoistoquímicas comprovam a preferência da *B. abortus* pelo retículo endoplasmático rugoso das células trofoblásticas do epitélio coriônico da placenta (Meador e Deyoe, 1989). São células metabolicamente ativas, logo capazes de produzir uma grande variedade de hormônios e proteínas que estimulam o crescimento da bactéria (Enright, 1990).

Os mecanismos pelos quais *B. abortus* provoca o aborto nos estágios finais da gestação ainda não estão completamente elucidados. À medida que a gestação avança, aumenta a probabilidade de infecção do hospedeiro. Isto pode estar relacionado com fatores endógenos, responsáveis pela maior susceptibilidade dos trofoblastos no final da gestação (180 a 240 dias), uma vez que no início da gestação (60 a 120 dias), estas células praticamente não permitem a multiplicação intracelular da bactéria (Samartino e Enright, 1993).

Nos ruminantes, a manutenção da prenhez e o início do parto são dependentes da produção de progesterona pelo corpo lúteo, produzida na primeira metade da gestação. No entanto, durante a segunda metade da gestação, a progesterona é produzida também pelo feto. Logo, doenças como a brucelose que afetam a placenta e o feto durante a segunda metade da gestação, podem resultar em abortos ou nascimentos prematuros (Thoen et al, 1993). Durante a infecção por *B. abortus*, no final da gestação, há uma alteração no equilíbrio hormonal com substituição da progesterona pelo estrogênio, com produção de prostaglandina, a qual pode ser responsável pela indução de um parto prematuro (Enright, 1990). A colonização, especialmente dos tecidos dos órgãos genitais das fêmeas e dos machos, conduz à principal fonte de eliminação da bactéria,

seja pelo sêmen, placenta, descargas uterinas e fetos abortados (Nicoletti, 1989).

2.7. Fatores de virulência

Os fatores associados à virulência da *Brucella* sp ainda não estão completamente elucidados. Embora importantes avanços tenham ocorrido nos últimos anos, os fatores que determinam a capacidade desta bactéria de invadir as membranas mucosas, penetrar e resistir à destruição nos fagócitos, multiplicando-se dentro destas células, ainda carecem de um melhor entendimento (Ko e Splitter, 2003).

Novas e modernas técnicas que permitem a manipulação do genoma bacteriano, muito têm contribuído para esclarecer aspectos genéticos e bioquímicos ligados à interação parasita-hospedeiro. Muitos fatores de virulência, identificados e caracterizados em outras bactérias intracelulares, revelaram-se pouco significativos em *Brucella* sp, sugerindo uma relação única entre esta bactéria e seus hospedeiros.

A descoberta e o conhecimento de alguns fatores de virulência, tem sido fruto de incessantes pesquisas na busca por mutantes atenuados visando introduzi-los na composição de novas e melhores vacinas.

2.7.1. Lipopolissacarídeo (LPS)

A estrutura do LPS da parede celular tem sido um dos componentes mais estudados em *Brucella* sp. Nas amostras lisas está composto por três domínios: o lipídeo A, que contém dois tipos de aminoglicosés e diversos ácidos graxos; um núcleo (core) contendo glicose, manose, quinovosamina e o ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico (KDO); unidos a uma cadeia O composta por um homopolímero com aproximadamente 100 resíduos de 4-formamido-4,6-dideoximanose (perosamina) com ligações predominantemente α -1,2 em amostras com epitopos A dominantes ou ligações α -1,3 a cada cinco resíduos em amostras M dominantes (Corbel, 1997). Nas amostras rugosas, a estrutura é similar,

exceto pela ausência ou redução no tamanho da cadeia O, sendo a sua especificidade, neste caso, determinada pelos oligossacarídeos do núcleo (Moryión, 2004).

Amostras com morfologia colonial lisa, ou seja, com a superfície composta do LPS contendo a cadeia O, são mais virulentas que amostras rugosas, sem a cadeia O (Roop et al., 1991), embora amostras naturalmente rugosas como a *B. ovis* e a *B. canis* sejam patogênicas para seus hospedeiros preferenciais (Alton et al., 1988).

A invasão das células do hospedeiro por *Brucella* sp está diretamente relacionada à integridade da cadeia O do LPS da sua parede celular, o que confere maior imunogenicidade às amostras lisas quando comparadas com amostras rugosas. Tem sido demonstrado que as amostras lisas são mais resistentes a substâncias bactericidas produzidas por fagócitos capazes de matar bactérias intracelulares (Moreno et al, 1981). Desta forma, a sobrevivência de *B. abortus* no interior das células depende da molécula da cadeia O estar intacta, o que lhe confere a virulência (Gorvel e Moreno, 2002).

Em outras bactérias Gram-negativo, a cadeia O funciona como uma barreira protetora contra agentes hidrofóbicos, contra a lise mediada por complemento, estando envolvida também na resistência bacteriana aos grânulos microbicidas dos leucócitos polimorfonucleares, logo diretamente relacionada com virulência (Godfroid et al., 1998)

Mutantes atenuados de *Brucella* sp. obtidos por mutagênese (transposon Tn5), revelaram que a cadeia O é essencial para a sobrevivência intra e extracelular da bactéria em camundongos e interrupções em genes que codificam enzimas como a fosfomanomutase (*pmm*), a perosamina sintetase (*rfbE*) ou a glicosiltransferase (*wboA*), sugerem que estas enzimas são requeridas para síntese completa da cadeia O (Allen et al., 1998; Godfroid et al., 1998; McQuinston et al., 1999).

Tem sido demonstrado que o LPS desempenha uma atividade imunomoduladora importante. Não sendo totalmente degradado no citosol, o LPS é transportado para a superfície do macrófago, onde forma um complexo de macrodomínios com moléculas do MHC de classe II (Forestier et al., 1999). Segundo Gorvel e Moreno (2002), este complexo (MHC classe II – LPS) poderia interferir com a capacidade do macrófago em apresentar o antígeno no contexto MHC de classe II, diminuindo a capacidade da célula infectada de ativar células T CD₄, importantes componentes da imunidade celular. Uma recente pesquisa identificou uma interação do LPS com macrodomínios lipídicos, ricos em colesterol na superfície dos macrófagos (lipid rafts), o qual facilita a entrada da bactéria nos macrófagos por um trajeto que evita a fusão do fagossoma com o lisossoma (Porte et al., 2003).

2.7.2. Proteínas de Membrana Externa (OMPs)

A caracterização detalhada dos fatores de virulência das proteínas de membrana externa (OMPs) tem sido prejudicada pela interferência do LPS em pesquisas de migração destas proteínas em técnicas como eletroforese em gel de poliacrilamida e também pela dificuldade de se encontrar mutantes com níveis alterados na expressão destas proteínas. Em função disto, a importância destas proteínas na sobrevivência e virulência da *Brucella* sp não tem ultrapassado o terreno das hipóteses (Bae, 1999).

As OMPs em *Brucella* sp foram identificadas no início dos anos 1980 e caracterizadas inicialmente como antígenos potencialmente imunogênicos. Estas proteínas foram classificadas de acordo com o peso molecular em proteínas do grupo 2 ou porinas de 36-38 kDa, cujos produtos são codificados por dois genes denominados *omp2a* e *omp2b* e do grupo 3 que engloba proteínas de 25-27kDa, codificadas pelo gene *omp25* e proteínas de 31-34 kDa codificadas pelo gene *omp31* (Clockaert et al., 2002).

De um modo geral, as OMPs parecem ter menor relevância como antígenos protetores ou mesmo para uso em sorodiagnóstico frente a amostras lisas de *Brucella* sp, por estarem menos acessíveis ao sistema imune, devido à presença da longa cadeia O do LPS da parede celular (Cloekaert et al., 2002). No entanto, proteínas do grupo 3, especialmente a Omp31, revelou ser um antígeno imunodominante frente à infecção por *B. ovis*, portanto com potencial para uso em diagnóstico (Vizcaíno et al., 2001) e quando associada à lumazine sintetase mostrou ser protetora, podendo transformar-se num imunógeno promissor como vacina de sub-unidades, tanto para amostras lisas como para rugosas (Cassataro et al., 2005).

Em função da diversidade de marcadores específicos e por serem altamente conservadas, a identificação das OMPs em técnicas como a PCR-RFLP tem auxiliado na classificação de espécies, biovariedades e amostras de *Brucella* sp, incluindo possivelmente as amostras isoladas de mamíferos marinhos como duas possíveis espécies independentes (Cloekaert et al., 2001).

2.7.3. Proteínas de Choque Térmico (HSP)

Sendo conhecidas também como chaperoninas, seu estudo tem evoluído desde a simples curiosidade científica até seu possível uso na terapia do câncer. Desempenham um papel importante na adaptação das bactérias no interior dos fagossomas, por exemplo, quando submetidas a situações de estresse como altas temperaturas, pH ácido e deficiência de nutrientes (Black, 2000).

Bactérias patogênicas respondem a condições ambientais adversas através da ativação de genes específicos que produzem proteínas com a finalidade de protegê-las. As proteínas de choque térmico (HSP) ou de estresse mais estudadas pertencem às famílias HSP60 e HSP70 onde se destacam a superóxido dismutase (SOD), Kat, HtrA, RecA, DnaK/DnaJ, GrpE e ClpA/ClpB (Köhler, 2002). Embora seja consenso entre os pesquisadores de que o papel destas proteínas como fatores de

virulência seja apenas marginal, elas parecem ser importantes auxiliando e corrigindo outros fatores de virulência excretados pelas células (Köhler, 2002).

2.7.4. Sistema Regulatório de Dois Componentes (BvrR/S)

Um operon detectado em *Brucella* sp, denominado *bvrRS* ("*Brucella* virulence related"), codifica um sistema regulatório de dois componentes (BvrR e BvrS), cujos produtos finais, uma histidina quinase e uma proteína reguladora, controlam os genes envolvidos na manutenção da integridade do envelope bacteriano (Sola-Landa et al., 1998). Mutantes *bvrRS* apresentam deficiências em proteínas de membrana externa do grupo Omp3a (Omp25) e Omp3b, demonstrando acentuada sensibilidade a peptídeos antimicrobianos catiônicos. Deste modo, o sistema regula a composição de ácidos graxos do lipídeo A do LPS, o qual interage com receptores do tipo TOLL do macrófago. Mutantes deste sistema são internalizados pelos macrófagos e células epiteliais e prontamente destruídos no interior dos fagolisossomas destas células (López-Goñi et al., 2002).

A falta destes genes faz com que esses mutantes sejam menos invasivos que a *B. abortus* 2308, tanto em macrófagos como em células HeLa, portanto com dificuldade para atingirem o sítio replicativo (Roop et al., 2004). Em contraste com amostras virulentas, mutantes *bvrRS* estudadas em fagócitos não profissionais, foram incapazes de usar pequenas moléculas de GTPase da sub-família Rho, necessárias para a polimerização da actina e penetração na célula do hospedeiro e subsequente sobrevivência intracelular (Guzmán-Verri et al., 2001).

2.7.5. Sistema Secretório tipo IV

Microorganismos patogênicos que invadem e se multiplicam dentro de células especializadas de seus hospedeiros, desenvolveram mecanismos evolutivos que permitem modificar os processos biológicos naturais destas células, através da secreção

de moléculas que subvertem a sua biologia celular em seu próprio benefício (Cascales e Christie, 2003).

Assim como em trofoblastos de ruminantes, a multiplicação intracelular de *B. abortus* também ocorre no interior de cisternas do retículo endoplasmático rugoso de células Vero e este mecanismo de parasitismo intracelular é único em *Brucella* sp no qual a bactéria parece ter desenvolvido atributos específicos de virulência (Detilleux et al., 1990).

Um operon chamado *virB* composto por 12 ORFs, homólogo ao locus *virB* do *Agrobacterium tumefaciens* e *ptI* da *Bordetella pertussis*, responsável por codificar um sistema secretório tipo IV, foi identificado em *Brucella* sp (O'Callaghan et al., 1999; Siera et al., 2000). Bactérias mutantes neste sistema, perdem a capacidade de multiplicar em macrófagos e células epiteliais, bem como são incapazes de produzir infecção em camundongos (Hong et al., 2000). Como bactérias do gênero *Brucella* não apresentam plasmídeos naturais, conclui-se que as proteínas codificadas (*VirB* 1-12), estão envolvidas no processo secretório de fatores de virulência e não em conjugação. Um possível papel deste sistema é o de "injetar" moléculas efectoras nas células do hospedeiro por meio de estruturas semelhantes a "pili" que passam pela membrana interna, espaço periplásmico e membrana externa, permitindo à bactéria encontrar um sítio seguro de replicação na célula hospedeira (Burns, 2003; Gauthier et al., 2003). A identificação completa destas moléculas ainda não foi obtida, mas tem sido comprovado que a bactéria necessita destas moléculas por um limitado período durante o processo de infecção, provavelmente sinalizado pela acidificação do fagossoma, e quando se inicia a replicação, o sistema é então desativado (Boschiroli et al., 2002). Evidências experimentais indicam que a expressão do operon *virB* é essencial nos processos que envolvem a maturação do vacúolo que contém a *Brucella* (BCV), o qual forma um compartimento envolto por estruturas multimembranosas semelhantes ao retículo

endoplasmático, necessário à replicação da bactéria, pois mutantes isogênicas *virB* são encaminhadas ao fagolisossoma onde são degradadas (Celli et al., 2003).

2.7.6. Genes dependentes de fase estacionária (*hfq*)

Durante a transição da fase de crescimento logarítmico para a fase estacionária, algumas bactérias patogênicas adquirem resistência a várias alterações ambientais de estresse como pH ácido, reativos intermediários de oxigênio (ROI) e escassez nutricional. Foi identificado em *Brucella* sp, que o gene *hfq* é responsável por codificar uma proteína ligada ao RNA (chaperonina) chamada HF-1 (host factor-1), importante na manutenção da fase estacionária e conseqüentemente na resistência a fatores ambientais adversos (Roop et al., 2002). O HF-1 é necessário para a expressão do operon *cydAB* na *B. abortus* 2308, o qual codifica a enzima citocromo bd oxidase, importante contra radicais oxidantes e mutantes neste gene são extremamente atenuados (Roop et al., 2003).

2.7.7. Sistema Regulatório ligado à percepção de *quorum* (QS)

Este sistema regulatório também ligado à virulência, é um sistema sinalizador e foi denominado "Quorum-Sensing Signal". Está envolvido na expressão gênica em resposta ao aumento de densidade da bactéria após multiplicação no fagossoma. Esta sinalização realizada bactéria a bactéria, é obtida pela liberação de pequenas moléculas ou ferormônio, caracterizado por HPLC e espectrometria de massa como uma *N*-dodecanoil-homoserina lactona (Taminiau et al., 2002). Com a multiplicação bacteriana, há um acúmulo deste ferormônio até que uma determinada concentração é atingida, indicando que um *quorum* foi alcançado. Neste ponto, o ferormônio ativa um regulador transcripcional que reprime determinados genes, entre eles o operon *virB*, controlando assim este fator de virulência (Letesson et al., 2002). Estas observações concluem que há uma estreita ligação entre QS e o sistema secretório tipo IV (Taminiau et al., 2002).

2.7.8. Outros fatores de virulência

Amostras de *Brucella* sp produzem um sideróforo, o ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA), em resposta a uma limitação de ferro em presença de eritríto. Embora mutantes no gene *dhbc* tenham mostrado que este sideróforo não é importante para a replicação da amostra 2308 em macrófagos murinos, nem para o estabelecimento da infecção em camundongos BALB/c, este gene mostrou-se, no entanto, essencial para a manutenção da virulência de amostras 2308 em ruminantes prenhes (Bellaire et al., 2003). Roop et al. (2004) comentam que a *B. abortus* tem a capacidade de produzir outro sideróforo mais complexo, chamado brucebactina em resposta à limitação de ferro e que futuros trabalhos com mutantes poderão ampliar as informações a respeito das funções destes dois sideróforos na virulência da *Brucella* sp.

O glicano cíclico β (1,2) é um polissacarídeo periplasmático encontrado em patógenos de plantas e também em *Brucella* sp. É produzido por uma sintetase e codificado pelo gene *cgs*, mutantes neste gene mostraram reduzida virulência em camundongos e replicação deficiente em células HeLa (Briones et al., 2001).

2.8. A vida intracelular da *Brucella* sp

Após a invasão das mucosas, as células fagocitárias do sistema imune, localizadas na submucosa, ingerem a bactéria invasora num processo clássico de fagocitose, principal componente da imunidade inata. As células mais especializadas nesta função, os neutrófilos e os macrófagos, desempenham um papel preponderante no relacionamento hospedeiro-parasita. Outras células como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais são também importantes, embora menos eficientes, sendo por isto chamadas fagócitos não profissionais. Entre as células epiteliais, destacam-se as células trofoblásticas da placenta, cujo processo inflamatório culmina com o aborto, geralmente no terço final da gestação (Enright, 1990).

Estudos realizados sobre a biologia dos fagócitos e das células não fagocíticas infectadas com *Brucella* sp, indicam invariavelmente que após a entrada nestas células, a bactéria reside em compartimentos acidificados que se fundem com componentes do trajeto endossômico nascente (early endosomal pathway) (Pizarro-Cerdá et al., 1998). Durante as primeiras horas após a invasão (1 a 5h), não há multiplicação bacteriana, pois o sistema imune consegue conter a bactéria, mas após este breve período e dependendo do tipo de célula, a taxa de replicação se mantém constante (Celli et al., 2003). A acidificação das células do hospedeiro parece ser essencial para a ativação de genes de virulência do sistema secretório tipo IV, demonstrado pela aquisição ou pela ausência de marcadores específicos de lisossoma como a LAMP-1 (Lysosome Associated Membrane Protein 1) e a hidrolase catepsina D (Boschiroli et al., 2002; Celli et al., 2003). Estas observações confirmam estudos anteriores, nos quais amostras virulentas de *Brucella* sp inibem a fusão do fagossoma com o lisossoma (Frenchick et al., 1985). Estudos genéticos e bioquímicos mostraram que a *Brucella* sp é exposta ao mecanismo de explosão respiratória logo após a sua entrada no fagócito, especialmente quando opsonizada por imunoglobulinas ou quando o macrófago está ativado por INF- γ . No entanto, a progressão do vacúolo com a bactéria (BCV) ao invés de fundir-se com o lisossoma para formar o fagolisossoma, é redirecionado para um compartimento chamado fagossoma replicativo (Gorvel e Moreno, 2002). Este compartimento, por ser único em *Brucella*, tem sido chamado de "brucelossoma", e apresenta propriedades semelhantes ao retículo endoplasmático (Arenas et al., 2000). A composição da membrana deste compartimento sugere que o fagossoma nascente é originado pela contínua interação do BCV com o retículo endoplasmático e sabe-se que este é um processo natural, inerente à célula, necessário para a formação do autofagossoma, onde produtos de

degradação celular são reciclados para a síntese de novos componentes (Dorn et al., 2002). Amostras patogênicas de *Brucella* sp poderiam usar este processo como forma de escape dos mecanismos de defesa, chegando rapidamente ao sítio replicativo, evitando assim a formação do fagolisossoma que decretaria a sua inativação (Köhler et al., 2002). Ao contrário do que ocorre nos macrófagos, a *B. abortus* não replica dentro dos neutrófilos (Gorvel e Moreno, 2002).

As células trofoblásticas da placenta representam outro importante tipo de célula envolvida na patogênese da brucelose. Estão localizadas na interface da circulação materno-fetal e especialmente nos estágios finais da gestação, a *Brucella* sp multiplica-se intensamente nestas células (Anderson et al., 1986a). Estudos sobre a patogênese da *B. abortus* em células trofoblásticas revelaram que a bactéria também replica em compartimentos associados ao retículo endoplasmático, semelhante ao que ocorre nos macrófagos (Anderson et al., 1986b). No entanto, antes de atingirem seu sítio replicativo, uma importante diferença existe na biogênese intracelular de *B. abortus*. Nas células epiteliais, depois de evitar a fusão do fagossoma com o lisossoma, a bactéria localiza-se em compartimentos multimembranosos compatíveis com o autofagossoma, enquanto nos macrófagos, mantém uma interação íntima com o retículo endoplasmático (Celli et al., 2003). Apesar desta diferença, o vacúolo infectado pela bactéria acaba por fundir-se com as cisternas do retículo endoplasmático, transformando-se no sítio eletivo para a sua multiplicação. Independentemente se for em macrófago ou em célula epitelial, a GTPase Sar1 do grupo COPII de proteínas parece ser o alvo a ser alcançado pela *Brucella* sp nestas organelas (Celli et al., 2005). A maioria dos pesquisadores conclui que trabalhos mais detalhados sobre a trajetória da *Brucella* sp nos trofoblastos se fazem necessários, assim como um melhor relacionamento deste processo em relação à presença abundante de eritritol nos estágios finais da gestação.

2.9. A resposta imune da *Brucella abortus*

2.9.1. Imunidade celular

Microrganismos invasores são controlados pelos dois braços do sistema imune: imunidade inata e adaptativa. A imunidade adaptativa é mediada por linfócitos B e T que reconhecem patógenos por meio de receptores de alta afinidade. No entanto, o estabelecimento da imunidade adaptativa é lento porque depende da ativação de genes, da síntese de proteínas e da proliferação destas células. A imunidade inata proporciona mecanismos de defesa mais rápidos, pois reconhecem patógenos invasores por meio de receptores específicos, denominados receptores do tipo "TOLL" localizados na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs). A ligação do patógeno a estes receptores induz à produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias com regulação de moléculas co-estimuladoras que desencadeiam a imunidade adaptativa (Werling e Jungi, 2003).

A infecção por *B. abortus* é fundamentalmente associada a célula e envolve inicialmente ações não específicas, seguidas da ativação de células T antígeno específicas (CD4⁺ e CD8⁺). Células infectadas precisam matar a bactéria ou então ser mortas de tal maneira que a bactéria seja acessada por outros mecanismos que as eliminem, como por exemplo os anticorpos (Abbas et al., 2003)

Os macrófagos são considerados as células mais importantes do sistema imune porque se encontram na interface entre a imunidade inata e adaptativa (Rosenberger e Finlay, 2003). Em contraste com outras linhagens de células, como parte da imunidade inata, macrófagos não estimulados expressam receptores únicos na sua superfície que detectam a bactéria e rapidamente disparam um conjunto de sinais gênicos que produzem citocinas que irão amplificar a resposta imune. Estas células expressam receptores fagocíticos que se ligam a carboidratos e lipídeos na superfície de microrganismos recobertos por

complemento e anticorpos. Quando o macrófago entra em contato com a bactéria, mecanismos de transdução de sinais são ativados e uma cascata de reações químicas tem lugar, envolvendo principalmente a tirosina quinase (sinalizador para INF- γ), a serina quinase (sinalizador para MAPK), ou ainda pequenas moléculas de GTPase (Rosenberger e Finlay, 2003). Estes mecanismos facilitam rearranjos no citoesqueleto celular que culminam com a condução da bactéria ao fagolisossoma degenerativo. Duas enzimas, a NADPH oxidase e a sintase induzível de óxido nítrico, são fundamentais para a atividade microbicida do macrófago. A ativação dos sistemas bactericidas O_2 -dependentes, inicia-se com a ativação da hexose-monofosfato num processo chamado explosão oxidativa. Como consequência, são gerados diversos radicais intermediários do oxigênio (ROI) como o anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^\cdot e $\cdot OH$). Além do efeito bactericida direto dos ROI, a explosão oxidativa ativa outros sistemas como a mieloperoxidase (MPO) e o óxido nítrico (NO). A mieloperoxidase, em presença de peróxido de hidrogênio, oxida íons cloro e iodo, produzindo a destruição bacteriana por halogenação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. O sistema NO interage com radicais intermediários do O_2 produzidos pela explosão oxidativa originando radicais intermediários de nitrogênio (RNI). Estes radicais possuem um elevado potencial oxidante capaz de inativar os sistemas enzimáticos das bactérias fagocitadas causando-lhes a morte (Abbas et al., 2003).

Os macrófagos destroem bactérias fagocitadas usando não só os mecanismos da explosão oxidativa, mas também a acidificação, a privação de nutrientes, enzimas lisossomais e peptídeos antimicrobianos. Os antígenos microbianos degradados, ligados a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade são expostos na superfície da célula e apresentados a outras células do sistema imune no contexto da imunidade adaptativa. A sinalização desencadeia uma cascata de complexas reações químicas que culminam

com a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear κB (NF- κB), o ativador de proteína-1 (AP-1) e o STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), que levam diversos genes a expressarem citocinas e quimiocinas (Rosenberger e Finlay, 2003). O NF- κB é um importante fator nuclear (NF) que, sendo ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene (κB), o qual codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo produzidas pelas células B (Sen e Baltimore, 1986).

Bactérias patogênicas como a *Brucella* sp, desenvolveram mecanismos evolutivos que subvertem a sinalização e seus mecanismos efetores, previnem a explosão oxidativa e evitam a fusão fagossoma-lisossoma (Rosenberger e Finlay, 2003).

Linfócitos T reconhecem peptídeos expostos na superfície dos macrófagos, complexados ao sistema MHC classe I ou II, através de receptores específicos chamados receptores de células T (TCRs). Células T $CD4^+$ reconhecem peptídeos classe II e células T $CD8^+$ interagem com complexos classe I (Golding et al., 2001).

Os linfócitos T $CD4^+$, chamados linfócitos Th (auxiliares), podem se diferenciar em Th_1 e Th_2 de acordo com as diferentes citocinas secretadas em resposta a um estímulo antigênico. Linfócitos Th_1 secretam IL-2, INF- γ , TNF- β , mas não IL-4. Já os linfócitos Th_2 , conhecidos como estimuladores da produção de anticorpos, secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, mas não INF- γ . A expansão clonal dos linfócitos Th_1 e Th_2 é regulada pelo INF- γ (produzido por Th_1 com supressão de Th_2), pela IL-4 (produzida por Th_2 com amplificação na produção de Th_2), pela IL-10 (produzida por Th_2 com supressão de Th_1) e pela IL-12 (produzida por macrófagos e linfócitos B que amplifica a produção de Th_1). O resultado do balanço entre estas duas populações celulares é que irá determinar que tipo de resposta imune irá predominar, humoral ou mediada por células (Wyckoff, 2002).

A ativação de células apresentadoras de antígeno (APCs), faz com que estas células passem a secretar IL-12 e TNF- α , importantes citocinas com papel decisivo tanto na ativação e diferenciação de linfócitos T e B como na atração de neutrófilos e monócitos. IL-12 é a citocina funcional que estimula os linfócitos T a secretarem INF- γ , o principal ativador de macrófagos e o sucesso das bactérias intracelulares em produzirem infecção é grandemente influenciado por sua capacidade em interferir na sinalização de linfócitos T CD4⁺ (Ko e Splitter, 2003).

B. abortus tem a propriedade de estimular a secreção de IL-12 pelos macrófagos, induzindo a uma diferenciação dos linfócitos auxiliares Th₀ em células efetoras e de memória Th₁, uma característica central das vacinas elaboradas com amostras vivas de *B. abortus* (Oliveira et al., 1998; Schurig et al., 2002). Dependendo do estímulo antigênico, há também uma diferenciação dos linfócitos Th₀ em Th₂, que secretam várias citocinas, dentre elas a IL-4 que atua sobre os linfócitos B desencadeando uma resposta humoral com produção de IgG₁ e IgE. Estas imunoglobulinas, ao contrário das IgG2a, produzidas pelos linfócitos B estimulados por células Th₁, são menos eficientes contra bactérias intracelulares. (Golding et al., 2001).

Trabalhos recentes têm indicado que linfócitos T citotóxicos CD8⁺ ativados (CTL), desempenham um papel crucial na imunidade contra *Brucella* sp, pois eliminam macrófagos infectados por mecanismos de citotoxicidade pela ação de perforinas e granzimas (Wyckoff, 2002). Tem sido demonstrado que camundongos deficientes em linfócitos T CD8⁺ tiveram a infecção por *B. abortus* exacerbada e em contraposição, camundongos deficientes em CD4⁺ foram capazes de conter a infecção, ficando demonstrado que células CTL são críticas na proteção contra *B. abortus* e mais, que a bactéria pode induzir células CTL a executarem a sua atividade efetora mesmo na ausência de células CD4⁺ funcionais (Scott et al., 1998).

2.9.2. Imunidade humoral

Após a infecção por bactérias Gram-negativo, as células do sistema imunológico do hospedeiro estão expostas a diversos antígenos bacterianos e, por estar mais exposta, a cadeia O do lipopolissacarídeo da parede celular é a fração mais imunogênica. Logo é contra ela que a maioria dos anticorpos está dirigida (Corbel, 1997). Apesar de ser um carboidrato, a cadeia O das bactérias Gram-negativo é capaz de provocar uma resposta consistente de anticorpos pela ativação direta dos linfócitos B, sem necessidade da ativação dos linfócitos T (Abbas et al., 2003). A infecção pela *B. abortus* inclui a produção de imunoglobulinas dos isotipos IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA, detectáveis no soro e no leite de bovinos (Nielsen e Duncan, 1988).

Foi recentemente comprovado que a vacinação de camundongos com uma amostra de *B. abortus* RB51 que expressa cadeia O no citoplasma, portanto geneticamente modificada, induziu a produção de anticorpos predominantemente das subclasses IgG2a e IgG₃ e que a presença de altas concentrações de IgG2a e concentrações baixas ou mesmo ausentes de IgG₁, podem ser indicativos de uma resposta celular do tipo Th₁ (Vamulapalli et al., 2000).

A resposta de anticorpos à *B. abortus* nos bovinos consiste no aparecimento inicial de imunoglobulinas da classe IgM, seguida da formação de IgG₁ e posteriormente de pequenas quantidades de IgG₂ e IgA, as quais dependem da via de exposição, da dose infectante e do estado de saúde do animal (Nielsen e Duncan, 1988). A maioria das reações cruzadas, ou seja, reações que resultam da exposição a outras bactérias semelhantes à *Brucella* sp são principalmente devidas à classe IgM e portanto, testes sorológicos que medem este isotipo devem ser evitados, pois irão apresentar reações falso-positivas (Nielsen et al., 1996). Da mesma forma, animais vacinados com amostras lisas de *B. abortus* (B19), produzirão anticorpos que não poderão ser distinguidos dos anticorpos de

infecção nas provas diagnósticas de rotina e por isto a maioria dos programas de vacinação recomenda a aplicação da vacina apenas em animais pré-púberes (Nicoletti, 1990).

2.10. Prevenção e controle da brucelose bovina

A vacinação contra a brucelose bovina tem sido um componente importante nos programas de controle e erradicação desta enfermidade em muitos países e inúmeros são os exemplos em que esta prática revelou-se eficaz. Os Estados Unidos da América aplicaram medidas de controle que envolveram a vacinação e o abate de animais infectados e com isto obtiveram uma drástica redução nos casos de brucelose humana (Ragan, 2002).

A experiência tem demonstrado, no entanto, que nenhuma vacina usada contra a brucelose protege 100% dos animais e que a prática da vacinação apenas, sem medidas complementares de higiene associadas à retirada e substituição dos animais infectados, tem resultado em freqüentes insucessos (Nicoletti, 1990).

Trabalhos efetuados com amostras mortas de *Brucella* sp, revelaram de um modo geral, que este tipo de vacina se mostrou pouco eficiente em estimular uma resposta celular adequada e por isso acabaram caindo em desuso (Nicoletti e Winter, 1990).

A proteção contra a infecção por *B.abortus* envolve uma resposta celular consistente do tipo Th₁, mediada por linfócitos T auxiliares associados à produção de INF- γ (Araya et al., 1989). Além disto, células T citotóxicas CD8⁺, que também secretam INF- γ , são capazes de matar macrófagos infectados com *B. abortus* (Oliveira e Splitter, 1995). Para que ocorra uma resposta sólida e duradoura, é indispensável que as vacinas sejam elaboradas com amostras vivas, atenuadas e sem possibilidade de reversão à forma patogênica, pois a bactéria necessita replicar-se no hospedeiro e ser posteriormente eliminada (Adams, 1990; Schurig et al, 2002).

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), após revisar a legislação de combate à brucelose bovina até então vigente, decidiu lançar um novo programa (Brasil, 2001). Entre as estratégias propostas, destacam-se a adesão voluntária de criadores para a formação de rebanhos livres e monitorados, testes sorológicos regulares em rebanhos de elite para ingresso em exposições e feiras, sacrifício compulsório dos animais positivos, padronização de procedimentos para veterinários habilitados mediante cursos específicos. Como atividade preponderante para baixar a prevalência da enfermidade, a vacinação compulsória de bezerras com B19 entre 3 e 8 meses de idade em todo o país é considerada crucial para o sucesso do programa. Bezerras vacinadas na idade recomendada, só poderão ser submetidas a testes sorológicos após completarem 24 meses de idade para evitar a interferência dos anticorpos vacinais. O programa também passou a vislumbrar a possibilidade do uso estratégico de vacinas não aglutinogênicas em animais adultos, não vacinados com B19 ou em animais previamente vacinados, em rebanhos com quebra da imunidade, dos quais foram retirados os animais infectados (Brasil, 2004).

2.10.1. Testes de eficácia em vacinas contra a brucelose

A potência de vacinas contra a brucelose animal pode ser avaliada usando-se três estratégias: i) teste em animais de laboratório, ii) teste em hospedeiros naturais experimentalmente desafiados e iii) teste em condições naturais (Nicoletti, 1990). Segundo Plommet (1990), o segundo método é o que apresenta respostas mais significativas. Neste caso, são comparadas as taxas de infecção e abortos em grupos de novilhas vacinadas e desafiadas por via conjuntival na metade da gestação. A dose desafio e a amostra desafiante em ensaios de vacinas têm sido motivo de controvérsias entre diferentes autores, embora a maioria concorde que devem ser escolhidas de tal forma que produzam infecção em 80-90%

dos animais usados como controles não vacinados.

Apesar disto, alguns trabalhos sobre a avaliação da vacina B19, embora com algumas diferenças em seus delineamentos, não revelaram diferenças significativas no grau de imunidade conferido pela vacina B19 e por isto merecem ser mencionados. Buddle (1948) vacinou 48 animais e concluiu que 73% estavam protegidos contra o aborto e 65% contra infecção, enquanto dos 44 animais usados como controles, 57% abortaram e 70% se infectaram. Manthei (1952) encontrou 63% de 70 animais vacinados protegidos contra a infecção e 70% protegidos contra o aborto, enquanto dos 87 animais usados como controles, 85% se infectaram e 70% abortaram. Em outro experimento, Berman et al. (1952) vacinaram 14 animais, encontrando 77% de proteção contra o aborto e 78% contra infecção e no grupo controle (n=18), 86% se infectaram e 83% abortaram. Lambert et al. (1961) vacinaram 24 animais, dos quais 79% foram protegidos contra o aborto e 67% contra infecção, enquanto no grupo controle (n=22), 68% abortaram e 90% se infectaram. Sutherland et al. (1981) vacinaram 12 animais, dos quais 67% foram protegidos contra a infecção e 86% contra o aborto, sendo que no grupo controle (n=12), 75% se infectaram e 75% abortaram. O baixo número de animais usados neste tipo de experimento é, na maioria dos casos, justificado pelo alto custo destas pesquisas, onde após o desafio, os animais necessitam permanecer por longo tempo em ambientes isolados e com proteção contra o escape da bactéria patogênica para o ambiente (nível 3 de biossegurança).

A literatura cita também inúmeros trabalhos realizados com B19 a campo. Uma interessante pesquisa foi realizada nos Estados Unidos da América empregando-se a dose padrão de B19. Nesta pesquisa, a vacina B19 foi aplicada em 18.000 bezerras provenientes de 260 rebanhos infectados com *Brucella*. O resultado foi que a vacina contribuiu para aumentar em 96% a taxa de partos quando estas fêmeas atingiram a idade adulta (Wright, 1942). Outra

observação confirma que a dose padrão de B19 empregada na vacinação das bezerras em rebanhos infectados, contribuiu para uma eliminação mais rápida da enfermidade nestes rebanhos e com uma baixa porcentagem de reagentes (Jones e Berman, 1976). Dados semelhantes foram encontrados também com a aplicação da B19 em dose reduzida, seja em animais jovens (Deyoe et al., 1979) seja em adultos (Nicoletti, 1979). Embora esta prática tenha contribuído para diminuir a prevalência da infecção por brucelose em alguns países, ela também apresentou alguns problemas como taxa relativamente elevada de abortos devido à vacinação (Corner e Alton, 1981) e queda na produção de leite (Nicoletti, 1976).

Mutantes rugosas, portanto sem cadeia O, estáveis e suficientemente atenuadas, capazes de provocar uma resposta imune duradoura e sem os inconvenientes da amostra B19 têm sido pesquisadas. Dentre estas, a que melhores resultados apresentou foi a amostra RB51. Esta amostra, praticamente isenta de cadeia O, foi obtida por passagens sucessivas da amostra 2308 de *B. abortus* em meios de cultura contendo rifampicina, originando uma mutante permanentemente rugosa (Schurig et al, 1991). Esta estratégia foi cuidadosamente monitorada visando limitar a atenuação da amostra original de tal modo que permitisse a sua colonização nos animais inoculados por algumas semanas, induzindo uma resposta celular adequada sem produzir anticorpos capazes de reagirem nas provas sorológicas. A amostra RB51 apresenta todas estas características e além disso demonstrou ser muito estável, não revertendo sua virulência mesmo após passagens em várias espécies animais (Colby, 1997; Schurig et al., 2002).

Sendo uma amostra rugosa, portanto isenta de cadeia O, a amostra RB51 previne a formação dos anticorpos que reagem nos testes sorológicos de rotina como antígeno acidificado tamponado (AAT), 2Mercaptoetanol (2ME), fixação do complemento (FC) e anel em leite (TAL). Deste modo, reações positivas a estes testes em animais vacinados com RB51

poderia indicar a ocorrência de queda na imunidade no rebanho.

Os poucos trabalhos disponíveis em bovinos, onde a vacinação com a RB51 foi comparada com a B19, concluíram que a amostra RB51 revelou efeito protetor similar à B19 contra o aborto em animais desafiados aos 180 dias de gestação (Cheville et al, 1996). Quando aplicada em animais vacinados a campo, em condições de alta e baixa prevalência, a amostra RB51 revelou uma proteção superior à conferida pela amostra 19 (Lord et al, 1998).

Elzer et al. (1998) demonstraram que a aplicação da vacina RB51 por via oral protegeu de forma similar à vacinação por via subcutânea, onde 70% das fêmeas (n=10) foram protegidas contra o aborto e 80% contra infecção, enquanto no grupo controle (n=10), 70% abortaram e 80% se infectaram. Em outro estudo, Olsen (2000a), vacinando bezerras entre 3-6 meses com RB51, verificou que a vacina protegeu 88% das vacas contra o aborto, 53% contra infecção e 88% dos fetos foram protegidos contra a amostra desafiante.

Em animais vacinados e desafiados com *B. abortus*, a proteção é medida pela diminuição significativa na incidência de abortos, com significativa diminuição na colonização de órgãos pela bactéria desafiante nos animais vacinados em comparação com os não vacinados (Elzer et al., 1998). A proteção contra o aborto indica menos perdas diretas aos criadores. Além disto, a proteção contra a infecção, indica menor risco de disseminação da bactéria a outros animais e ao homem.

2.10.2. Vacina com *Brucella abortus* amostra 19

De um modo geral, as amostras bacterianas usadas em vacinas contra a brucelose foram desenvolvidas de maneira empírica. Entre elas, a amostra B19, vem sendo utilizada em programas de vacinação contra a brucelose bovina há mais de seis décadas e, apesar de alguns inconvenientes e das inúmeras tentativas feitas para substituí-la por amostras mais eficientes, tudo indica

que pela facilidade de produção, baixo custo e bons resultados obtidos, seguirá por vários anos sendo a vacina de eleição. Foi inicialmente usada no programa oficial de vacinação contra a brucelose bovina dos Estados Unidos da América em 1941 e posteriormente teve seu uso expandido a muitos países (Nicoletti, 1990).

Esta amostra foi avaliada como vacina pela primeira vez em 1930. Um pesquisador norte-americano chamado John M. Buck, isolou em 1923 uma bactéria com características de *B. abortus* do leite de uma vaca que se tornara estéril. A cultura, originalmente virulenta, ficou esquecida no ambiente por mais de um ano e, quando testada em cobaias, revelou-se atenuada e altamente imunogênica (Graves, 1943). A patogenicidade baixa e estável, a imunogenicidade e antigenicidade relativamente altas são as principais características desta amostra, advindo daí o seu sucesso como vacina. A sua atenuação, bem como as suas características culturais e biológicas estáveis não se alteraram por inúmeras passagens em cobaias ou mesmo por passagem intravenosa em fêmeas bovinas prenhes (Mingle et al., 1941).

Uma série de experimentos sobre vacinação e proteção de fêmeas jovens com dose padrão ($2,5-12 \times 10^{10}$ UFC) da vacina B19 concluíram que aproximadamente 65-75% dos animais vacinados apresentaram proteção completa contra diversos graus de exposição a *B. abortus* virulenta e os restantes 25% a 35% dos animais vacinados, embora pudessem se infectar, muitos não apresentaram o principal sinal clínico da brucelose, ou seja o aborto (Manthei, 1959). McDiarmid (1957) em um estudo de sete anos sobre a vacinação de 500 fêmeas, observou que uma única dose padrão da vacina B19 conferiu imunidade adequada pelo menos até a quinta gestação.

Tem sido comprovado que fêmeas vacinadas com B19 são resistentes ao desafio com *B. abortus* virulenta por períodos relativamente longos, que podem variar entre sete anos (JOINT..., 1971) ou dez anos (Goode et al., 1957). Entretanto

alguns autores têm questionado este longo período de proteção conferido pela vacina B19 em bovinos³. Apesar da produção e do controle desta vacina no Brasil estarem regulamentados pelo MAPA (Brasil, 2004), testes regulares de eficácia não são realizados e não se conhecem as origens das amostras empregadas pelos diferentes laboratórios.

A vacinação de bezerras jovens com a amostra B19 tem sido recomendada em função dos animais tornarem-se negativos ao atingirem a idade de cobertura. Acima de 90% das fêmeas vacinadas entre 3 e 8 meses revelaram-se negativas dentro de 9 meses (King e Frank, 1961). Estes autores concluíram que fêmeas vacinadas aos 3 meses retornaram à negatividade 2 meses após a vacinação; fêmeas vacinadas aos 6 meses demoraram cerca de 6 meses para negativarem e quando vacinadas aos 9 meses, algumas ainda apresentaram títulos sorológicos aos 15 meses de idade. Portanto, a idade das fêmeas na idade da vacinação é um fator limitante no uso da vacina B19, pois os anticorpos provocados por ela não podem ser diferenciados dos produzidos por amostras de campo nas provas de rotina (Nielsen, 2002).

Durante a década de 1980, países como os Estados Unidos da América usaram a vacina B19 em dose reduzida contendo $3,0 - 10 \times 10^9$ UFC para a vacinação de bezerras ou $0,3 - 3 \times 10^9$ UFC para aplicação em vacas adultas, com o objetivo de minimizar os inconvenientes dos títulos residuais conferidos pela dose padrão. Esta medida, no entanto, só trouxe benefícios quando a vacina foi aplicada em condições rigorosamente controladas (Nicoletti, 1979). As vacinações de bezerras com dose reduzida ou fêmeas adultas com qualquer dose de B19 não estão contempladas no PNCEBT (Brasil, 2001, 2004)

³ SAMARTINO, L.E. Comunicação pessoal, 2003. (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Ciencias Veterinarias y Agronomicas, Instituto de Patobiología, Las Cabañas y Los Reseros, (1712) Villa Udaondo, Castelar, Argentina)

O grande inconveniente da B19, por conter uma amostra lisa, são os anticorpos por ela estimulados, difíceis de serem sorologicamente diferenciados das respostas causadas por amostras de campo. Por isto, a sua aplicação é resumida a animais sexualmente imaturos. Além disto, a amostra B19 pode provocar aborto se aplicada em vacas prenhes, cuja taxa, em condições de campo, pode chegar a 2,6% (Beckett e McDiarmid, 1985), orquite nos machos e ainda infectar o homem (Nicoletti, 1990).

A duração e magnitude dos anticorpos vacinais estão diretamente relacionadas com a idade à vacinação, dose da vacina, via de aplicação e estágio da gestação, ou ainda ao tipo de teste usado e a interpretação dos resultados (Nicoletti, 1990). Os anticorpos que sucedem a vacinação são da classe IgM, seguidos pelo aparecimento de IgG1 e com menor intensidade por IgG2 e IgA (MacMillan, 1990). Anticorpos da classe IgM persistem por mais tempo e são mais ativos nos testes de aglutinação com pH neutro e estão também presentes no leite por alguns meses, sendo quase sempre de origem sérica (Nicoletti, 1990). A rapidez com que os animais vacinados tornam-se negativos é inversamente proporcional à idade, dose da vacina e estágio de gestação no momento da vacinação (Manthei, 1952).

Apesar dos estudos envolvendo vacinas no passado terem sido realizados de forma um tanto empírica, sabe-se hoje, que tanto a resposta humoral como a celular influenciam o curso da infecção por *Brucella* sp. No entanto, a imunidade celular desempenha um papel central na eliminação das bactérias intracelulares, tornando evidente que uma vacina para ser efetiva, deve induzir principalmente mecanismos de defesa celulares (Wyckoff, 2002; Schurig et al., 2002). Por serem parasitos intracelulares facultativos, a patogenia da infecção por *Brucella* sp e a natureza da resposta imune estão intimamente relacionadas com esta característica (Cheers, 1984).

2.10.3. Vacina com *Brucella abortus* amostra 45/20

Visando eliminar o problema da persistência de títulos sorológicos, pesquisadores dedicaram-se a buscar amostras rugosas, portanto isentas de cadeia O, que pudessem substituir a B19 e assim eliminar em parte os seus problemas. Uma vacina elaborada com a amostra 45/20, rugosa, morta e preparada com adjuvante oleoso, chegou a ser usada em alguns países (Adams, 1990). No entanto, reações pós-vacinais intensas, necessidade de duas aplicações e proteção inferior à B19, fizeram com que esta vacina tivesse seu uso descontinuado (Schurig et al., 2002).

2.10.4. Vacina com *Brucella abortus* amostra RB51

Ficou comprovado por pesquisas realizadas no passado, que amostras rugosas eram capazes de induzir proteção contra *B. abortus*, sem apresentarem os graves problemas de diagnóstico inerentes às amostras lisas.

A estratégia de encontrar uma amostra mutante rugosa, estável e de tal forma atenuada que permitisse a colonização do hospedeiro, culminou com a seleção de uma amostra de *B. abortus* chamada RB51. É uma amostra não aglutinogênica, derivada da amostra 2308 de *B. abortus*, que por passagens em meio contendo concentrações sub-inibitórias de rifampicina e penicilina sofreu mutações em genes que sintetizam a cadeia-O (Schurig et al, 1991). Foi determinado que a RB51 apresenta o gene *wboA*, gene este que está envolvido na síntese da cadeia O, interrompido por um elemento de inserção IS711 (Vemulapalli et al., 1999). A complementação com um gene funcional, indicou que esta amostra apresenta uma segunda mutação afetando possivelmente o transporte da cadeia O para a superfície da bactéria ou o acoplamento dela ao núcleo do LPS, ou ambos (Vemulapalli et al., 2000). Pesquisas com anticorpos monoclonais demonstraram no entanto, que a RB51 é capaz de expressar quantidades mínimas de antígeno

O em seu LPS (Schurig et al, 1991; Cloeckaert et al., 2002).

Quando aplicada em animais jovens, a vacina RB51 localiza-se nos tecidos do sistema retículo-endotelial, sendo eliminada dos linfonodos que drenam o local da inoculação por períodos que vão desde 6 semanas (Cheville et al., 1992) até 12 a 14 semanas pós-vacinação (Olsen et al., 1999). Fêmeas vacinadas entre 3 e 7 meses ($1,0 \times 10^{10}$ UFC) e desafiadas aos 2 – 3 anos, na metade da gestação, apresentaram menores taxas de infecção e aborto quando comparadas com fêmeas não vacinadas (Cheville et al, 1996; Olsen, 2000b).

Resultados de pesquisas têm indicado que a melhor idade para a vacinação de fêmeas jovens é entre 5 e 12 meses de idade com uma dose entre $1,0 - 3,4 \times 10^{10}$ UFC e trabalhos preliminares sobre a duração da imunidade, têm indicado que uma revacinação aos 4 – 5 anos de idade pode ajudar a manter bons níveis de proteção (Olsen e Stoffregen, 2005). Animais vacinados ou revacinados com RB51, previamente vacinados ou não com B19, não reagem aos testes sorológicos de rotina e a vacinação de adultos tem sido recomendada para reforçar a imunidade de rebanho (Cheville et al., 1993; Stevens et al., 1994; Olsen et al., 1996; Poester et al. 2000). No entanto, uma pequena porcentagem de respostas humorais atípicas no Card Test e no teste do rivanol foi observada em animais revacinados com RB51, quando colocados num rebanho infectado (Leal-Hernandez et al., 2005).

Em rebanhos muito infectados, após a eliminação dos animais positivos, o uso da vacina em adultos com dose reduzida ($1,0 \times 10^9$ UFC) é uma prática segura e recomendada (Olsen, 2000a). A vacinação de animais prenhes não induziu ao aborto (Zambrano et al., 1995; Samartino et al., 2000; Uzal et al., 2000). No entanto, a aplicação da dose completa ($1,0 - 3,4 \times 10^{10}$ UFC) em novilhas, não tem sido devidamente estudada e os poucos trabalhos disponíveis, apresentam resultados contraditórios. Foi demonstrado que doses altas ($1,0 - 3,4 \times 10^{10}$ UFC),

quando aplicadas em fêmeas prenhes (entre 1 e 7 meses de prenhez), mantidos à campo e que haviam sido vacinadas com B19 entre 3-8 meses, não aumentaram as taxas de abortos (Samartino et al., 1999). Por outro lado, tem sido documentado, também sob condições de campo, que a dose completa ($1,0 - 3,4 \times 10^{10}$ UFC), quando aplicada em animais que não tiveram contato prévio com a *B. abortus*, pode provocar alguns abortos (Lopetegui, 1998; Van Metre et al., 1999).

A vacina RB51 pode infectar o homem, embora existam indicativos de que o nível de patogenicidade desta amostra seja inferior ao da B19 (Ashford et al., 2004). Há relatos também da eliminação da RB51 pelo leite e exsudato vaginal em animais adultos que foram revacinados (Leal-Hernandez et al., 2005).

Deve ser levado em conta que, a exemplo do que ocorre nos animais, os anticorpos no homem também não são detectados nas provas de rotina. Por outro lado, em caso de exposição vacinal, a rifampicina, um dos antibióticos indicados no tratamento da brucelose, não poderá ser indicada neste caso.

A maioria dos estudos sobre a proteção conferida pela RB51 tem sido realizados sob condições rigorosamente controladas seja em camundongos ou em bovinos. Estes trabalhos concluíram que os animais são efetivamente protegidos contra desafios moderados (Schurig et al, 1991; Cheville et al., 1996). Em contraposição, resultados com experimentos de campo onde os animais são submetidos a desafios altos ou moderados, parecem indicar que mais pesquisas são necessárias para uma melhor avaliação da duração e dos níveis de imunidade nestas condições (Moryión et al., 2004).

Em função dos resultados positivos de proteção apresentados pela vacina RB51 em diversos experimentos, associados ao fato de não estimular anticorpos contra a cadeia O, alguns países como os Estado Unidos, Chile e Uruguai, decidiram substituir a vacina B19 pela RB51 (Ragan, 2002;

Rivera et al, 2002; Garin et al, 2005). Outros países como o México, Paraguai, Venezuela e alguns países da América Central, a estão usando associada à B19 (Luna-Martinez, 2002; Baumgarten, 2002; Vargas, 2002; Moreno, 2002).

2.10.5. Outras vacinas contra a brucelose

Afora o uso da vacina Rev 1 de *B. melitensis*, empregada na prevenção da brucelose de caprinos e ovinos em países onde esta espécie de *Brucella* se constitui numa séria ameaça para sistema criatório e para o homem (Alton, 1990), diversos grupos de pesquisadores tem se concentrado nos últimos anos seja na tentativa de melhorar as vacinas existentes, seja na produção de novas vacinas. Estes estudos envolvem a busca de novos mutantes, especialmente por manipulações genéticas, que expressem antígenos protetores mais eficientemente que as atuais vacinas, de preferência com mínima ou nenhuma interferência no diagnóstico sorológico (He, 2000; Vemulapalli et al., 2002). Outros têm buscado novos imunógenos por meio de antígenos não replicativos, ou seja, vacinas baseadas em proteínas recombinantes ou de DNA (Kurar e Splitter, 1997; Velikovskiy, et al, 2000; Al Mariri, et al., 2002; Cassataro et al., 2005).

Vacinas deste tipo podem oferecer vantagens sobre as vacinas vivas usadas atualmente, pois seus idealizadores vislumbram a possibilidade potencial do seu uso tanto em animais como no homem. Em brucelose, no entanto, este tipo de vacina parece ser economicamente pouco viável para aplicação em larga escala em animais e, no caso humano, o custo das pesquisas é ainda muito elevado e por isso o seu desenvolvimento tem ficado a cargo basicamente de agências nacionais de defesa (Schurig et al., 2002).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a aplicação da dose completa da vacina RB51 em bovinos, tendo como objetivos específicos avaliar os seguintes parâmetros:

1) efeito protetor em fêmeas adultas não previamente imunizadas; 2) efeito abortivo em fêmeas em início de gestação e 3) indução da resposta sorológica frente a provas de rotina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O projeto foi desenvolvido na Área Experimental e no Laboratório de Brucelose do Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, Minas Gerais (Lanagro/MG) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

4.2. Animais e Grupos Experimentais

Trinta e três novilhas, mestiças holandês-zebu, com idade aproximada de 24 meses, foram alocadas em dois grupos experimentais. Os animais de cada grupo, devidamente identificados, foram mantidos em piquetes individuais de aproximadamente 1 hectare cada um, sendo alimentados durante toda a fase experimental com silagem de milho, caroço de algodão, polpa cítrica, sal mineral à vontade e água "ad libitum".

Os grupos experimentais foram constituídos como segue:

Grupo RB51 – 20 (vinte) fêmeas não vacinadas quando jovens com B19, sendo 12 (doze) vacinadas com RB51 antes da gestação e 8 (oito) vacinadas com RB51 aos 60 (sessenta) dias de gestação

Grupo controle – 13 (treze) fêmeas não vacinadas.

Durante os três meses de adaptação, todos os animais foram vacinados contra raiva, (Raivacel, Vallée) leptospirose, IBR, BVD, PI-3 e BRSV (CattleMaster, Pfizer) clostridioses (Fortress 7, Pfizer) e vermifugados em duas oportunidades (Coopermec, Coopers Brasil).

4.3. Vacinas e Vacinações

A vacina RB51 foi fornecida pela Shering-Plough Coopers e produzida pela Professional Biological Company (Denver, Colorado, USA). Foram utilizadas duas partidas diferentes, sendo que para vacinação dos animais não gestantes do grupo RB51 foi empregada a partida 1551, com validade até 20.04.2002 e a partida 1618, com validade até 31.01.2003, para vacinação dos animais gestantes deste grupo.

Antes da utilização, cada partida foi avaliada quanto à pureza, dissociação e contagem de germes viáveis de acordo com Alton et al. (1988) e Nielsen e Ewalt (2004).

No dia das vacinações, foram realizados controles do número de germes viáveis de um frasco da vacina RB51 hidratado de ambas as partidas e mantido em gelo junto com os outros frascos utilizados na vacinação.

No dia 0 do experimento (dia da vacinação), os animais não gestantes do grupo RB51 foram vacinados, por via subcutânea, com 2 mL da vacina RB51 (partida 1551) e os animais do grupo controle, assim como os oito animais do grupo RB51, a serem posteriormente vacinados quando gestantes, receberam 2 mL de salina fisiológica estéril por via subcutânea.

Nos dias 251 e 272 do experimento, dois e seis animais, respectivamente, pertencentes ao grupo RB51, todos com 60 dias de gestação, foram vacinados por via subcutânea, com 2 mL da vacina RB51 partida 1618.

4.4. Manejo Reprodutivo

Foram realizados periodicamente, por palpação ou ultrassonografia retal, exames ginecológicos dos animais para verificação da condição uterina e ovariana.

Para a obtenção do maior número possível de animais gestantes e no menor tempo possível, o cio dos animais foi sincronizado.

O protocolo hormonal utilizado consistiu na aplicação de um implante de progesterona intravaginal (CIDR – Pharmacia Animal Health) no dia 160 do experimento, de acordo com Henry et al. (2003). A retirada do implante foi nove dias depois, associada à aplicação de uma dose de 2 mL de PGF2 α (0,5 mg de cloprostenol – Ciosin – Coopers). Aos animais classificados como acíclicos no momento da retirada do implante, além da PGF2 α , foi aplicada uma dose de GnRH.

A observação visual dos sinais externos de cio começou 24 horas após a retirada do implante. Vacas androgenizadas com buçal marcador (n = 4) foram utilizadas como rufião. Os animais foram observados 24h/dia por um período de quatro dias. As inseminações artificiais foram realizadas no ato da detecção do cio e repetidas 12 horas após a primeira. As novilhas que não exteriorizaram o cio até 72 horas pós-aplicação foram submetidas ao controle da resistência da condutividade elétrica do muco cervico-vaginal. Aquelas que apresentaram baixa resistência elétrica foram imediatamente inseminadas. O diagnóstico de gestação foi realizado pelo exame de ultrassonografia 35 dias após a inseminação (dia 206 do experimento).

O sêmen utilizado na inseminação foi testado quanto motilidade total, motilidade progressiva, vigor, turbilhonamento, morfologia espermática e teste hiposmótico de acordo com Correa e Zavos (1994) e Manual... (1998). O sêmen foi ainda testado para IBR pela técnica do PCR (Rocha et al., 1998).

4.5. Desafio

A amostra utilizada no desafio foi a *Brucella abortus* 2308, gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – INTA – Balcarce, Argentina. A amostra foi inoculada e reisolada de baço de cobaio na Argentina. A partir da placa de reisolamento, a amostra 2308 foi semeada no Laboratório de Brucelose do Lanagro/MG em ágar triptose (Difco, USA) e incubada por 48h em atmosfera com 5% de CO₂.

Após a incubação, foi preparada uma suspensão da amostra desafio em salina, a qual foi normalizada em espectrofotômetro e confirmada por contagem de germes viáveis em ágar triptose. No momento do desafio, os animais estavam entre o sexto e o sétimo mês de gestação e cada um recebeu, por instilação conjuntival, como dose desafiante 50 μ L/olho (100 μ L/animal) da amostra 2308, num total de 3.0×10^7 UFC, segundo Cheville et al. (1992).

4.6. Sorologia

Para a avaliação do estado sorológico dos animais frente a *B. abortus*, os soros de todos os animais foram submetidos ao teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), segundo Alton et al. (1988).

Antes da inclusão dos animais no experimento foram realizadas duas sorologias intervaladas de 30 dias, visando a certificação de negatividade para brucelose dos animais.

Foram coletadas amostras de sangue 30 dias antes da vacinação, no dia da vacinação (dia 0) e nos seguintes dias após a vacinação: 15, 21, 30, 150, 270, 300, 360 e 380 (dia do desafio). Após o desafio, foi coletado sangue de todos os animais aos 15, 30, 60 dias e no dia do sacrifício. Após a coleta e coagulação, os frascos foram centrifugados e os soros obtidos foram separados em alíquotas, identificados e mantidos a -20°C até serem testados.

Os soros foram testados para presença de anticorpos contra *B. abortus* nas provas do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol (ME). Os soros testados na prova do AAT foram classificados como positivos ou negativos e na prova do 2-ME, foram considerados positivos os animais com reação de aglutinação completa a partir da diluição de 1:25 (Brasil, 2004). Nas provas sorológicas foram empregados antígenos elaborados pelo laboratório Tecpar do Paraná. Para as provas do AAT utilizou-se a partida de antígeno 003/04 (val.ago/05) e para as provas de 2ME a partida 001/04 (val.out/05).

A partir do desafio, foi feita pesquisa de anticorpos contra a brucelose (AAT), a cada dois meses, em todo o pessoal envolvido no projeto.

4.7. Abortos, Partos e Necropsias

Foram considerados como abortos os fetos naturalmente expulsos e os bezerros que nasceram vivos, porém não viáveis e antes de completarem 260 dias de gestação (Roberts, 1971; Hafez, 1993).

Após o aborto ou parto, as vacas e os bezerros nascidos vivos foram sedados com xilazina (Coopersin-Coopers) e sacrificados humanitariamente segundo recomendações do Report ... (2001).

De cada vaca e cada bezerro foi coletado sangue em tubos citratados, dois tubos por animal, e da vaca mais dois tubos sem anticoagulante. O sangue citratado foi processado a seguir para bacteriologia. Do sangue coletado sem anticoagulante, foi separado o soro que foi estocado a -20°C até o momento do teste sorológico.

Durante a necropsia, de cada vaca foram coletados de maneira estéril, fragmentos dos linfonodos parotídeo, retro-faríngeo, pré-escapular, supramamário, ilíaco interno e bronquial, fragmentos de baço, fígado, glândula mamária, cotilédone, leite e "swab" vaginal. Dos bezerros foram coletados "swab" retal, conteúdo estomacal e fragmentos de baço, fígado, linfonodo bronquial e pulmão. O material foi conservado a -20°C até a realização dos testes bacteriológicos.

4.8. Bacteriologia

O sangue citratado foi submetido a dois procedimentos. No primeiro, sete mililitros de sangue citratado de um dos tubos coletados, foram inoculados em meio bifásico de Castañeda e incubados a 37°C em 5% de CO_2 por 14 dias (Alton et al, 1988). O outro tubo foi congelado a -20°C por 24h e após o descongelamento, 7mL de caldo triptose (Difco) foram adicionados a 7 mL de sangue citratado e, a cada semana,

durante quatro semanas, 1 mL da mistura foi inoculado em ágar triptose acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB Gibco), segundo Palmer et al. (1996). As placas de ágar triptose e o caldo triptose com sangue, foram incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 por até 14 dias.

Após descongelamento lento (24h) entre 4°C e 8°C , os materiais coletados durante as necropsias foram processados. Inicialmente retirou-se toda a gordura com tesoura estéril, especialmente dos linfonodos. Os fragmentos de linfonodos e demais órgãos foram cortados em pedaços pequenos e colocados individualmente em sacos plásticos estéreis contendo aproximadamente o dobro do volume de tecido em água destilada estéril. O material nos sacos plásticos foi triturado em "stomacher" (Model 80 – Seward, USA) por aproximadamente 5 minutos. A seguir, um "swab" estéril foi embebido no produto da maceração e semeado em placas contendo ágar triptose adicionado de 5% de SFB estéril mais suplemento de antibióticos (meio de Farrell) (Brucella Selective Supplement, Oxoid, cód. SR083E). As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO_2 por um período de até quatro dias (quando apresentavam colônias visíveis) ou até duas semanas antes de serem descartadas como negativas. Os resultados foram anotados em planilhas individuais e em planilhas por grupos. Colônias semelhantes a *Brucella* sp foram repicadas para tubos com ágar triptose para posterior caracterização bioquímica.

De cada vaca ou feto/bezerro foram escolhidas amostras da bactéria isolada para a caracterização bioquímica e sorológica, geralmente isolados ou de cotilédone ou de "swab" vaginal das vacas e de linfonodo bronquial ou pulmão dos fetos/bezerros.

Foram realizados testes de catalase, oxidase, urease, citrato, redução de nitrato, teste de aglutinação com acriflavina e coloração de colônias com cristal violeta (Mac Faddin, 1980; Alton et al., 1988). Também foram realizados testes de aglutinação de colônias isoladas frente a

soros anti-*Brucella* lisa e rugosa (Alton et al, 1988). Como controles dos testes bioquímicos usaram-se as seguintes bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* B41, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

4.9. Análise Estatística

Calculou-se a incidência acumulada de abortos, infecção das vacas e infecção dos fetos usando-se a fórmula: Número de casos/Número de animais no dia 0 do experimento. Foi usado o risco relativo para medir a associação entre o desafio (grupo não vacinado) e a incidência acumulada de abortos, de infecções das vacas e de infecções dos fetos. Os intervalos de confiança foram calculados usando-se o método de aproximação logarítmica (Altman et al., 2000; Dohoo et al., 2003).

A eficácia da vacina foi calculada na forma de fração de prevenção [(RR-1)/RR], onde o grupo não vacinado é o grupo exposto ao fator de risco positivo, tendo sido interpretado como a proporção de casos que teria ocorrido no grupo vacinado, caso a vacina não tivesse sido usada (Dohoo et al., 2003). De acordo com Rothman e Greenland (1998), esta medida quantitativa chamada de fração de prevenção, representa, neste exemplo, a fração de

casos no grupo não vacinado que poderia ser prevenida pela vacinação.

5. RESULTADOS

5.1. Controle das Vacinas (contagem viável, pureza e dissociação)

As contagens viáveis realizadas na partida 1551 da vacina RB51 no dia 0 (antes e após a vacinação) e na partida 1618 empregada na vacinação de animais com 60 dias de gestação, foram em cada partida, respectivamente, $1,5 \times 10^{10}$ UFC/dose e $1,6 \times 10^{10}$ UFC/dose. As contagens viáveis realizadas imediatamente após as vacinações não apresentaram resultados diferentes daquelas efetuadas antes das vacinações. As vacinas não apresentaram contaminações e as colônias avaliadas estavam 100% em fase rugosa.

5.2. Testes sorológicos

Os soros de todos os animais dos grupos vacinados e controle não apresentaram anticorpos contra brucelose ao teste de triagem do AAT nos dias -30, -15, 0, 15 e mensalmente por um período de 12 meses pós vacinação, ou seja até o desafio. Após o desafio com a amostra 2308, todos os animais do experimento reagiram positivamente a pelo menos um dos testes sorológicos empregados. O número maior de animais reagentes ocorreu entre 30 e 60 dias após o desafio, com o máximo de reagentes ocorrendo no momento do aborto ou parto (Tabela 1).

Tabela 1 – Resposta sorológica dos animais vacinados com RB51 e controles após o desafio com *B. abortus* 2308 pelos testes AAT, SAL e 2ME.

Dias após o desafio	AAT ¹		SAL ²		2ME ³	
	RB51 (n = 20)	Controle (n = 13)	RB51 (n = 20)	Controle (n = 13)	RB51 (n = 20)	Controle (n = 13)
0	0	0	0	0	0	0
15	2	0	1	0	0	0
30	11	11	4	2	4	2
60 ⁴	14	7	14	7	8	5
N ⁵	15	12	9	10	11	10

1 – AAT – teste do antígeno acidificado tamponado

2 – SAL – teste de soroaglutinação lenta como integrante da prova 2ME. Soros positivos a partir de 1:100

3 – 2ME – teste do 2-mercaptoetanol

4 – Duas vacas do grupo RB51 e seis vacas do grupo controle abortaram e foram necropsiadas antes dos 60 dias após o desafio

5 – sangue coletado no dia da necropsia

Uma vaca do grupo RB51 foi negativa ao AAT após o desafio, apresentou títulos baixos de anticorpos à SAL e ao 2-ME e pariu normalmente. Todos os animais do grupo controle que abortaram ou que pariram a termo foram positivos ao AAT e apresentaram altos títulos à SAL e ao ME, com exceção de uma vaca que pariu um bezerro fraco. Esta vaca apresentou reação positiva ao AAT, uma reação fraca na SAL (1:25) e não reagiu ao 2-ME.

Nenhuma das pessoas envolvidas no projeto apresentou resultado positivo à sorologia.

5.3. Análise dos Abortos e Isolamentos

Os resultados dos testes bioquímicos efetuados (catalase, oxidase, citrato, redução de nitrato, urease), mais os testes de aglutinação frente à acriflavina, aglutinação a soros anti-*Brucella* lisa e rugosa e coloração de colônias com cristal violeta, classificaram todos os isolados

como sendo *B. abortus* com morfologia lisa, incluindo os isolados de duas vacas infectadas após o desafio e que foram vacinadas com RB51 no início da gestação. Nenhum isolado foi classificado como sendo *B. abortus* amostra RB51.

A amostra desafio *B. abortus* 2308 foi isolada de diversos tecidos e órgãos após a necropsia. A colonização dos tecidos e órgãos, avaliada pelo número de amostras com isolamento positivo por animal, foi mais intensa no grupo controle em comparação com o grupo vacinado ($\chi^2 = 4.07$, $P = 0.04$). Em todos os grupos, a maior frequência de isolamentos de *B. abortus* nas vacas foi obtida nos placentomas, nos "swabs" vaginais e no leite, enquanto que nos abortos, bezerros nascidos fracos e infectados, a frequência dos isolamentos foi maior nos pulmões, baço e "swabs" retais (Tabela 2). Não houve isolamento de *Brucella* sp do sangue de nenhum animal, apesar do emprego de duas técnicas de isolamento.

Tabela 2 – Isolamentos de *B. abortus* em espécimes clínicos de vacas e fetos positivos à bacteriologia nos grupos vacinado e controle após desafio com *B. abortus* 2308.

Materiais	RB51 (n = 7/20)		Controle (n = 11/13)		Total (n = 18)	
	N ¹	% ²	N	%	N	%
Vacas						
Retro-faríngeo	2	28	7	64	9	50
Parotídeo	3	43	9	82	12	67
Bronquial	1	14	1	9	2	11
Pré-escapular	2	28	5	45	7	39
Íliaco interno	3	43	5	45	8	44
Supramamário	3	43	6	54	9	50
Fígado	1	14	0	0	1	6
Baço	0	0	2	18	2	11
Glândula mamária	2	28	5	45	7	39
Cotilédone	7	100	11	100	18	100
"Swab" vaginal	6	86	11	100	17	94
Leite	4	57	10	91	14	78
Fetos³						
Bronquial	4	57	7	64	11	61
Pulmão	4	57	9	82	13	72
Fígado	4	57	4	36	8	44
Baço	5	72	8	73	14	78
Conteúdo estomacal	4	57	4	36	8	44
"Swab" retal	6	86	6	54	12	67

1 – número de animais dos quais foi isolada a *B. abortus* nos respectivos materiais

2 – percentagem de isolamentos de *B. abortus* nos respectivos materiais

3 – estão incluídos fetos abortados, nascidos vivos ou fracos

No grupo RB51, cinco vacas abortaram e uma das vacas vacinadas no início da gestação abortou com 225 dias de gestação, 59 dias antes da data prevista para o parto. A taxa de incidência de abortos neste grupo foi de 25%. No grupo controle, quatro vacas abortaram e quatro pariram bezerros muito fracos que foram

considerados como abortos, num total de incidência de abortos de 62% (Tabela 3).

O número e a percentagem de vacas e bezerros que se infectaram após o desafio nos diferentes grupos experimentais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3 – Número de vacas que abortaram e que pariram por grupo experimental após o desafio com *B. abortus* 2308.

Grupos Experimentais	Aborto ¹		Parto		Total
	N ²	%	N ³	%	
RB51	5	25	15	75	20
Controle	8 ⁴	62	5	38	13

1 – Inclui bezerros que nasceram vivos mas muito fracos e com mais de 15 dias antes da data prevista para o parto

2 – Número de animais

3 – Número de vacas que pariram bezerros viáveis

4 – Inclui quatro bezerros que nasceram vivos, muito fracos e com mais de 15 dias antes da data prevista para o parto

Tabela 4 – Isolamento de *B. abortus* de vacas, após aborto ou parto, e fetos abortados/bezerros, após desafio com *B. abortus* 2308

Grupos	Isolamentos de vacas			Isolamentos de fetos		
	Positivos ¹ (%)	Negativos ² (%)	Total	Positivos (%)	Negativos (%)	Total
RB51	7 (35)	13 (65)	20	6 (30)	14 (70)	20
Controle	11 (85)	2 (15)	13	10 (77)	3 (23)	13

1 – Positivo – Isolamento de *B. abortus* do animal

2 – Negativo – Ausência de isolamento de *B. abortus* do animal

No grupo vacinado com RB51, sete vacas e seis bezerros se infectaram, com uma percentagem de isolamentos de 35% e 30% respectivamente. No grupo controle, 11 vacas e 10 bezerros se infectaram, com uma percentagem de isolamentos de 85% e 77% respectivamente.

5.4. Análise Estatística

Os valores de fração de prevenção e o risco relativo dos animais do grupo controle versus animais vacinados com RB51 estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Fração de prevenção e risco relativo de abortos, infecção das vacas e infecção dos fetos nos animais não vacinados versus grupo de animais vacinados com RB51

Grupo RB51	Fração de prevenção	Risco Relativo	Intervalo de Confiança 95% ¹
Aborto	0,594	2,462	1,029 – 5,889
Infecção da vaca	0,586	2,418	1,274 – 4,588
Infecção do feto	0,610	2,564	1,232 – 5,335

1 – Aproximação logarítmica (Altman et al., 2000; Dohoo et al., 2003)

Levando-se em conta que os valores encontrados para frações de prevenção são interpretados como frações da prevenção do aborto, da infecção das vacas e dos fetos, os resultados obtidos para o grupo vacinados com RB51 indicaram que a vacinação ajudou a prevenir o aborto em 59,4%, a infecção das vacas em 58,6% e a infecção dos fetos em 61%.

Os resultados calculados para risco relativo revelaram que os animais não vacinados apresentaram 2,5 vezes maior risco de abortarem, 2,4 vezes maior risco de infecção das vacas e 2,6 vezes maior risco de infecção dos fetos do que os vacinados com RB51. Os intervalos de confiança foram significativos para um grau de confiança de 95%.

6. DISCUSSÃO

A prática da vacinação contra a brucelose tem contribuído enormemente para o sucesso de muitos programas, especialmente na fase de controle da doença. Vacinas elaboradas com amostras vivas e atenuadas de *Brucella* sp como a *B. abortus* amostra 19 (B19) têm sido usadas na prevenção da brucelose bovina por mais de seis décadas.

A presença da cadeia O do lipopolissacarídeo da parede celular da amostra B19 é responsável pelo aparecimento e persistência de anticorpos após a vacinação, os quais não podem ser diferenciados dos anticorpos de infecção nas provas sorológicas convencionais (Sutherland e Searson, 1990).

A cadeia O do LPS é o antígeno imunodominante nas espécies lisas de *Brucella*. Animais infectados ou vacinados com amostras lisas desenvolvem anticorpos contra este antígeno. Tem sido demonstrado que nos bovinos, a imunidade humoral não apresenta relação com proteção, sendo a imunidade celular a que desempenha o papel mais importante na resistência à brucelose (Araya e Winter, 1990; Cheville et al., 1993). Assim sendo, a vacina RB51, elaborada com amostra

rugosa de *B. abortus*, logo isenta de cadeia O, tem sido usada em diversos países com resultados alentadores, pois não interfere com as provas sorológicas de rotina, produzindo imunidade similar à B19 (Schurig et al., 2002).

No presente trabalho, os resultados sorológicos quando se empregaram os testes preconizados pelo PNCEBT (AAT e 2-ME), apresentaram resultados negativos desde o dia 0 (dia da vacinação) até 380 dias após a vacinação (dia do desafio), confirmando a ausência de interferência da vacinação com RB51 nos testes sorológicos. Como os anticorpos detectados nestas provas são dirigidos contra a cadeia O das amostras lisas de *Brucella*, a ausência de resposta sorológica nos animais vacinados com RB51 certamente deveu-se à inexistência da cadeia O na amostra RB51, como já comprovado em outros trabalhos (Schurig et al., 1991; Cheville et al., 1992; Cheville et al., 1993; Stevens et al., 1994; Stevens et al., 1995).

No entanto, após o desafio com a amostra 2308 de *B. abortus*, todos os animais apresentaram resultados positivos em pelo menos um dos testes sorológicos empregados. Estes resultados eram esperados, pois a cadeia O sendo o principal antígeno presente nas amostras lisas, estimula a formação de anticorpos anti-cadeia O. Esta é considerada uma característica importante e até desejável desta vacina, pois pode possibilitar a diferenciação entre animais vacinados com RB51 daqueles naturalmente infectados (Palmer et al., 1997). Além disto, os resultados positivos à sorologia após desafio indicam que os animais responderam à amostra desafiante.

O objetivo da vacinação é reduzir a susceptibilidade dos animais aumentando a sua resistência à doença. A vacinação, no entanto, é um processo de proteção relativo e não garante imunidade total. Depende fundamentalmente da resposta individual de cada animal, resposta esta que pode ir desde uma imunidade não mensurável até a proteção completa. Manthei (1959) comprovou que a diminuição da proteção

conferida pela vacina B19 está diretamente associada a um aumento da quantidade de bactérias desafiantes.

Tem sido demonstrado que as taxas de infecção e aborto estão diretamente relacionadas não só com a dose, mas também com a virulência da amostra desafiante (Alton et al., 1972) e que doses altas de exposição podem superar a proteção induzida pela vacina (Confer et al., 1985).

Apesar de vários experimentos demonstrarem proteção ao desafio de animais vacinados com RB51 quando jovens, dados sobre vacinação de animais adultos com dose vacinal total (dose bezerras) e vacinação de vacas no início de gestação com RB51 são escassos na literatura.

No presente estudo, a vacinação com a RB51 ajudou a evitar o aborto em 75% das vacas, enquanto no grupo controle 62% das vacas abortaram (Tabela 3). A proteção contra a infecção foi 65% e 70% respectivamente nas vacas e fetos ou bezerros nascidos vivos (Tabela 4). Estes resultados divergem dos relatados por Cheville et al. (1996) que encontraram 87% das fêmeas vacinadas com RB51 em diferentes idades protegidas contra a infecção, enquanto 60% dos animais do grupo controle se infectaram. Importante assinalar que depois do desafio, os animais naquela pesquisa, foram mantidos individualmente em baias com nível 3 de biossegurança, diferentemente do presente estudo, onde os animais foram mantidos juntos em cada grupo experimental, logo sujeitos a um desafio maior, e isto poderia ter influenciado nas diferenças de proteção observadas entre os dois trabalhos.

Alguns autores consideram que na avaliação de vacinas, a situação ideal ocorre quando acima de 99% dos animais do grupo controle se infectam após o desafio (Moriyón et al., 2004). Na prática, tem-se observado que nem sempre isto é possível de ser alcançado e segundo alguns autores, pode resultar em "over-

challenging", tornando muito difícil a análise dos resultados (Manthei, 1959).

Não existem critérios rigorosamente padronizados para a avaliação de vacinas, uma vez que o número de animais avaliados, a dose e amostra usadas para desafio, sinais clínicos dos animais e a resposta do sistema imune são apenas algumas das variáveis que podem influenciar o resultado final, tornando assim difícil a comparação de resultados entre diferentes pesquisas (Nicoletti, 1990). No entanto, a maioria dos autores concorda que testes de proteção de vacinas contra a brucelose devem ser analisados levando-se em consideração resultados contra desafios moderados entre grupos pareados de animais vacinados e não vacinados e que as taxas de aborto ou infecção podem aumentar ou diminuir dependendo de vários fatores conhecidos ou desconhecidos (Olsen e Stoffregen, 2005).

De um modo geral, o efeito da vacinação é medido por índices indiretos de proteção. No presente estudo, as frações de proteção no grupo não vacinado e o risco relativo de contrair a doença foram usados para a avaliação da proteção. As frações de proteção para abortos, infecção das vacas e infecção dos fetos (Tabela 5), são consistentes com os resultados de outros autores e demonstraram um impacto significativo da vacinação sobre os três parâmetros. Elzer et al. (1998), relataram que entre dez animais vacinados com RB51, dois se infectaram e três abortaram, enquanto que no grupo controle (n=10), oito se infectaram e sete abortaram. Assim sendo, este experimento revelou uma fração de proteção de 57% contra o aborto, enquanto que Olsen (2000a), encontrou 31% contra a infecção e 54% contra o aborto.

Como outras amostras de *B. abortus*, a RB51 também tem tropismo pelas células trofoblásticas da placenta, podendo eventualmente provocar placentite (Palmer et al, 1996) e mesmo persistir em animais vacinados (Olsen et al., 1999). Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram que a vacina RB51 quando aplicada na dose total,

mostrou ser suficientemente segura em fêmeas bovinas prenhes (Edmonds et al., 1999), ou mesmo quando aplicada "in utero" em cabras prenhes (Roop et al., 1991). Embora a amostra RB51 tenha sido isolada do leite de vacas até 69 dias depois da vacinação, a eliminação da bactéria em poucos animais por um curto período após o parto, não deve ser considerado um problema sério de saúde pública, uma vez que fato semelhante também ocorre com a B19 (Uzal et al., 2000). No presente estudo, nenhuma fêmea vacinada com 60 dias de gestação revelou a presença da RB51 em nenhum órgão avaliado ou no leite.

A decisão sobre que tipo de vacina deve ser usada em um programa de vacinação em bovinos está influenciada por diversos fatores. Entre eles estão a prevalência da enfermidade na população animal, a intensidade do monitoramento sorológico desta população, a legislação vigente e a disponibilidade financeira para a execução do programa.

Na ausência de vigilância sorológica intensa, os títulos sorológicos residuais decorrentes do uso da vacina B19 terão menor importância epidemiológica do que quando esta vigilância é intensificada na detecção de focos. No final dos anos 80, nos Estados Unidos da América, foi verificado, após estudos epidemiológicos, que a maioria dos animais eliminados em função da sorologia positiva eram animais reagentes devidos à vacinação com B19. Esta foi a principal razão da substituição da vacina B19 pela RB51 naquele país desde 1996 (Ragan, 2002). Em áreas de baixa prevalência, logo próximas à fase de erradicação e com intensa atividade de monitoramento sorológico, a RB51 poderia ser também uma boa alternativa. Por outro lado, não se conhece com profundidade a duração da imunidade conferida em bovinos vacinados quando bezerras com RB51. Trabalhos preliminares sugerem que uma vacinação de reforço aos 4-5 anos de idade pode ajudar a manter altos os níveis de proteção (Olsen e Stoffregen, 2005).

Em contraste, em países ou regiões ainda em fase de controle, logo com prevalência alta da enfermidade e sem monitoramento sorológico intenso, somado ao fato de não produzirem comercialmente a RB51, pareceria ser mais econômico adotar a prática da vacinação com B19. Entretanto, no Brasil, a vacina RB51 poderia ser útil para ser usada no contexto do PNCEBT em determinadas situações. Poderia ser interessante usá-la, por exemplo, para vacinar fêmeas com idade superior a 8 meses que não foram vacinadas com B19 na idade recomendada, ou em estabelecimentos com focos de brucelose, visando a proteção das fêmeas adultas não reagentes nos testes sorológicos, assim como em áreas perifocais para prevenir a disseminação da doença.

Alguns temas que dizem respeito à aplicabilidade da vacina RB51 ainda merecem ser melhor avaliados. Ainda não existe uma opinião unânime sobre qual a melhor forma de uso desta vacina: se em dose única em bezerras, se uma ou mais doses de reforço em animais adultos, se a dose em adultos deve ser reduzida em relação à dose aplicada em bezerras, utilidade da revacinação de adultas que foram vacinadas com B19 quando bezerras entre outros. Por outro lado, os estudos sobre a eficácia desta vacina realizados em animais experimentais, apresentam a vantagem de se trabalhar em condições controladas. Paralelamente, estudos em populações a campo devem ser implementados sempre que possíveis, pois darão uma resposta mais condizente com a realidade. Por outro lado, é de fundamental importância que se avalie a duração da imunidade a campo conferida pela RB51, onde os animais vacinados são colocados em rebanhos infectados e deste modo submetidos a um desafio natural. Os poucos dados disponíveis na literatura em trabalhos desta natureza apresentam resultados discrepantes.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicaram que a vacinação de novilhas com RB51 utilizando a dose completa ($1,0-3,4 \times 10^{10}$):

1. induziu imunidade protetora contra o desafio com amostra virulenta de *B. abortus*;
2. não provocou aborto ou infecção quando usada em fêmeas no início da gestação;
3. não interferiu com os testes sorológicos convencionais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 4.ed. Local: Revinter, 2003. 544p.
- ACHA, P.; SZYFRES, B. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales*. 2.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1989. 989 p. Brucelosis, p.14-36.
- ADAMS, L.G. Development of live *Brucella* vaccines. In: *Advances in Brucellosis Research*. Local: Texas A&M University, 1990. p.250-276.
- ADAMS, L.G.; TEMPLETON, J.W. Identifying candidate genes for natural resistance to brucellosis. In: *Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. 1995, Nevada, Proc...Nevada: 1995. p.11-116.
- ALLARDET-SERVENT, A.; BOURG, G.; RAMUZ, M.; PAGES, M.; BELLIS, M.; ROIZES, G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J.Bacteriol.*, v.170, n.10, p.4603-4607, 1988.
- ALLEN, C.A.; ADAMS, G.L.; FICHT, T.A. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.*, v.66, n.3, p.1008-1016, 1998.
- AL MARIRI, A.; TIBOR, A.; MERTENS, P.; DE BOLLE, X.; MICHEL, P.; GODFROID, J.; WALRAVENS, K.; LETESSON, J.J. Induction of immune response in BALB/c mice with DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect. Immun.*, v.69, n.8, p.6264-6270, 2001.
- ALTMAN, D.G.; MACHIN, D.; BRYANT, T.N.; GARDNER, M.J. *Statistics with Confidence*. 2.ed. BMJ Books, 2000. 240p.
- ALTON, G.G. *Brucella melitensis*. In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.385-409.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; GARCIA-CARRILLO, C.; TRENCHI, A. *Brucella abortus* 45/20 vaccines in goats: Immunity experiments. *Am. J. Vet. Res.*, v.33, n.9, p.1747-1751, 1972.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: INRA, Paris, 1988. 189p.
- ANDERSON, T. D.; MEADOR, V. P.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and Histologic Lesions. *Vet. Pathol.*, v.23, n.3, p.219-226, 1986a.
- ANDERSON, T. D.; MEADOR, V. P.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies *Vet. Pathol.*, v.23, n.3, p.227-239, 1986b.
- ANSELMO, F.P.; PAVEZ, M.M. *Diagnóstico de Saúde Animal*. Brasília: Ministério da Agricultura, 1977. 735p.
- ARAYA, L.N.; ELZER, P.H.; ROWE, G.E.; ENRIGHT, F.E.; WINTER, A.J. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.*, v.143, n.10, p.3330-3337, 1989.

- ARAYA, G.N.; WINTER, A.J. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect. Immun.*, v.58, n.1, p.254-256, 1990.
- ARENAS, G.N.; STASKEVICH, A.S.; ABALLAY, A.; MAYORGA, L.S. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, v.68, n.7, p.4255-4263, 2000.
- ASHFORD, D.A.; DI PIETRA, J.; LINGAPPA, J.J.; WOODS, C.; NOLL, H.; NEVILLE, B.; WEYANT, R.; BRAGG, S.L.; SPIEGEL, R.A.; TAPPERO, J. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v.22, n.25-26, p.3435-3439, 2004.
- BAE, J.E. *Generation of Baculovirus-Brucella abortus heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants, and B.abortus superoxide dismutase and 17/112 recombinant proteins*. 1999. 225f. Thesis PhD (doutorado em Veterinary Medical Sciences). Politechnic Institute and State University.
- BAUMGARTEN, D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p.63-69, 2002.
- BECKETT, F.W.; McDIARMID, S.C. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *Br. Vet. J.*, v.141, n.5, p.507-514, 1985.
- BELLAIRE, B.H.; ELZER, P.H.; BALDWIN, C.L.; ROOP, M.R.II. Production of the siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid is required for wild-type growth of *Brucella abortus* in the presence of erythritol under low-iron conditions *in vitro*. *Infect. Immun.*, v.71, n.5, p.2927-2932, 2003.
- BERMAN, D.T.; BEACH, B.A.; IRWIN, M.R. Studies on repeated vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19. III. The response of vaccinated and revaccinated cattle to conjunctival exposure with a virulent strain of *Brucella abortus* during the third gestation period. *Am J. Vet. Res.*, v.13, n.48, p.351-358, 1952.
- BLACK, H. Heat shock proteins. *The Scientist*, v.14, n.16, p.10-13, 2000.
- BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; VINCENT-FOULONGNE, V.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; ALLARDET-SERVENT, A.; CAZEVIEILLE, C.; LIAUTARD, J.P.; RAMUZ, M.; O'CALLAGHAN, D. The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.99, n.3, p.1544-1549, 2002.
- BRASIL. Departamento de Defesa Animal. 2001. Informações sobre o PNCEBT. Brasília, Brasil: Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br/das/dda/programa.htm. Acesso em: 25/03/2005. Jan. 2001.
- BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6 de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de jan. 2004, Seção 1, p.6-10.
- BRAUN, W.; BONESTELL, A.E. Independent variations of characteristics in *Brucella abortus* variants and their detection. *Am. J. Vet. Res.*, v.8, n.10, p.386-390, 1947.
- BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.435-446, 2002.
- BRICKER, B.J.; EWALT, D.R.; HALLING, S.M. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.*, v.3, n.1, p.1-13, 2003.

BRICKER, B.J.; HALLING, S. Differentiation of *B.abortus* bv.1,2 and 4, *B.melitensis*, *B.ovis*, and *B.suis* bv.1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n.11, p.2660-2666, 1994.

BRIONES, G.; INON de IANNINO, N.; ROSET, M.; VIGLIOCCO, A.; PAULO, P.S.; UGALDE, R. *Brucella abortus* cyclic beta 1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.*, v.69, n.7, p.4528-4535, 2001.

BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *The Practitioner*, v.39, n.3, p.161-170, 1887.

BUDDLE, B.B. Immunity in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 by the subcutaneous and intracaudal routes during calthood. *Aust. Vet. Jour.*, v.24, n.10, p.262-271, 1948.

BUDDLE, M. B.; BOYES, B.W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *Aust. Vet. J.*, v.29, n.6, p.145-153, 1953.

BURNS, D. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Cur. Opin. Microbiol.*, v.6, n.1, p.29-34, 2003.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J. Infect.*, v.45, n.2, p.122-127, 2002.

CARMICHAEL, L.E.; BRUNER, D.W. Characteristic of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.*, v.58, n.4, p.579-592, 1968.

CAROFF, M.; BUNDLE, D.R.; PERRY, M.B.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; DUNCAN, J.R. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect. Immun.*, v.46, n.2, p.384-388, 1984.

CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K.; ESTEIN, R.A.; BOWDEN, R.A.; FOSSATI, C.A.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; GOLDBAUM, F.A.. The insertion of a 23AA peptide from OMP31 to the Nterminus of BLS significantly improved the degree of protection against *B.melitensis* and *B.ovis* infection. In: *Conference Brucellosis Research*, 58., México. *Proc...* México: 2005. 164p.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P.J. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.1, n.11, p.137-149, 2003.

CELLI, J.; CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M.; PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J.P.. *Brucella* evades macrophage killing via Vir-B dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, v.198, n.4, p.545-556, 2003.

CELLI, J.; SALCEDO, S.; ARELLANO-REYNOSO, B.; GORVEL, J.P. Molecular requirements for *Brucella* survival. In: *Conference Brucellosis Research*, 58., México. *Proc...* México: 2005. 164p.

CHEERS, C. Pathogenesis and cellular immunity in experimental murine brucellosis. *Dev. Biol. Standard.*, v.56, p.237-246, 1984.

CHEVILLE, N.F.; JENSEN, A.E.; HALLING, S.M. et al. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, n.10, p.1881-1888, 1992.

CHEVILLE, N.F.; STEVENS, M.G.; JENSEN, A.T.; TATUM, F.M.; HALLING, S.M. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, n.10, p.1591-1597, 1993.

- CHEVILLE, N.F.; OLSEN, S.C.; JENSEN, A.E.; STEVENS, M.G.; PALMER, M.V.; FORANCE, A.M. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, n.8, p.1153-1156, 1996.
- CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; PAQUET, J.Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect.*, v.3, n.9, p.729-738, 2001.
- CLOECKAERT, A; VIZCAÍNO, N; PAQUET, J.Y.; BOWDEN, R.A.; ELZER, P. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.229-247, 2002.
- CLOECKAERT, A; ZYGMUNT, M.S.; GUILLOTEAU, I.A. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. *Vaccine*, v.20, n.13-14, p.1820-1822, 2002.
- COLBY, L. *The Humoral Immune Response of Elk (Cervus elaphus nelsoni) and Mice to Vaccination with Brucella abortus Strain RB51*. 1997. 152f. Thesis (mestrado em Veterinary Medical Sciences), Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine.
- CONFER, A.W.; HALL, S.M.; FAULKNER, C.B.; ESPE, B.H.; DEYOE, B.L.; MORTON, R.J.; SMITH, R.A. Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Microbiol.*, v.10, n.6, p.561-575, 1985.
- CORBEL, M.J. *Brucella* phages: Advances in the development of a reliable phage typing system for smooth and nonsmooth isolates. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, v.138, n.1, p.70-75, 1987.
- CORBEL, M.J. Microbiology of the Genus *Brucella*. In :YOUNG, E.J.; CORBEL, M.J.(Ed.). *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.53-72.
- CORBEL, M.J. Brucellosis: An overview. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, n.2, p.213-221, 1997.
- CORBEL, M.J.; BRINLEY-MORGAN, W.J. Genus *Brucella*. In: KRIEG, N.R.; HOLD, J.G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.377-388.
- CORNER, L.A.; ALTON, G.G. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res. Vet. Sci.*, v.31, n.3, p.342-344, 1981.
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, v.42, n.2, p.351-360, 1994.
- DELVECCHIO, V.G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R.J.; et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.99, n.1, p.443-448, 2002.
- DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.*, v.58, n.7, p.2320-2328, 1990.
- DEYOE, B. L; DORSEY, T.A.; MEREDITH, K.B.; GARRETT, I. Effect of reduced dosages of *Brucella abortus* strain 19 in cattle vaccinated as yearlings. *Proceedings of the Uited States Animal Health Association*, v.83, p.92-104, 1979.
- DIAZ, R.; JONES, L.M.; LEONG, D.; WILSON, J.B. Surface antigens of smooth *Brucellae*. *J. Bacteriol.*, v.96, n.4, p.893-901, 1968.

- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown: AVC Inc, 2003. 706p.
- DORN, B.R.; DUNN, W.A.; FOX, P.A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cel. Microbiol.*, v.4, n.1, p.1-10, 2002.
- EDMONDS, M.D.; SCHURIG, G.G.; SAMARTINO, L.E.; HOYT, P.G.; WALKER, J.V.; HAGIUS, S.D.; ELZER, P.H. Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and pregnant heifers. *Am. J. Vet. Res.*, v.60, n.6, p.722-725, 1999.
- ELZER, F.H.; ENRIGHT, F.M.; COLBY, L.; HAGIUS, S.D.; WALKER, J.V.; FATEMI, M.B.; KOPEC, J.D.; BEAL, V.C. Protection against infection and abortion induced by virulent challenge exposure after oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.12, p.1575-1578, 1998.
- ENRIGHT, F.M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection of domestic animals. In: NIELSEN K.; DUNCAN J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, p.301-320, 1990.
- EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; MARTIN, B.M.; CUMMINS, D.R.; MILLER, G.M. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.6, n.4, p.448-452, 1994.
- FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; SCHURR, E.; GROS, P.; ADAMS, L.G.; TEMPLETON, J.W. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1. *Genome Res.*, v.6, n.10, p.956-964, 1996.
- FORRESTIER, C.; MORENO, E.; PIZARRO-CERDA, J.; GORVEL, J.P. Lysosomal accumulation and recycling of LPS to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *J. Immunol.*, v.162, n.11, p.6784-6791, 1999.
- FRENCHICK, P.J.; MARKHAM, F.R.; COCHRANE, A.H. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, n.2, p.332-335, 1985.
- GARIN, A.; GIL, A.D.; SILVA, M.; CAPONI, O.; CHANS, L.; VITALE, E. Brucellosis eradication program in Uruguay. In: *Conference Brucellosis Research*, 58., México. *Proc...* México: 2005. 164p.
- GAUTHIER, A.; THOMAS, N.A.; FINLAY, B.B. Bacterial injection machines. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.28, p.25273-25276, 2001.
- GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. *Rev. Sci. Tech.*, v.21, n.2, p.277-286, 2002.
- GODFROID, J.; TAMINIAU, B.; DANESE, I.; et al. Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infec. Immun.*, v.66, n.11, p.5485-5493, 1998.
- GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J.J. 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. *Vet. Res.*, v.36, n.3, p.313-326, 2005.
- GOLDING, B.; SCOTT, D.E.; SCHARF, O.; HUANG, L.Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection.*, v.3, n.1, p.43-48, 2001.
- GOODE, E.R.; MANTHEI, C.A.; AMERVAULT, T.E. Relationship of age to susceptibility of non vaccinated cattle to *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.18, n.67, p.279-282, 1957.
- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.281-297, 2002.

GRAVES, R.R. The story of John M. Buck's and Matilda's contribution to the cattle industry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.102, n.3, p.193-195, 1943.

GRIMONT, F.; VERGER, J.M.; CORNELIS, P.; LIMET, J.; LEFEVRE, M.; GRAYON, M.; REGNAULT, B.; VAN BROECK, J.; GRIMONT, P.A. Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes. *Res. Microbiol.*, v.143, n.1, p.55-65, 1992.

GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; EICHEL-STREIBER, C.V.; LÓPEZ-GOÑI, I.; THELESTAM, M.; ARVIDSON, S.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.48, p.44443-44443, 2001.

HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*. 6 ed. Local:Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 573p.

HALL, W.H. History of *Brucella* as a human pathogen. In :YOUNG, E.J.; CORBEL, M.J.(Ed.). *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.1-10.

HALLING, S. The Organism: Genetics. In: Conference Anniversary Meeting of *Brucella* Research. 50., 1997. Chicago. *Proc...*Chicago: 1997, p.19-25.

HALLING, S.M.; PETERSON-BURCH, B.D.; BRICKER, B.J.; ZUERNER, R.L.; QING, Z.; LI, L.L.; KAPUR, V.; ALT, D.P.; OLSEN, S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, v.187, n.8, p.2715-2726, 2005.

HE, Y. *Induction of protection, antibodies and cell mediated immune responses by Brucella abortus strain RB51, Ochrobactrum anthropi and recombinants thereof*. 2000, 113f. Thesis (doutorado em Veterinary Medical Sciences), Virginia Polytechnic Institute and State University.

HENRY, M.; COTORELLO, A.C.; LAGE, A.P.; BISPO, CA. Sincronização de cio em novilhas visando a concentração de partos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.3, p.446-448, 2003.

HONG, P.; TSOLIS, R.; FICHT, T.A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, v.68, n.7, p.4102-4107, 2000.

HOYER, B.H.; McCULLOGH, N.B. Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms, and other *Brucella* species. *J.Bacteriol.*, v.96, n.5, p.1783-1770, 1968.

JENSEN, A.E.; CHEVILLE, N.F.; EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; THOEN, C.O. Application of pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of vaccine strain RB51 from field isolates of *Brucella abortus* from cattle, bison, and elk. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, n.3, p.308 - 312, 1995.

JOINT expert committee on brucellosis. Geneva: FAO/WHO, 1971. 100p.(FAO Agriculture Studies n.85/WHO Technical report series n.464).

JONES, L.M.; BERMAN, D.T. The role of living vaccines prophylaxis. *Dev. Biol. Standard.*, v.31, p.328-334, 1976.

KING, N.B.; FRANK, N.A. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. *J. Vet. Am. Med. Assoc.*, v.131, n.7, p.100-103, 1961.

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, n.1, p.65-78, 2003.

KURAR, E.; SPLITTER, G.A. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/12 gene elicits immune response. *Vaccine*, v.15, n.17-18, p.1851-1857, 1997.

KÖHLER, S.; PORTE, F.; JUBIER-MAURIN, J.V.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; TEYSSIER, J.; LIAUTARD, J.P. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.299-309, 2002.

LAMBERT, G.; AMERAULT, T.E.; MANTHEI, C.A.; GOODE, E.R. Immunogenic response of calves vaccinated at different ages with *Brucella abortus* strain 19. In: Annual Meet. U.S. 65, 1961, *Proc... Livestock Sanitary Association*, 1961. p.93-97.

LEAL-HERNANDEZ, M.; DIAZ-APARICIO, E.; PÉREZ, R. Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced in a herd with active brucellosis, with presence of atypical humoral response. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.*, v.28, n.1, p.63-70, 2005.

LEÓN, F.C. *Brucelosis ovina y caprina*. Paris: Office International des Epizooties, 1993. 451p.

LETESSON, J.J.; LESTRATE, P.; DELRUE, R.M.; DANESE, I.; BELLEFONTAINE, F.; FRETIN, D.; TAMINIAU, A.; TIBOR, A.; DRICOT, A.; DESCHAMPS, C.; HAINE, V.; LEONARD, S.; LAURENT, T.; MERTENS, P.; VANDENHAUTE, J.; DE BOLLE, X. Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug". *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.317-328, 2002.

LOPETEGUI, P. Erradicación de brucelosis bovina en Chile: experiencias en el uso de la vacuna cepa RB51. In: LUNA-MARTINEZ, E.; SUAREZ-GUEMES, F. (Ed.). *Foro Nacional de Brucelosis*, 3, Acapulco: 1998. p.159-179.

LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; MORYIÓN, I.; MORENO, E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.329-339, 2002.

LORD, V.R.; SCHURIG, G.G.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; MARCANO, M.J.; MELENDEZ, G.E. Field study of

vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, n.8, p.1016-1020, 1998.

LUNA-MARTINEZ, J.E.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.19-30, 2002.

MacFADDIN, J.F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1980. 301 p.

MacMILLAN, A. Conventional serological tests. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.153-197.

MANTHEI, C.A. Evaluation of vaccinal methods and doses of *Brucella abortus* strain 19. In: Annual Meet. U.S. 56, 1952, *Proc...Livestock Sanitary Association*, 1952. p.115-125.

MANTHEI, C.A. Summary of controlled research with strain 19. In: Annual Meet. U.S. 63, 1959, *Proc...Livestock Sanitary Association*, 1959. p.91-97.

MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN ANIMAL. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 53p.

McDIARMID, A.A. The degree of duration of immunity in cattle resulting from vaccination with strain 19 *Brucella abortus* vaccine and its implication in the future control and eventual eradication of brucellosis. *Vet. Rec.*, v.69, n.37, p.877-879, 1957.

McQUINSTON, J.R.; VEMULAPALLI, R.; INZANA, T.J.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; FRITZINGER, D.; HADFIELD, T.L.; WARREN, R.A.; SNELLINGS, N.; HOOVER, D.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect. Immun.*, v.67, n.8, p.3830-3835, 1999.

- McGIVEN, J.A.; TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MacMILLAN, A.P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and cELISA. *J. Immunol. Methods*, v.278, n.1-2, p.171-178, 2003.
- MEADOR, V.P.; DEYOE, L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.*, v.26, n.6, p.513-515, 1989.
- MEIKLE, P.J.; PERRY, M.B.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; BUNDLE, D.R. Fine structure of A and M antigens from *Brucella* antigens. *Infection and Immunity*, v.57, n.9, p.2820-2828, 1989.
- MEYER, M. Current concepts in the Taxonomy of the Genus *Brucella*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.1-17
- MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; JUMAS-BILAK, E.; GUINGUE-TALET, P.; ALLARDET-SERVENT, A.; O'CALLAGHAN, D.; RAMUZ, M. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J.Bacteriol.*, v.179, n.10, p.3244-3249, 1997.
- MINGLE, C.K.; MANTHEI, C.A.; JASMIN, A.M. The stability of reduced virulence exhibited by *Brucella abortus* strain 19. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.99, n.773, p.203-205, 1941.
- MORENO, E.; BERMAN, D.T.; BOETTCHER, A. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, v.31, n.1, p.362-370, 1981.
- MORENO, E.; STACKEBRANDT, E.; DORSCH, M.; WOLTERS, J.; BUSCH, M.; MAYER, H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J. Bacteriol.*, v.172, n.7, p.3569-3576, 1990.
- MORENO, E. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.31-38, 2002.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.209-227, 2002.
- MORYIÓN, I.; GRILLÓ, M.J.; MONREAL, D.; GONZALEZ, D.; MARÍN, C.; LÓPEZ-GOÑI, I.; MAINAR-JAIME, R.C.; MORENO E.; BLASCO, J.M. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, v.35, p.1-38, 2004.
- NICOLETTI, P. A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dairy herds in Florida. *Proc. Annu Meet. U.S. Anim. Health Assoc.*, v.80, p.91-100, 1976.
- NICOLETTI, P. The effects of adult cattle vaccination with strain 19 on the incidence of brucellosis in dairy herds in Florida and Puerto Rico. *Proc. Annu Meet. U.S. Anim. Health Assoc.*, v.83, p.75-80, 1979.
- NICOLETTI, P. Relationship between animal and human disease. In: YOUNG, E.J.; CORBEL, M.J.(Ed.). *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.41-51.
- NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.283-299.
- NICOLETTI, P.; WINTER A. J. The immune response to *Brucella abortus* – the cell-mediated response to infection. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.83-96.
- NIELSEN, K. H.; DUNCAN, J.R. Antibody isotype response in adult cattle vaccinated with *Brucella abortus* S19. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.19, n.3-4, p.205-214, 1988.

- NIELSEN, K.H.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet.Immunol. Immunopathol.*, v.46, n.3-4, p.285-291, 1995.
- NIELSEN, K.H.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BELSEVICIOUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J.Immunol.Methods*, v.195, n.1-2, p.161-168, 1996.
- NIELSEN, K.H.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *J.Immun.Immunoch.*, v.22, n.3, p.183-201, 2001.
- NIELSEN, K.H. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet.Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.447-459, 2002.
- NIELSEN, K.H.; EWALT, D.R. Bovine Brucellosis. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, 2004. p.328-345.
- O'CALLAGHAM, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOSCHIROLI, M.L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKOV, Y.; RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.*, v.33, n.6, p.1210-1220, 1999.
- OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G.A. CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45^{RB^{lo}} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II- deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, v.25, n.10, p.2551-2557, 1995.
- OLIVEIRA, S.C.; HARMS, J.S.; RECH, E.L.; RODARTE, R.S.; BOCCA, A.L.; GOES, A.M.; SPLITTER, G.A. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.31, n.1, p.77-84, 1998.
- OMER, M.K.; SKJERVE, E.; WOLDEHIWET, Z.; HOLSTAD, G. Risk factors for *Brucella* spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea. *Prev. Vet. Med.*, v.46, n.4, p.257-265, 2000.
- OLSEN, S.C.; EVANS, D.; HENNAGER, S.G.; CHEVILLE, N.F.; STEVENS, M.G. Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhooed-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.8, n.4, p.451-454, 1996.
- OLSEN, S.C.; BRICKER, B.; PALMER, M.V.; JENSEN, A.F.; CHEVILLE, N.F. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: Serology, clearance and efficacy. *Res. Vet. Sci.*, v.66, n.2, p.101-105, 1999.
- OLSEN, S.C. Immune response and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet. Therapeutics*, v.1, n.3, p.183-191, 2000a.
- OLSEN, S.C. Responses of adult cattle to vaccination with reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res. Vet. Sci.*, v.69, n.2, p.135-140, 2000b.
- OLSEN, S.C.; STOFFREGEN, W. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev. Vaccines*, v.4, n.6, p.917-930, 2005.
- OUAHRANI, S.; MICHAUX, S.; SRI WIDADA, J.; BOURG, G.; TOURNEBIZE, R.; RAMUZ, R.; LIAUTARD, J.P. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J. Gen. Microbiol.*, v.139, n.12, p.3265-3273, 1993.

PACHECO, G.; MELO, M.T. *Brucelose*. Rio de Janeiro: Serviço Gráfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1956. 727p. (Monografias do Instituto Oswaldo Cruz).

PALMER, M.V.; CHEVILLE, N.F.; JENSEN, A.E. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet. Pathol.* v.33, n.6, p.682-691, 1996.

PALMER, M.V.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.58, n.5, p.472-477, 1997.

PAULSEN, I.T.; SESHADRI, R.; NELSON, K.E.; EISEN, J.A.; HEIDENBERG, J.F.; READ, T.D.; et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, n.20, p.13148-13153, 2002.

PIZARRO-CERDÁ, J.; MERESSE, S.; PARTON, R.G.; SOLA-LANDA, G.V.; LOPEZ-GOÑI, I.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and in endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.*, v.66, n.12, p.5711-5724, 1998.

PLOMMET, M. Killed vaccines in cattle: current situations and prospects. In: ADAMS, L.G. (Ed.). *Advances in Brucellosis Research*. Local: Texas A&M University, 1990. p.215-227.

POESTER, F.P.; RAMOS, E.T.; GOMES, M.P.; CHIMINAZZO, C.; SCHURIG, G.G. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, n.1, p.61-64, 2000.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.55-62, 2002.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; LAGE, A.P. Diagnóstico da brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec*, n.47, p.13-29, 2005.

PORTE, F.; NAROENI, A.; OUAHRANI, B.S.; LIAUTARD, J.P. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immunol.*, v.71, n.3, p.1481-1490, 2003.

RAGAN, V. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) Brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.11-18, 2002.

REPORT of the AVMA Panel on Euthanasia 2000. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.218, n.5, p.669-696, 2001.

RIVERA, S.A.; RAMÍREZ, M.C.; LOPETEGUI, I.P. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de los Lagos, Chile. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.45-53, 2002.

ROBERTS, S.J. *Veterinary Obstetrics and genital diseases (theriogenology)*, 2. ed., Ithaca: Edward Bros Inc., 1971. 776p.

ROCHA, M. A.; BARBOSA, E. F.; DIAS NETO, E.; GUIMARÃES, S. E.; GOUVEIA, A. M. A high sensitivity nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.*, v.63, n.1, p.1-11, 1998.

ROOP, R.M.II; PRESTON, D.M.; BAGCHI, T.; SCHURIG, G.G. Rapid identification of smooth *Brucella* species with a monoclonal antibody. *J.Clin. Microbiol.*, v.25, n.11, p.2090-2093, 1987.

ROOP, R.M.II; JEFFERS, G.; BAGCHI, T.; WALKER, J.; ENRIGHT, F.M.; SCHURIG, G.G. Experimental infection of goat fetuses in utero with stable, rough mutant of *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.*, v.51, n.2, p.123-127, 1991.

- ROOP, R.M.II; ROBERTSON, G.T.; FERGUSON, G.P.; MILFORD, L.E.; WINKLER, M.E.; WALKER, G.C. Seeking a niche: putative contributions of the *hfq* and *bacA* gene products to the successful adaptation of the brucellae to their intracellular home. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p. 349-364, 2002.
- ROOP, R.M.II; GEE, J.M.; ROBERTSON, G.T.; RICHARDSON, G.T.; NG, W-L.; WINKLER, M.E. *Brucella* stationary phase gene expression and virulence. *Annu.Rev. Microbiol.*, v.57, n.1, p.57-76, 2003.
- ROOP, R.M.II; BELLAIRE, B.H.; VALDERAS, M.W.; CARDELLI, J.A. Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. *Mol. Microbiol.*, v.52, n.3, p.621-630, 2004.
- ROSENBERGER, C.M.; FINLAY, B.B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nature Reviews*, v.4., n.5, p.385-396, 2003.
- ROSS, H.M.; FOSTER, G.; REID, R.J.; JAHANS, K.L.; MacMILLAN, A.P. *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet.Rec.*, v.134, n.14, p.359, 1994.
- ROTHMAN, K.J.; GREENLAND, S. *Modern Epidemiology*, 2. ed. Local: Lippincot-Raven Publishers. 1998. 738p.
- SAMARTINO, L.E.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R. Evaluación de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en hembras bovinas preñadas. *Revista Veterinaria Argentina*, v.16, n.152, p.2-8, 1999.
- SAMARTINO, L.E.; FORT, M.; GREGORET, R.; SCHURIG, G.G. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, v.45, n.3-4, p.193-199, 2000.
- SANTOS, R.L.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Morfofisiologia da placenta bovina. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n.15, p.27-36, 1996.
- SANTOS, R.L.; PEIXOTO, M.T.; SERAKIDS, R.; COSTA, G.M.; MARTINS, N.E. Detección de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa en testículo y en epididimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch. Reprod. Ani.*, v.6, n.1, p.34-41, 1998.
- SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M.II; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.28, n.2, p.171-188, 1991.
- SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis Vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.479-496, 2002.
- SCOTT, D.E.; GOLDING, H.; HUANG, L.Y.; INMAN, J.; GOLDING, B. HIV peptide conjugated to heat-killed bacteria promotes antiviral responses in immunodeficient mice. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v.14, n.14, p.1263-1269, 1998.
- SEN R.; BALTIMORE D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, v.46, n.5, p.705-716, 1986.
- SIERA, R.; COMERCI, D.J.; SANCHES, D.O.; UGALDE, R.A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.*, v.182, n.17, p.4849-4855, 2000.
- SIMMONS, G.S.; HALL, T.K. Epididymitis of rams: preliminary studies on the occurrence and pathogenicity of a *Brucella*-like organism. *Aust. Vet. J.*, v.29, n.2, p.33-40, 1953.
- SMITH, H.; WILLIAMS, A.E.; PEARCE, J.H.; KEPPIE, J. et al. Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature*, v.193, n.4810, p.47-49, 1962.

- SMITH, H.; FITZGEORGE, R.B. The chemical basis of virulence of *Brucella abortus*. V. The basis of intracellular survival and growth in bovine phagocytes. *Br. J. Exp. Pathol.*, v.45, n.2, p.174-186, 1964.
- SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GRILLÓ, M.J.; MORENO, E.; MORIYÓN, I.; BLASCO, J.M.; GORVEL, J.P.; LÓPEZ-GOÑI, I. A two component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.29, n.1, p.125-138, 1998.
- STEVENS, M.G.; HENNAGER, S.G.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n.4, p.1065-1066, 1994.
- STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.44, n.3-4, p.223-235, 1995.
- STOENNER, H.; LACKMAN, D. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida*, Thomas. *Am. J. Vet. Res.*, v.18, n.69, p.947-951, 1957.
- SUTHERLAND, S.S.; ROBERTSON, A.G.; LeCRAS, D.V.; ROBERTSON, G.M.; JOHNSTON, J.M.; EVANS, J.R. The effect of challenge with virulent *Brucella abortus* on beef cattle vaccinated as calves or adults with either *Brucella abortus* strain 19 or 45/20. *Aust. Vet. J.*, v.57, n.10, p.470-472, 1981.
- SUTHERLAND, S.S.; SEARSON, J. The immune response to *Brucella abortus*: the humoral response. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.65-81.
- TAMINIAU, B.; DAYKIN, M.; SWIFT, S.; BOSCHIROLI, M.L.; TIBOR, A.; LESTRATE, P.; DE BOLLE, X.; O'CALLAGHAN, D.; WILLIAMS, P.; LETESSON, J.J. Identification of a Quorum-Sensing Signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, v.70, n.6, p.3004-3011, 2002.
- TCHERNEVA, E.; RIJSENS, N.; JERSEK, B.; HERMAN, L.M. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Appl. Microbiol.*, v.88, n.1, p.69-80, 2000.
- TEMPERTON, J.W.; ADAMS, L.G. Natural resistant to bovine brucellosis. In: ADAMS, L.G. (Ed.). *Advances in Brucellosis Research: an International Symposium*. Texas: Texas A&M University Press. 1990. p.144-150.
- THOEN, F.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: GILES, C.L.; THOEN, C.O. (Ed.). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 2. ed. Local: Iowa State Univ. Press, 1993. p.236-247.
- UZAL, F.A.; SAMARTINO, L.E.; SCHURIG, G.G.; CARRASCO, A.; NIELSEN, K.; CABRERA, R.F.; TADDEO, H.R. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Veterinary Research Communications*, v.24, n.3, p.143-151, 2000.
- VAN METRE, D.C.; KENNEDY, G.A.; OLSEN, S.C.; HANSEN, G.R.; EWALT, D.R. Brucellosis induced by RB51 vaccine in pregnant heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.215, n.10, p.1491-1493, 1999.
- VARGAS, F.J. Brucellosis in Venezuela. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.39-44, 2002.
- VELIKOVSKY, C.A.; CASSATARO, J.; SANCHES, M.; FOSSATI, C.A.; FAINBOIM, L.; SPITZ, M. Single-shot plasmid DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. Persistent expression of DNA. *J. Immunol. Methods*, v.244, n.1-2, p.1-7, 2000.

- VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.; GRAYON, M. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v.138, n.1, p.235-238, 1987.
- DEMULAPALLI, R.; McQUINSTON, J.R.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.*, v.6, n.5, p.760-764, 1999.
- DEMULAPALLI, R.; HE, Y.; BUCCOLO, L. S.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G.G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in α -antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect. Immun.*, v.68, n.7, p.3927-3932, 2000.
- DEMULAPALLI, R.; HE, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S.M.; SCHURIG, G.G. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.521-532, 2002.
- VIZCAÍNO, N.; KITTENBERGER, R.; CLOECKAERT, A.; MARÍN, C.M.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. Minor nucleotide substitutions in the *omp31* gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect. Immun.*, v.69, n.11, p.7020-7028, 2001.
- WERLING, D.; JUNGI, W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.91, n.1, p.1-12, 2003.
- WHITE, P.G.; WILSON, J.B. Differentiation of smooth and non-smooth colonies of *Brucellae*. *J. Bacteriol.*, v.61, n.2, p.239-240, 1951.
- WRIGHT, A.E. Report of the co-operative bovine brucellosis work in the United States. In: Annual Meet. U.S. 47, 1942, *Proc...Livestock Sanitary Association*. 1942. p149-154.
- WYCKOFF, J.H.III. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.395-415, 2002.
- YOUNG, E.J. An Overview of Human Brucellosis. *Clinical Infectious Diseases*, v.21, n.2, p.283-290, 1995.
- ZAMBRANO, A.J.; VILLALVA, F.M.; SCHURIG, G.G.; CHERWONOGRODZKY, J.W. Preliminary results for the vaccination of pregnant cattle with *Brucella abortus* strain 19 or *B. abortus* RB51. *Arch. Med. Vet.*, v. 27, n. extraordinario, p.119-123, 1995.