

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**Patogenicidade de cepas de *Brucella ovis* isoladas de campo e avaliação da proteção induzida pela cepa vacinal encapsulada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  em camundongos**

**Thaynara Parente de Carvalho**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária- UFMG  
2019**

**Thaynara Parente de Carvalho**

**Patogenicidade de cepas de *Brucella ovis* isoladas de campo e avaliação da proteção induzida pela cepa vacinal encapsulada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  em camundongos**

Dissertação apresentada à UFMG, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Curso:** Mestrado em Ciência Animal

**Área de Concentração:** Patologia Animal

**Orientador:** Renato de Lima Santos

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária – UFMG**  
**2019**

C331p

Carvalho, Thaynara Parente de, 1993-

Patogenicidade de cepas de *Brucella ovis* isoladas de campo e avaliação da proteção induzida pela cepa vacinal encapsulada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  em camundongos [manuscrito] / Thaynara Parente de Carvalho. – 2019.

34 f. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

1. Imunização - Teses. 2. Brucelose - Teses. 3. Ovino - Criação - Aspectos econômicos - Teses. 4. Vacinação - Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

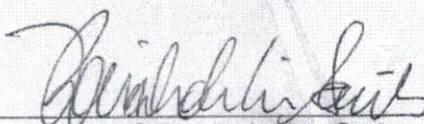
CDD - 636.089

## FOLHA DE APROVAÇÃO

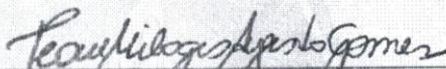
### THAYNARA PARENTE DE CARVALHO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL.

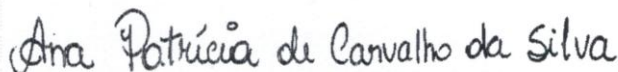
Aprovada em 31 de Janeiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Renato de Lima Santos  
Presidente - Orientador



Profª. Teane Milagres Augusto Gomes  
Instituto Federal Catarinense - IFC



Profª. Ana Patrícia de Carvalho da Silva  
Universidade Federal do Tocantins - UFT

Dedico à meu Pai (*in memoriam*)  
José Ribamar do Nascimento  
Pereira, que durante toda sua vida  
sempre me amparou e não me  
deixou que nada me faltasse.

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”

Edgar Allan Poe

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o misterioso. É ele a fonte de toda verdadeira  
arte e ciência”

Lemony Snicket

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a oportunidade de viver tudo que vivi e aprendi até hoje.

Ao prof. Renato e Prof Tatiane por terem me recebido de braços abertos. E são grandes exemplos de pesquisador, professor e pessoas.

A prof. Silvia, Silvana e Francisco de Assis (*in memoriam*) que durante a graduação na UFPI me orientou, guiou e me deu bons conselhos de vida que levarei durante toda a vida.

Aos meus colegas e amigos de pós-graduação, pois passamos por muitas dificuldades, mas sabemos dar boas risadas juntos. Em especial á Mirtha Suarez, Ayisa, Alexandre e Daniel.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Fabíola, Camila, Juliana Mol, Tatiana, Noelly, Monique, Frank, Cláudia, Renata, Nayara, Larissa, Andressa, Kateanne, Gabriela e Diego, que me auxiliaram em muitos experimentos e me ensinaram a ser uma pessoa melhor. que me deram todo o suporte.

A todos os professores da Patologia Veterinária, que me ensinaram, com didáticos e bons exemplos, muitos conceitos além da teoria.

Aos funcionários Leimar, Natalia, Valeria, Beth e Vitalina por todas as conversas, conselhos, risadas, ajuda e até mesmo o meu apelido carinhoso.

Aos amigos da Veterinária e do icB, que foram grandes companheiros durante todo este trajeto.

A meus amigos do Piauí, Thiago, Marina, Thiago Victor, Leticia, Andressa, Fernando e Lisboa que mesmo com mais de 2292 km me dão apoio e forças.

A minha família, principalmente a meu pai de criação José (*in memoriam*) todas as minhas conquistas são graças a o seu suporte. A minha mãe-vô, minhas tias e tios (Tamara, Telma, Tatiana e Tarcio) que sempre me deram apoio e auxilio em todas as decisões, por mais malucas que elas parecessem.

À Escola de Veterinária da UFMG, que permitiu meu crescimento profissional e a oportunidade de conhecer grandes exemplos de professores. A UFPI, minha escola de formação.

Ao CNPq, por me conceder a bolsa de estudos durante o mestrado.

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS .....	7
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO GERAL.....	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 Gênero <i>Brucella</i> .....	13
3.2 Brucelose ovina.....	14
3.3 Modelo Murino de infecção por <i>Brucella</i> sp. ....	15
3.4 Vacina viva atenuada <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Cepa bacterianas e cultivo.....	18
4.2 Animais.....	19
4.3 Análise de infectividade em modelo murino das cepas isoladas de campo de <i>B. ovis</i> .....	19
4.4 Curva de crescimento <i>in vitro</i> .....	19
4.5 Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7.....	19
4.6 Cinética de infecção <i>in vivo</i> .....	20
4.7 Vacinação dos camundongos.....	20
4.8 Histopatologia.....	20
4.9 Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 Infectividade em modelo murino das cepas isoladas de campo de <i>B. ovis</i> .....	21
5.2 Curva de crescimento <i>in vitro</i> em meio sólido.....	22
5.3 Infecção de macrófagos Raw 264.7.....	23
5.4 Cinética <i>in vivo</i> .....	24
5.5 Imunização com <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ e desafio com cepas isoladas de campo.....	26
6. CONCLUSÕES.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Espécies de bactérias do gênero <i>Brucella</i> com seus respectivos hospedeiros naturais mamíferos e potencial zoonótico. Tabela adaptada de Pappas (2010).....	14
Tabela 2	Cepas de <i>Brucella ovis</i> utilizadas neste estudo.....	18
Tabela 3	Proteção induzida pela vacina viva atenuada de <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato a 1% em camundongos C57BL/6 experimentalmente desafiados com diferentes cepas de <i>B. ovis</i> . * ** Diferenças estatisticamente significativas (*, p < 0,05; **, p < 0,01) entre os grupos vacinados e os não vacinados.....	27

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Arvore filogenética genotípica de isolados de <i>Brucella ovis</i> do estado do Rio Grande do sul e os 19 genótipos disponíveis no MLVAbank 2014. Adaptado de Dorneles et al. (2014).....	16
Figura 2	Infecção experimental de camundongos Balb/c com diferentes cepas de <i>Brucella ovis</i> isoladas de campo. Os camundongos foram infectados $1 \times 10^6$ UFC/animal de diferentes cepas isoladas de campo (100v, 203, 266L, 204, 252L, 286L e 94AV). Cada ponto representa valor de UFC/g recuperado do fígado (A) e baço (B) de cada camundongo aos 7 dpi. A barra em cada grupo representa a media de três animais. Todos os dados foram transformados para escala logarítmica e então submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Turkey. Diferenças estatisticamente significativas estão indicadas por asteriscos (**, p < 0.01).....	21
Figura 3	Histopatologia do fígado e baço de camundongos infectados com $1 \times 10^6$ UFC/animal de diferentes cepas de <i>Brucella ovis</i> isoladas de campo. Animal do grupo infectado com a <i>B. ovis</i> 94AV: (A) fígado com microgranulomas multifocais aleatórios moderados (setas); Hematoxilina e Eosina; barra = 200 $\mu$ m., em maior aumento (B) é possível observar infiltrado de macrófagos, neutrófilos e alguns linfócitos; hematoxilina e eosina; barra = 50 $\mu$ m. (C e D) Microgranulomas no baço (setas), caracterizados por infiltrado de macrófagos, neutrófilos e alguns linfócitos; Hematoxilina e Eosina; barras = 100 $\mu$ m e 50 $\mu$ m, respectivamente. Escore das lesões inflamatórias do baço (E) e fígado (F).....	22
Figura 4	Curva de crescimento <i>in vitro</i> de diferentes cepas de <i>Brucella ovis</i> (ATCC 25840, 94AV e 266L), estas foram cultivadas em placas de TSA com 1% hemoglobina a 37°C com 5% CO <sub>2</sub> .....	23
Figura 5	Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 com a cepa de referência de <i>Brucella ovis</i> (ATCC 25840) ou isolados de campo (94AV ou 266L). Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e infectados com as cepas de <i>B. ovis</i> com MOI de 1:100. As bactérias intracelulares foram recuperadas às 0, 4, 24 e 48 hpi. O tempo zero representa o número de UFC de bactérias após 1 hora de incubação com gentamicina. Os dados representam a media de dois experimentos em triplicata, com o seu desvio padrão. Todos os dados foram transformados para escala logarítmica e submetidos a ANOVA e as	24



médias foram comparadas pelo teste Turkey. Diferenças estatisticamente significativas estão indicadas por asteriscos (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,0001).....

- Figura 6 Cinética de infecção em camundongos fêmea Balb/c infectados com diferentes cepas de *Brucella ovis*. Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  UFC de *B. ovis* ATCC 25840, 94AV ou 266L por via intraperitoneal. Fragmentos de fígado (A) e baço (B) foram coletados para a contagem bacteriana aos 1, 7 e 30 dpi. Cada ponto representa a média de 5 animais e a barra indica o desvio padrão. Os dados sofreram transformação logarítmica seguida de ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no mesmo tempo são indicadas por asteriscos (\*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01). Aos 7 dpi no fígado as diferenças entre os grupos são representada por letras diferentes (p < 0.05)..... 25
- Figura 7 Mensuração do local de aplicação da vacina *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$ , o local foi mensurado com paquímetro durante todo o experimento. Os dados representam a média e desvio padrão da mensuração do local da aplicação dos grupos vacinados e do grupo PBS..... 26
- Figura 8 Lesões macroscópicas em camundongos desafiados com *Brucella ovis* isolada de campo (cepa 94AV). Proteção induzida pela vacina viva atenuada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada com alginato em C57BL/6 desafiado com diferentes cepas de *B. ovis*. Imagem representativa do fígado de um camundongo controle inoculado com PBS e desafiado com *B. ovis* 94AV (A) com nódulos esbranquiçados multifocais; e (B) fígado de camundongo imunizado com a cepa vacinal *B. ovis*  $\Delta abcBA$  sem lesões macroscópicas..... 28
- Figura 9 Contagem de UFC e escores de histopatologia do fígado de camundongos imunizados com a cepa vacinal *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$ , comparados aos controles inoculados com PBS e desafiados com a cepa de referência (ATCC 25840) e isolados de campo (cepas 266L e 94AV). (A) camundongos imunizados com a vacina experimental apresentaram menor carga bacteriana no fígado quando comparado aos animais do grupo não vacinado com o mesmo desafio. Os dados sofreram transformação logarítmica seguida de ANOVA e teste de Tukey. As colunas representam a média de cada grupo e a barra indica o desvio padrão. (B) Escores histopatológicos do fígado dos mesmos camundongos. Diferenças estatisticamente significativas, segundo o teste não paramétrico de Mann-Whitney, estão indicadas por asteriscos (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01, \*\*\*, p < 0,001)..... 28
- Figura 10 Escore das lesões inflamatórias no baço dos camundongos vacinados e não vacinados e desafiados com diferentes cepas de *Brucella ovis*. As colunas representam a mediana de cada grupo. O escore das lesões histopatológicas dos grupos vacinados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foi significativamente menor que os grupos não vacinados. Diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Mann Whitney são indicadas por asteriscos (\*p < 0,01)..... 29
- Figura 11 Fígado de camundongos imunizados com a cepa vacinal *Brucella ovis*  $\Delta abcB$  (A,C e E) e controles inoculados com PBS estéril (B, D e F) e desafiados com a cepa de referência *B. ovis* ATCC 25840 (A e B), ou com os isolados de campo: *B. ovis* 94 AV (C e D) ou *B. ovis* 266 L (E e F). 29

Microgranulomas no parênquima hepático com maior intensidade nos camundongos controle não vacinados, quando comparados aos camundongos vacinados.....

---

#### LISTA DE ABREVIATURAS

---

UFC	Unidade formadora de colônia
TSA	Agar tripton de soja
PBS	Tampão fostato
Hpi	Horas pós infecção
Dpi	Dias pós infecção
SFB	Soro fetal bovino
MOI	Multiplicidade de infecção
Log	Logaritmo
MLVA	Análise variável de múltiplos <i>locus</i> que tendem a se repetir
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 meio
OD	Densidade óptica
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
NaCl	Cloreto de Sódio
MOPS	3-(N-morfolino) propanesulfônico
ANOVA	Análise de Variância
T4SS	Sistema de secreção do tipo 4

## RESUMO

*Brucella ovis* é responsável por perdas econômicas e reprodutivas em rebanhos ovinos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a infecção com as cepas isoladas de campo de *B. ovis* em modelo murino e avaliar a eficiência vacinal da mutante *B. ovis*  $\Delta abcAB$  para proteção contra desafio com as cepas isoladas de campo. Foram utilizadas sete cepas isoladas de campo foram capazes de colonizar e provocar lesões no fígado e no baço de camundongos após sete dias pós-infecção. Após triagem, duas cepas foram selecionadas para a melhor caracterização (*B. ovis* 94 AV and *B. ovis* 266L). Ambas apresentaram crescimento em placa de cultivo semelhante ao da cepa de referência *B. ovis* ATCC 25840. A vacinação com a cepa de *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada com alginato a 1% foi capaz de proteger camundongos desafiados com as cepas isoladas de campo, com os seguintes índices de proteção: 0,751, 1,736 e 2,746, para camundongos desafiados com *B. ovis* ATCC 25840, *B. ovis* 94 AV e *B. ovis* 266 L, respectivamente. Estes resultados demonstraram que as cepas isoladas de campo de *B. ovis* são capazes de infectar e induzir lesão em camundongos experimentalmente infectados. O uso da cepa mutante atenuada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  para vacinação de fêmeas C57BL/6 desafiados com diferentes cepas de *B. ovis* induziu proteção nos camundongos desafiados com diferentes cepas de *B. ovis*. Deste modo, mostrando-se eficiente na proteção das cepas de campo de *B. ovis*.

**Palavras-chave:** Imunização, brucelose ovina, mutante encapsulada, cepas isoladas de campo

## ABSTRACT

*Brucella ovis* is responsible for economic and reproductive losses in sheep herds. The goal of this study was to characterize the infection with *B. ovis* field isolates in a murine model, and to evaluate protection induced by the *B. ovis*  $\Delta abcBA$  vaccine strain in mice challenged with these field isolates. All field strains were able to colonize and cause lesions in the liver and spleen of infected mice. After an initial screening, two strains were selected for further characterization (*B. ovis* 94 AV and *B. ovis* 266 L). Both strains had an *in vitro* growth kinetics that was similar to the reference strain *B. ovis* ATCC 25840. Vaccination with *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulated with 1% alginate was protective against the challenge with field strains of *B. ovis*, with the following protection indexes (log difference of bacterial loads in the spleen of vaccinated and non vaccinated mice): 0.751, 1.736, and 2.746, for mice challenged with *B. ovis* ATCC25840, *B. ovis* 94 AV, and *B. ovis* 266 L, respectively. In conclusion, these results demonstrated that *B. ovis* field strains were capable of infecting and inducing lesions in experimentally infected mice. The attenuated vaccine strain *B. ovis*  $\Delta abcBA$  induced protection in mice challenged with different strains of *B. ovis*, including field isolates.

**Keywords:** Immunization, ovine brucellosis, encapsulated mutant, isolated field strains

## 1. INTRODUÇÃO

As bruceloses são doenças infecciosas causadas por bactérias do gênero *Brucella*, que são cocobacilos, Gram-negativo, intracelulares facultativos que infectam seres humanos, animais domésticos e selvagens (Gysles et al., 2011). A brucelose ovina provoca perdas reprodutivas e econômicas em rebanhos ovinos amplamente distribuído pelo mundo, tendo como agentes etiológicos a *Brucella melitensis* e *B. ovis*, no Brasil a doença é causada somente pelo último agente (Poester et al., 2013). Além do ovino, *B. ovis* infecta caprinos desafiados experimentalmente (Burguess et al., 1985) e cervídeos em condições naturais (Ridler et al., 2000). Recentemente, foram demonstradas evidências sorológicas de infecção natural por *B. ovis* em caprinos na ausência de ovinos (Costa et al., 2016).

Os sinais clínicos e lesões decorrentes da infecção por *B. ovis* são mais comuns nos machos, que desenvolvem epididimite uni ou bilateral e vesiculite seminal. Nesses casos, há perda na qualidade espermática caracterizada pelo aumento dos defeitos de cauda e presença de células inflamatórias no sêmen e, conseqüente, subfertilidade ou infertilidade (Carvalho Júnior et al., 2012; OIE, 2015). Nas fêmeas, a doença é usualmente assintomática, mas pode ocorrer endometrite, vaginite e, mais raramente, abortos, natimortalidade e nascimento de crias fracas (Grilló et al., 1999).

A prevenção da brucelose ovina é feita por meio da vacinação. A vacina utilizada em alguns países é a Rev-1, uma vacina viva atenuada de *B. melitensis* (Ridler et al., 2010). Entretanto, esta vacina interfere em testes sorológicos para espécies de *Brucella* com LPS liso, provoca aborto quando utilizado em fêmeas gestantes e está envolvida em inúmeros acidentes vacinais que levam a infecções em humanos. Além disso, *B. melitensis* é considerada exótica em alguns países, dentre os quais o Brasil, impossibilitando o uso desta vacina nestas regiões (Blasco, 1997; Blasco e Díaz, 1993). No Brasil, o controle e prevenção da brucelose ovina convencionados são através da identificação de ovinos infectados no rebanho e eliminação do mesmo. Não havendo vacina disponível no mercado para a prevenção desta doença.

*Brucella* spp., assim como outras bactérias intracelulares, possuem várias estratégias para conseguir um nicho de multiplicação seguro dentro da célula do hospedeiro (Gorvel e Moreno, 2002; Harze, 2002). Dentre esses mecanismos, há sistemas transportadores tipo ABC que são responsáveis pelo transporte de vários substratos, como poliaminas (Igarashi et al., 2001), peptídeos (Detmers et al., 2001), aminoácidos (Hosie et al., 2001) e ferro (Danese et al., 2004). Nas bactérias do gênero *Brucella* esses sistemas são essenciais para o transporte de nutrientes. A *B. ovis* possui 29 pseudogenes relacionados a regiões codificadoras dos sistemas transportadores tipo ABC, assim ela não consegue transportar algumas substâncias como poliamina, eritritol, e glicina (Jenner et al., 2009). A deleção parcial de um desses sistemas (*B. ovis*  $\Delta abcAB$ ), resulta em uma cepa atenuada *in vitro* e *in vivo* (Silva et al., 2011). A mutante atenuada quando usada como cepa vacinal resulta em proteção em modelo murino (Silva et al., 2015a) e quando testada no hospedeiro natural, ovino, mostrou a capacidade de prevenir o desenvolvimento da doença, abolindo lesões macro e microscópicas, alterações clínicas, eliminação da cepa virulenta pelo sêmen e urina, e impedindo a colonização de órgãos alvo, ou seja, em condições de infecção experimental, a cepa vacinal produz imunidade estéril em carneiros (Silva et al., 2015b).

O estudo das cepas circulantes de *Brucella* spp. isoladas diretamente do hospedeiro têm se mostrado uma ferramenta útil na descrição e caracterização de novas espécies, biovars e cepas com diferentes potenciais de patogenicidade diferente das cepas conhecidas (Jahans et al., 1997; Cloeckaert et al., 2003; Scholz et al., 2008; Scholz et al., 2010; Hofer, et al., 2012; Dorneles et al., 2014; Whatmore et al., 2014). Uma das ferramentas utilizadas para esta caracterização é uma análise variável de múltiplos *locus* que tendem a se repetir (MLVA), esta técnica é utilizada para a caracterização molecular e rastreamento epidemiológico da origem dos isolados (Whatmore et al., 2007). A análise de diversas cepas de *B. ovis* isoladas do sêmen de ovinos naturalmente infectados de *B. ovis* originários da região sul do Brasil, demonstrou diversidade genética nessas cepas circulantes (Dorneles et al., 2014).

Os estudos de espécies *Brucella* sp. isoladas diretamente do hospedeiro são geralmente restritos à descrição de novas espécies (Scholz et al., 2010; Whatmore, 2014; Scholz et al., 2016). A maioria dos estudos comparando *Brucella* que as mesmas espécies são geralmente relacionadas com cepas com mutações laboratoriais. *Brucella* spp., como outras bactérias, é capaz de sofrer mutações espontâneas, dependendo da condição ambiental à qual está exposta, como temperatura e umidade ambiente, defesa das células do hospedeiro e ambiente intracelular. Um exemplo disso é a cepa vacinal *B. abortus* S19, isolada em 1923 do leite de uma vaca Jersey (Buck, 1930), que após ser acidentalmente deixada à temperatura ambiente por um ano apresentou perfil atenuado (Graves, 1943). Não há trabalho comparando a patogenicidade de linhagens da mesma espécie de *B. ovis* isoladas com diferentes genótipos na MLVA16 (Dorneles et al., 2014). Este estudo caracterizou o comportamento *in vivo* e *in vitro* em linhagens isoladas de *B. ovis* no modelo murino. As informações sobre lesões e sinais clínicos causados por estas cepas no hospedeiro natural são desconhecidas, o que se sabe é que essas cepas estavam sendo eliminadas para o meio ambiente pela sêmen (Dorneles et al., 2014), tornando esses animais importantes fontes de infecção para o rebanho.

## 2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar isolados de campo de *B. ovis* na infecção de macrófagos cultivados *in vitro* e no modelo murino, avaliando a eficiência da vacinação com cepa atenuada *B. ovis*Δ *abcAB* para proteção contra desafio experimental com essas cepas isoladas de campo.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar cinética de infecção das amostras de *B. ovis* isoladas de campo em macrófagos RAW 264.7;
- Analisar e caracterizar o potencial de infectividade e cinética das cepas isoladas de campo *in vivo* em camundongos Balb/c;
- Avaliar a capacidade de proteção da cepa vacinal viva atenuada *B. ovis* Δ*abcBA* no desafio com diferentes cepas isoladas de campo de *B. ovis*.
- 

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Gênero *Brucella*

Brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella* pertencente à família das 2-α-Proteobacteriaceae. Essas bactérias são cocobacilos Gram-negativos, pequenos, não encapsulados, não esporulados, não moveis e intracelulares facultativos (Gysles et al., 2011).

Atualmente são descritas doze espécies no gênero descrita em mamíferos (Tabela 1) (Pappas, 2006; Whatmore et al., 2009; Whatmore et al., 2014). São descritas seis espécies clássicas: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. neotomae* e *B. ovis*, sendo as cinco primeiras com potencial zoonótico (Gysles et al., 2011; Esquivel et al., 2017). Além das espécies clássicas de *Brucella* spp., outras foram identificadas nos últimos anos em mamíferos e anfíbios (Tabela 1), como a *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis* descrita em cetáceos e focas, respectivamente (Jahans et al., 1997; Cloeckart et al., 2003). A *Brucella microti* isolada de roedores (*Microtus arvalis*) (Scholz et al., 2008), *Brucella inopinata* isolada de paciente humano (Scholz et al., 2010), *Brucella vulpis* isolada do linfonodo de raposas vermelhas (Hofer et al., 2012) e *Brucella paponis* isolada de babuínos (Whatmore et al., 2014). *Brucella* spp. podem ser classificadas em lisas ou rugosas de acordo com a presença ou ausência do polissacarídeo O no

lipopolissacarídeo (LPS) em sua membrana (Gysles et al., 2011). Recentemente foi descrita uma *Brucella* sp. flagelada isolada de uma espécie de sapo (*Ceratophrys ornata*), porém há poucas informações sobre esta (Soler et al., 2016).

Tabela 1. Espécies de bactérias do gênero *Brucella* com seus respectivos hospedeiros naturais mamíferos e potencial zoonótico. Tabela adaptada de Pappas (2010).

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Estrutura do LPS</b>	<b>Potencial zoonótico</b>
<i>Brucella melitensis</i>	Ovinos e caprinos	Lisa	Alto
<i>Brucella abortus</i>	Bovinos e bubalinos	Lisa	Moderado
<i>Brucella suis</i>	Suínos	Lisa	Moderado
<i>Brucella canis</i>	Canídeos	Rugosa	Baixo
<i>Brucella neotomae</i>	Roedores	Lisa	Baixo
<i>Brucella ovis</i>	Ovinos e cervídeos	Rugosa	Ausente
<i>Brucella ceti</i>	Golfinhos e baleias	Lisa	Baixo
<i>Brucella pinnipedialis</i>	Foca	Lisa	Baixo
<i>Brucella microti</i>	Roedores	Lisa	Não relatado
<i>Brucella inopinata</i>	Desconhecido	Lisa	Baixo
<i>Brucella vulpis</i>	Raposa vermelha	Lisa	Não relatado
<i>Brucella papionis</i>	Babuíno	Lisa	Não relatado

As bactérias do gênero *Brucella* são capazes de multiplicar em macrófagos, células dendríticas e células trofoblásticas (Martirosyan e Gorvel, 2013). Já foi descrita a capacidade desses patógenos por multiplicarem em outros tipos celulares, como em algumas células da microglia (Rodríguez et al., 2017), fibroblastos (Hamer, 2014) e células epiteliais (Hielpons et al., 2015). Por conta de seu ciclo intracelular, *Brucella* spp. é menos exposta a efeitos de antibióticos, o que dificulta o tratamento terapêutico da doença (Gorvel e Moreno, 2002; Martirosyan e Gorvel, 2013). O tratamento para animais de produção é proibido no Brasil. A terapia é utilizada somente para casos de brucelose em humanos, sendo os antimicrobianos mais utilizados são tetraciclina, aminoglicosídeos, rifamicina, cefalosporinas e quinolonas (Shehabi et al., 1990).

Os programas de controle de brucelose bovina e caprina são baseados principalmente na vacinação preventiva dos animais (Corbel, 2006), que é feita, majoritariamente, com vacinas vivas atenuadas, pois estas proporcionam melhor proteção. As cepas vacinais mais utilizadas são a *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e *B. melitensis* REV-1 (Nicoletti, 1984; Ridler et al., 2010; Corbel, 2006; Carvalho et al., 2016). Entretanto, estas vacinas interferem em testes sorológicos, provocam aborto quando utilizadas em fêmeas gestantes e estão associadas a inúmeros acidentes vacinais que levam a infecções em humanos. Além disso, *B. melitensis*, não é reportada em alguns países, dentre eles o Brasil, impossibilitando o uso da REV-1 nestas regiões (Blasco e Díaz, 1993; Blasco, 1997). Visto estes problemas, pesquisadores estão a procura de vacinas com maiores índices de proteção e que tenham mínimos efeitos deletérios para os rebanhos e para as pessoas.

### 3.2 Brucelose ovina

A brucelose ovina por *B. ovis* é clinicamente caracterizada nos machos por epididimite unilateral e mais ocasionalmente bilateral, vesiculite seminal, diminuição da qualidade espermática, aumento de defeitos de cauda e presença de células inflamatórias no ejaculado (Carvalho Júnior et al., 2012). Nas fêmeas, *B. ovis* pode causar endometrite severa e, mais raramente, abortos, natimortalidade e nascimento de crias fracas com elevada taxa de mortalidade neonatal (Grilló et al., 1999).

*B. ovis* é uma espécie rugosa, ou seja, seu LPS (lipopolissacarídeo) não contém a cadeia O. Sendo considerada uma das principais causas de perdas reprodutivas em ovinos (Poester et al.,

2013). Em condições experimentais, foi demonstrado o potencial de infecção da *B. ovis* em caprinos (Burguess et al., 1985). Além disso, foi descrito quadros de infecções naturais em cervídeos com quadros de epididimite (Ridler et al., 2000), tendo sido recentemente demonstradas evidências sorológicas de infecção natural por *B. ovis* em caprinos na ausência de ovinos (Costa et al., 2016).

Em infecção experimental pela via de inoculação subcutânea, os animais desenvolvem quadros caracterizados por epididimite histio-linfo-plasmocitaria em diferentes graus de intensidade. As lesões iniciais progridem para fibrose intersticial e degeneração epididimária com formação de cistos intra-epiteliais, o que pode levar à ruptura do ducto epididimário, extravasamento de espermatozoides para o interstício e, conseqüentemente, à formação de granuloma espermático (Carvalho Júnior et al., 2012).

Os sítios de infecção primária são a mucosa oral, conjuntival, cervico-vaginal, prepucial, retal ou nasal. Ocorrendo pelo contato direto das mucosas do animal saudável e o infectado (Burgess, 1982). Raramente ocorre transmissão materno-fetal, porém o microorganismo foi demonstrado no leite materno, assim sendo esta uma possível via de infecção (Grilló et al., 1999). Após atravessar as mucosas, *B. ovis* atinge os linfonodos de drenagem regional e, em seguida, ocorre bacteremia. O patógeno então atinge órgãos como fígado, rim, baço, e órgãos reprodutores, em torno de 30 dias após a infecção (Biberstein et al., 1964).

Carneiros infectados com *B. ovis* podem apresentar assimetria da cauda do epidídimo, associado à sensibilidade escrotal. Ao exame ultrassonográfico, observam-se nódulos anecoicos na cauda do epidídimo (Carvalho Júnior et al., 2012). Para confirmar as suspeitas clínicas podem-se utilizar técnicas de diagnóstico diretas, com a identificação do patógeno, e indiretas, que identificam anticorpos ou antígenos bacterianos (Burguess, 1982). Os testes sorológicos são amplamente utilizados pelos programas de controle e erradicação (Mol et al., 2012). Para a detecção da *B. ovis* há testes sorológicos para detecção de anticorpos, como o teste de imunodifusão em gel agarose (IDGA), fixação do complemento, e ensaio imunoenzimático (ELISA) (Marím et al., 1989). No entanto, o isolamento da bactéria é considerado o padrão ouro para o diagnóstico (Al Dahouket et al., 2003). O diagnóstico definitivo pode ainda ser feito por meio de técnicas moleculares como a PCR com amostras de sêmen, lavado prepucial e urina. Sendo esta técnica considerada mais prática e rápida que técnicas bacteriológicas (Xavier et al., 2010; Costa et al., 2013), permitindo inclusive o diagnóstico diferencial com outros patógenos que causam epididimite (Moustacas et al., 2013; Moustacas et al., 2015).

A caracterização molecular de bactérias isoladas diretamente dos animais naturalmente infectados é uma ferramenta útil na caracterização epidemiológica dos agentes infecciosos. A caracterização molecular através da análise de múltiplos *locus* que tende a se repetir (MLVA) de *Brucella* spp. mostra-se como uma poderosa para caracterização epidemiológica de isolados de *Brucella* spp. de diferentes animais e humanos (Al Dahouk et al., 2007). Dorneles et al. (2014), caracterizou através do MLVA16 treze cepas de *B. ovis* isoladas do Rio Grande do Sul de carneiros naturalmente infectados. Por meio desta caracterização, foi demonstrada uma grande variabilidade genética demonstrando quatorze tipos de isolados de *B. ovis* com pelo menos dois complexos clonais (Figura 1).

### 3.3 Modelo Murino de infecção por *Brucella* sp.

Por muitos anos a brucelose foi estudada nos seus hospedeiros naturais, entretanto, estudos experimentais em ruminantes e suínos não é uma prática viável tanto economicamente quanto por restrições éticas. O modelo murino no estudo da brucelose começou a ser usado em 1911 para testes de novas vacinas para brucelose. Pouco tempo depois estes animais foram utilizados para identificação de *Brucella* spp. em amostras de animais com suspeita da doença, avaliação de virulência da cepa e lesões em alguns órgãos (Grilló et al., 2012). As características deste



modelo de infecção estão ligadas a dose de infecção, a cepa utilizada, via de inoculação, particularidades genéticas do camundongo, idade e características fisiológicas individuais dos camundongos (Enright et al., 1990; Baldwin e Parent, 2002; Ko e Splinter, 2003; Silva et al., 2010; Grilló et al., 2012; Carvalho et al., 2016).

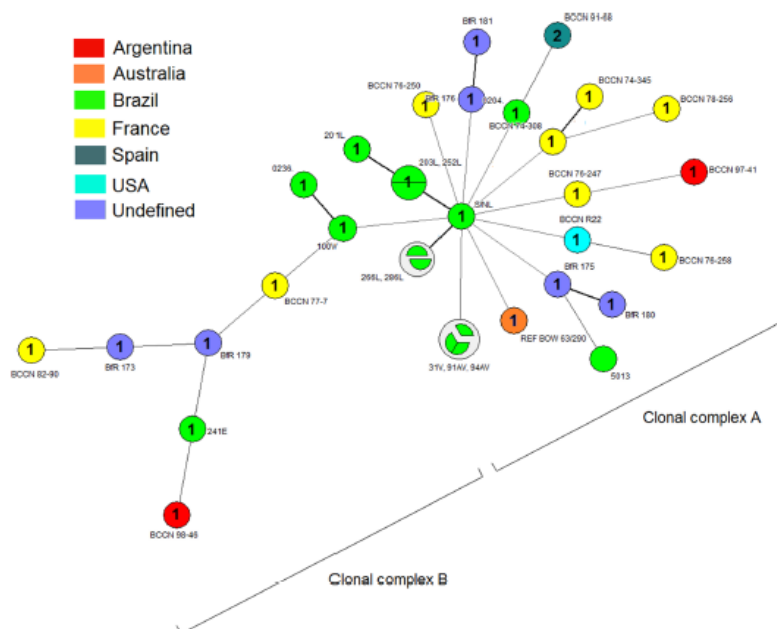


Figura 1. Árvore filogenética genotípica de isolados de *Brucella ovis* do estado do Rio Grande do sul e os 19 genótipos disponíveis no MLVAbank 2014. Adaptado de Dorneles et al. (2014).

As vias de infecção experimental de *Brucella* spp. utilizadas com mais frequência são: intraperitoneal, intravenosa (Silva et al., 2010; Pardon e Marlin, 1976), respiratória (Kahl-McDonagh et al., 2007; Smither et al., 2009), conjuntival (Marín et al., 1990) e oral (Delpino et al., 2007). Outra via de infecção é a via subcutânea, sendo comumente usada para ensaios de proteção vacinal induzida por cepas atenuadas (Marín et al., 1990, Silva et al., 2015a). Para estudos com *B. ovis* as vias utilizadas com mais frequência são a intraperitoneal e subcutânea (Silva et al., 2010; Silva et al., 2015a).

Várias linhagens de camundongos são suscetíveis a *Brucella* spp. porém a infecção dificilmente induz mortalidade ou sinais clínicos relevantes em camundongos. Exceto em camundongos *knockouts* para o gene IFN-gama, que são utilizadas para curvas respostas dose/sobrevivência (Stevens et al., 1992). São necessárias altas doses para indução de mortalidade. Sinais clínicos são raramente observados, sendo de difícil avaliação clínica (Cheers e Ho, 1983; Grilló et al., 2012). Camundongos *knockouts* e com mutações que afetam a resposta imune inata ou adaptativa são usados no estudo da imunopatologia da brucelose (Baldwin e Goenka, 2007; Grilló et al., 2012).

Os principais órgãos para a avaliação da infecção em camundongos são o fígado e o baço. No geral, para avaliação de colonização bacteriana e virulência da cepa de *Brucella*, é avaliado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) e lesões histopatológicas ao longo do curso da infecção (Enright et al., 1990; Baldwin e Parent, 2002; Ko e Splinter, 2003; Silva et al., 2010; Grilló et al., 2012).

No geral, as cepas de *Brucella* spp. lisas podem ser classificadas em três categorias: virulentas, atenuadas e avirulentas. Esta classificação é feita de acordo com o comportamento de colonização e persistência da *Brucella* no baço e fígado de camundongos infectados. São consideradas virulentas as que persistem nos órgãos por longos períodos, e.g. por até seis meses

(Plommet e Plommet, 1988). As cepas atenuadas conseguem se multiplicar no baço e fígado na fase inicial, porém persistem por curto período de tempo mesmo com inoculação de altas doses infectantes (Sagari et al., 1988; Silva et al., 2011). As cepas avirulentas não conseguem se multiplicar e nem persistir, independentemente da dose infectante utilizada (Grilló et al., 2012). Esta classificação é pouco descrita nas espécies rugosas.

O modelo de infecção em camundongos é amplamente aplicado para estudo de espécies de *Brucella* naturalmente lisas e seus mutantes (Grilló et al., 2012). O número de estudos com cepas rugosas ainda é pequeno. Atualmente, utiliza-se o camundongo como um bom modelo experimental para o estudo patogenicidade da *B. ovis*. Este modelo de infecção é fundamental para estudos mais aprofundados do microorganismo, como resposta imunológica do hospedeiro ao desafio por *B. ovis*, fatores de virulência e testes de vacinas (Jiménez-de-Bagüés et al., 1993; Silva et al., 2011; Sá et al., 2012; Silva et al., 2015a).

### 3.4 Vacina viva atenuada *B. ovis* $\Delta abcBA$

Para sobreviver e se multiplicar no ambiente intracelular bactérias possuem varias estratégias para atingir um nicho seguro dentro da célula do hospedeiro. De maneira geral, *Brucella* spp. não possuem fatores de virulência clássicos descrito comumente em outras bactérias Gram-negativas, como fímbrias, flagelos, plasmídeos, esporo, exotoxinas e cápsula. Seus fatores de virulência são direcionados para a invasão, sobrevivência intracelular, a adaptação ao ambiente intracelular principalmente nas células de origem fagocitárias e multiplicação em outras células do hospedeiro (Gorvel e Moreno, 2002; Harze, 2002).

Sistemas transportadores ABC são conservado entre bactérias, têm substratos variados realizando a importação ou exportação e, no caso de bactérias do gênero *Brucella*, são numerosos e, em alguns casos, redundantes (Jenner et al., 2009). Este sistema é composto por vários genes que codificam proteínas das células bacterianas, sendo responsáveis pelo transporte de substratos através da bicamada lipídica realizando importe de nutrientes e/ou exportação de tóxicos (Davisson e Chen, 2004). Ao analisar o genoma de *B. ovis* foi identificada uma ilha genômica exclusiva desta espécie (Tsolis et al., 2009). A ilha inclui genes que codificam um sistema transportados do tipo ABC que necessário para patogenicidade de *B. ovis*, passando a ser chamada de BOPI-1 – do inglês *B. ovis* pathogenicity island 1 (Silva et al., 2011). Embora os sistemas transportadores do tipo ABC sejam abundantes no genoma de *Brucella* spp., muitos desses genes são pseudogenes em *B. ovis* (Jenner et al., 2009), o que suporta a hipótese de que o sistema transportador codificado pela BOPI-1 seja essencial para patogenicidade por substituir algum outro que tenha conformação de pseudogene em *B. ovis*. A deleção parcial dos genes codificadores deste transportador ABC, resulta em uma cepa mutante (*B. ovis*  $\Delta abcAB$ ) atenuada *in vitro* e *in vivo* (Silva et al., 2011). Além disso, esta deleção afeta de maneira pós-transcricional a expressão do sistema de secreção tipo 4 (T4SS) codificado pelo operon *virB*, outro fator de virulência importante para a *Brucella* (Silva et al., 2014).

O sistema T4SS codificado pelos operon *virB* é essencial para a sobrevivência e multiplicação intracelular de *Brucella* spp., inclusive *B. ovis* (Sá et al., 2012). O T4SS é responsável pela modulação da maturação dos vacúolos contendo *Brucella*, inibindo a fusão com o lisossomo, e exposição das bactérias a enzimas lisossomais (Cascales e Christie, 2003; Macedo et al., 2015). Portanto, na ausência do transportador ABC, há comprometimento no sistema T4SS, e *B. ovis* perde a capacidade de sobreviver e multiplicar em macrófagos, resultando em um perfil atenuado semelhante a *B. ovis* com o T4SS codificado pelo operon *virB* afuncional (Silva et al., 2011; Sá et al., 2012; Silva et al., 2014; Macedo et al., 2015).

Após a confirmação do fenótipo atenuado da cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$ , esta foi submetida a testes para avaliação do seu potencial para uso como cepa de vacina viva atenuada. Nos ensaios vacinais em camundongos a cepa foi capaz de induzir proteção (Silva et al., 2015), diminuindo a

carga bacteriana do baço e fígado dos camundongos experimentalmente vacinados. A forte atenuação, a cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  induz o mesmo perfil de resposta imunológica e humoral e celular em carneiros (Silva et al., 2013). A vacina mostrou-se capaz de prevenir o desenvolvimento de sinais clínicos e lesões macro e microscópicas, prevenir alterações espermáticas e a eliminação do patógeno no sêmen e urina e impede a colonização de órgãos alvo pelo patógeno nos carneiros. Portanto, em condições experimentais, a vacina promoveu imunidade estéril, prevenindo a eliminação de bactéria pelo animal no ambiente (Silva et al., 2015b).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas e cultivo

Todas as cepas de *B. ovis* isoladas de campo utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas por Dorneles et al. (2014) previamente isoladas do sêmen de animais naturalmente infectados. *B. ovis* ATCC 25840 e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  previamente descritas por Silva et al. (2015) foram utilizadas neste estudo (Tabela 2). O cultivo bacteriano foi feito em placas de ágar triptona de soja (TSA) suplementado com 1% de hemoglobina e incubado por 3 dias a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. A cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foi cultivada em meio TSA com 1% de hemoglobina e 100 µg/mL de canamicina.

Após o crescimento, as bactérias foram ressuspensas em salina tampão fosfato (PBS pH 7,4) e a concentração de bactérias foi estimada usando um espectrofotômetro (BioRad, Hercules, CA) mensurada pela densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) considerando que na OD<sub>600</sub> de 0,250 a concentração estimada de bactéria seja 3x10<sup>9</sup> UFC/mL, a partir dessa estimativa foi realizado a padronização dos inóculos por meio de diluições. A concentração foi confirmada por plaqueamento em placas de TSA com 1% de hemoglobina.

Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nos tecidos dos camundongos infectados, os órgãos foram colocados em 2 ml de PBS, homogenizados e semeados em placas de TSA com 1% de hemoglobina e a contagem foi feita de 3-6 dias após o plaqueamento.

A manipulação, cultivo e infecções com *B. ovis* foram feitas em fluxo laminar no laboratório de biossegurança nível 2, no Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da UFMG.

Tabela 2. Cepas de *Brucella ovis* utilizadas neste estudo.

Cepas	Cidade	País	Ano de isolamento/desenvolvimento
<i>B. ovis</i> ATCC 25840	–	Austrália	1960
<i>B. ovis</i> $\Delta abcAB$	–	–	2011
<i>B. ovis</i> 94AV	Livramento, RS	Brasil	1995
<i>B. ovis</i> 266L	Livramento, RS	Brasil	1995
<i>B. ovis</i> 0204	Uruguaiana, RS	Brasil	1997
<i>B. ovis</i> 286L	Livramento, RS	Brasil	1995
<i>B. ovis</i> 252L	Livramento, RS	Brasil	1995
<i>B. ovis</i> 100V	Livramento, RS	Brasil	1995
<i>B. ovis</i> 203L	Livramento, RS	Brasil	1995

### 4.2 Animais

A experimentação animal deste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Minas Gerais (protocolos 107/2015 e 41/2018). Todos os

animais foram submetidos a um período de adaptação ambiental por 7 dias. Os camundongos utilizados eram fêmeas da linhagem Balb/c ou C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade. Estes foram mantidos em gaiolas, a 25°C, com ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com água e ração *ad libitum*.

Os camundongos utilizados nos experimentos são fêmeas, com idade de 6 a 8 semanas. Todos os animais utilizados neste trabalho foram submetidos a eutanásia utilizando protocolo de sobredose anestésica com hidróxido de xilazina a 2% (0.1 mg/kg) e hidróxido de cetamina a 1% (35 mg/kg) administrados pela via intraperitoneal, após a anestesia e tempo de dessensibilização do animal foi realizado deslocamento cervical.

#### 4.3 Análise de infectividade em modelo murino das cepas isoladas de campo de *B. ovis*

Para a triagem das cepas isoladas de campo, foram utilizados 21 camundongos fêmeas Balb/c de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram divididos em sete grupos de 3 animais, que foram infectados com  $1 \times 10^6$  UFC/animal de cada cepa de campo de *B. ovis* (203L, 100V, 252L, 286L, 0204, 266L ou 94AV) por via intraperitoneal. A eutanásia foi realizada aos 7 dias pós infecção. Fragmentos de baço e fígado foram coletados para análise bacteriológica e histopatológica.

#### 4.4 Curva de Crescimento *in vitro*

Foi avaliado o crescimento *in vitro* de *B. ovis* ATCC 25840 e duas cepas isoladas de campo (94AV e 266L) em meio sólido. Para isso foram preparados inóculos com  $10^3$  UFC/mL das cepas em PBS, e 100  $\mu$ L de cada inóculo foi plaqueado em placas de TSA suplementado com 1% de hemoglobina sem antibiótico. Os tempos de crescimento analisados foram 0, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós inoculação (hpi). Todas as placas foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Para a recuperação bacteriana foi utilizado 1 mL de PBS nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas, e 2 mL nos tempos 72, 96 e 120 hpi. Para a contagem bacteriana foram plaqueados 100  $\mu$ L do PBS recuperado de cada placa submetido a diluições seriadas na base de 10 e semeadas todas as diluições na mesma placa, pela técnica do *drop counting* (25  $\mu$ L de cada diluição). O experimento foi feito em duplicata. O total de UFC por mL foi determinado para cada tempo.

#### 4.5 Infecção *in vitro* de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7

Macrófagos murinos da linhagem comercial RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI (Gibco; Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram distribuídas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  macrófagos/poço) e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os macrófagos foram infectados com *B. ovis* ATCC 25840 ou com um dos isolados de campo (*B. ovis* 94AV ou 266L) com multiplicidade de infecção (MOI) de 100. As placas foram então centrifugadas a  $1000 \times g$  por 5 minutos a 20°C e incubadas a 37°C por 30 minutos. Os macrófagos foram lavados com PBS 1X, pH 7,4 e então incubados com RPMI suplementado com 10% de SFB e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina (Invitrogen, São Paulo, Brazil) a 37°C por 1 h com a finalidade de matar as bactérias extracelulares. Cada poço foi lavado novamente com PBS, e os macrófagos foram lisados por osmose, utilizando água destilada estéril por 20 minutos nos tempos de 0, 4, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi). As bactérias intracelulares foram recuperadas após a lise dos macrófagos e foram submetidas a diluições seriadas em PBS e plaqueadas em duplicata em placas de TSA com 1% de hemoglobina, incubadas por 3-6 dias a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, seguido da determinação de UFC/poço. Este experimento foi realizado em triplicata e repetido em dois experimentos distintos.

#### 4.6 Cinética de infecção *in vivo*

Para a cinética de infecção *in vivo* foram utilizados 45 camundongos fêmeas Balb/c de 6 a 8 semanas de idade infectados com  $1 \times 10^6$  UFC/animal de *B. ovis* ATCC 25840, 94AV ou 266L pela via intraperitoneal. Estes animais foram divididos em 9 grupos de 5 animais por cepa e por tempo com grupos de 5 animais. A eutanásia foi feita em diferentes dias pós infecção (1, 7 e 30 dias) foram avaliados a carga bacteriana e as lesões histopatológicas do fígado e do baço desses animais.

#### 4.7 Vacinação dos camundongos

O encapsulamento foi realizado como previamente descrito por Silva et al. (2015) e Arenas-Gamboa et al. (2008) onde  $2 \times 10^{10}$  UFC de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foi ressuspendida em 2 mL de solução de alginato a 1% (Sigma-Aldrich) e, utilizando uma agulha de 33G a solução foi gotejada em 10 mL de solução de polimerização (solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,5 mM) para cada mL e bacteriana em solução de alginato, seguido de 15 minutos de homogeneização. Em seguida, as cápsulas foram lavadas duas vezes com solução de MOPS 10 mM, com 0,85% NaCl (pH 7,4) por 5 minutos. Após as lavagens foi adicionada solução de poli-L-lisina a 0,05% diluída em solução de alginato a 1%, e homogeneizado durante 5 minutos. Durante o procedimento de encapsulamento houve perda bacteriana estimada em 1 Log. As partículas foram inoculadas em 15 camundongos fêmeas C57BL/6 pela via subcutânea, com a dose final de  $1 \times 10^8$  UFC por animal. Outros 15 camundongos foram inoculados com PBS estéril pela mesma via de aplicação. O tamanho e integridade da cápsula, bem como a viabilidade bacteriana no interior da cápsula, foi previamente demonstrado por Silva et al. (2015). Quatro semanas após a imunização, os camundongos foram desafiados com  $1 \times 10^6$  UFC por animal de *B. ovis* ATCC 25840 e isolados de campo (*B. ovis* 94AV ou 266L) pela via intraperitoneal. Duas semanas após o desafio os animais foram eutanasiados. Fígado, baço e pele e subcutâneo do local de aplicação foram coletados para a avaliação bacteriana e histopatológica. A partir da diferença carga bacteriana do baço não vacinado e do grupo vacinado foram calculados os índices de proteção frente a cada desafio.

#### 4.8 Histopatologia

Fragmentos de fígado, baço, linfonodo cervical superficial e do sítio de aplicação da vacina foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada a 10% por, no mínimo, 24 horas. Após a fixação os fragmentos foram desidratados em uma sequência de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto) e então colocados em xilol para diafinização. Após a diafinização os fragmentos foram embebidos em blocos de parafina. Foram realizados cortes em micrótomo de espessuras de 3 a 4  $\mu\text{m}$ , montados sobre lâminas de vidro, que foram coradas com Hematoxilina e Eosina. As lesões observadas no fígado e baço foram classificadas por escores de necrose e inflamação, cada um variando de 0 a 3, sendo 0- ausente, 1- discreto, 2- moderado, 3- acentuado. Os escores de necrose e inflamação foram somados totalizando um escore que variou de 0 a 6.

#### 4.9 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do software Graph Pad Prism versão 5.0. Os dados de UFC foram normalizados por transformação logarítmica e, então, submetidos a

análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Turkey. O escore histopatológico foi comparado pelo teste não-paramétrico de Mann Whitney. Sendo considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Infectividade em modelo murino das cepas isoladas de campo de *B. ovis*

Para avaliar o potencial de infectividade das cepas isoladas de campo de *B. ovis*, camundongos Balb/c fêmeas ( $n = 3$ ) foram infectados por via intraperitoneal com a dose de  $1 \times 10^6$  UFC/animal de diferentes cepas isoladas de campo de *B. ovis* (100V, 203L, 266L, 204, 286L, 252L ou 94AV). Aos 7 dias após a infecção (dpi) foi feita a contagem de UFC no fígado e no baço (Figura 2), determinado-se o número de UFC/g do órgão. No baço, as cepas 94AV e 252L foram as que resultaram em maiores valores de UFC/g, quando comparadas às demais cepas, com pelo menos um Log de diferença em comparação com as médias dos outros grupos. No fígado o número de UFC/g foi significativamente maior no grupo infectado com a *B. ovis* 94AV.

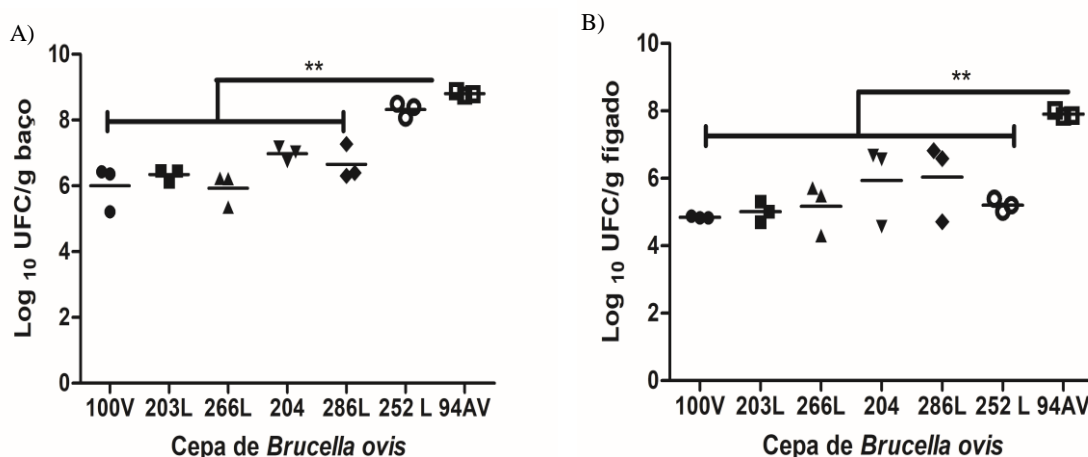


Figura 2. Infecção experimental de camundongos Balb/c com diferentes cepas de *Brucella ovis* isoladas de campo. Os camundongos foram infectados  $1 \times 10^6$  UFC/animal de diferentes cepas isoladas de campo (100v, 203, 266L, 204, 252L, 286L e 94AV). Cada ponto representa valor de UFC/g recuperado do fígado (A) e baço (B) de cada camundongo aos 7 dpi. A barra em cada grupo representa a média de três animais. Todos os dados foram transformados para escala logarítmica e então submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Turkey. Diferenças estatisticamente significativas estão indicadas por asteriscos ( \*\*,  $p < 0,01$ ).

Todos os animais apresentaram moderada esplenomegalia e hepatomegalia. Na histopatologia, observou-se no fígado infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico, com alguns linfócitos e macrófagos epitelioides, com discreta quantidade de fibrina e necrose (Figura 3A e B). No baço, foi observado o mesmo tipo de infiltrado inflamatório, com distribuição multifocal na zona marginal (Figura 3C e D). Não houve diferenças significativas entre a média dos escores dos diferentes grupos. Resumindo, todas as cepas isoladas de campo utilizadas neste estudo foram capazes de colonizar e provocar lesões no baço e no fígado de camundongos Balb/c. Sendo o UFC/g no fígado e baço no grupo infectado com *B. ovis* 94AV mostrou-se maior. As lesões encontradas nos fígados e nos baços dos camundongos infectados, são semelhantes ao que se tem descrito com outras cepas de *Brucella* sp. no modelo murino (Silva et al., 2011; Grilló et al., 2012). Portanto, todas as cepas estudadas são capazes de colonizar órgãos sistêmicos (baço e fígado) e induzir lesões histológicas aos 7 dpi.

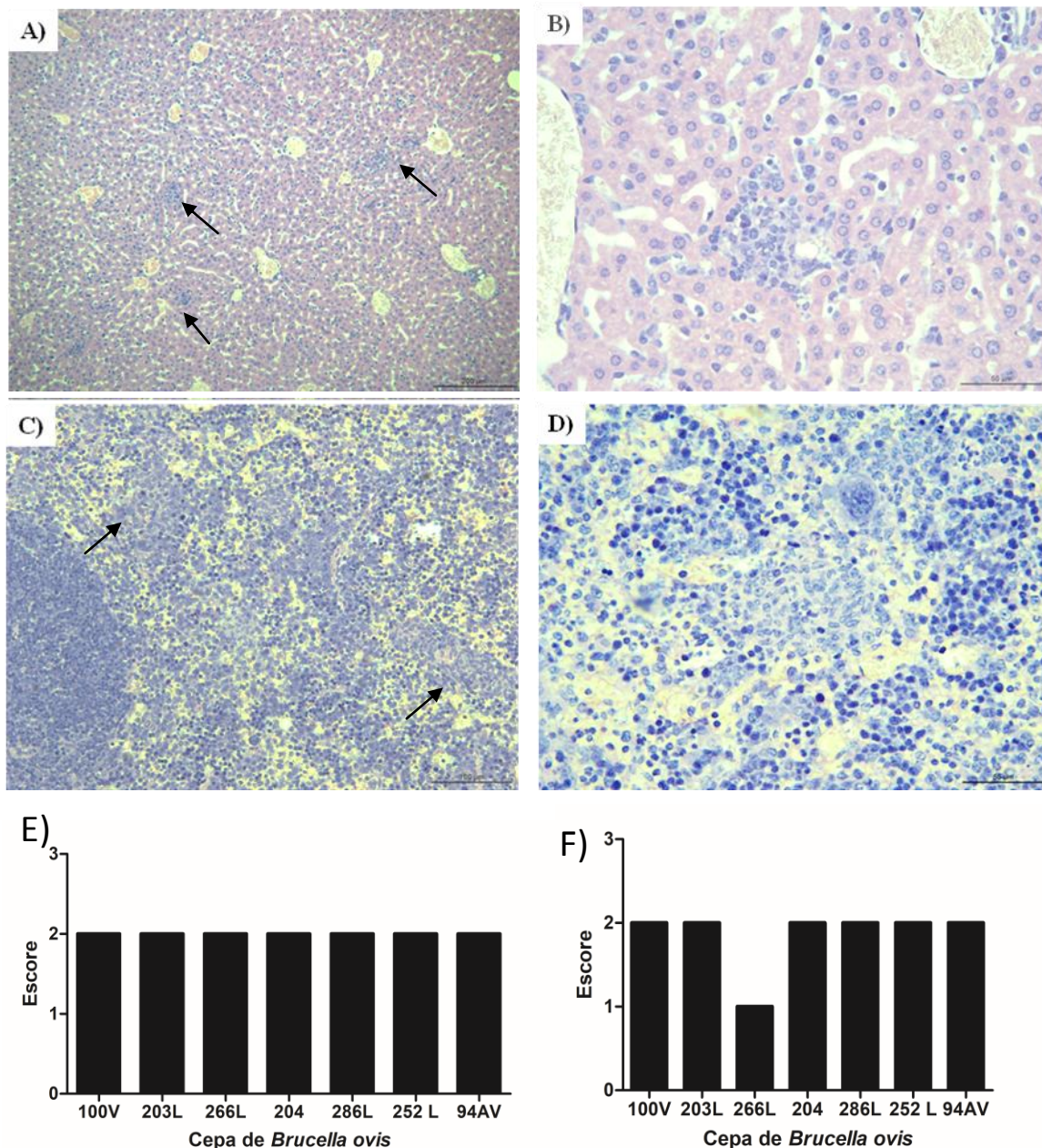


Figura 3. Histopatologia do fígado e baço de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  UFC/animal de diferentes cepas de *Brucella ovis* isoladas de campo. Animal do grupo infectado com a *B. ovis* 94AV: (A) fígado com microgranulomas multifocais aleatórios moderados (setas); Hematoxilina e Eosina; barra = 200  $\mu\text{m}$ ., em maior aumento (B) é possível observar infiltrado de macrófagos, neutrófilos e alguns linfócitos; hematoxilina e eosina; barra = 50  $\mu\text{m}$ . (C e D) Microgranulomas no baço (setas), caracterizados por infiltrado de macrófagos, neutrófilos e alguns linfócitos; Hematoxilina e Eosina; barras = 100  $\mu\text{m}$  e 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Escore das lesões inflamatórias do baço (E) e fígado (F).

## 5.2 Curva de crescimento *in vitro* em meio sólido dos isolados de campo

Baseados no resultado anterior de infectividade bacteriológica das cepas, duas foram selecionadas para melhor caracterização. As cepas selecionadas foram *B. ovis* 94AV, que apresentou maior recuperação de bactéria no fígado e no baço e *B. ovis* 266L, selecionada aleatoriamente dentre as outras cepas. Todas as cepas isoladas de campo foram isoladas diretamente de hospedeiros naturais. Devido a este fato, as bactérias isoladas de campo podem

apresentar diferenças metabólicas em comparação à cepa de referência (*B. ovis* ATCC 25840), uma vez que *Brucella* spp., como um patógeno intracelular, pode se ajustar e adaptar seu metabolismo às condições às quais são expostas na célula do hospedeiro, como nos sítios de multiplicação que geralmente é um ambiente com pouco oxigênio e baixa concentração de nutrientes (Kohler *et al.*, 2002). Nosso objetivo foi investigar se as cepas isoladas de campo possuem o mesmo padrão de crescimento *in vitro* em placas de TSA com 1% de hemoglobina. O comportamento de crescimento *in vitro* de ambas as cepas de campo foi semelhante ao da *B. ovis* ATCC 25840 (Figura 4). Todas as cepas inicialmente apresentaram um crescimento discreto no tempo 0 e 4 horas após a incubação, uma fase de crescimento exponencial entre 24 e 72 horas após a incubação a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e após este tempo entraram na fase estacionária de crescimento, assim como a *Brucella ovis* ATCC 25840, conforme previamente descrito por Silva *et al.* (2015).

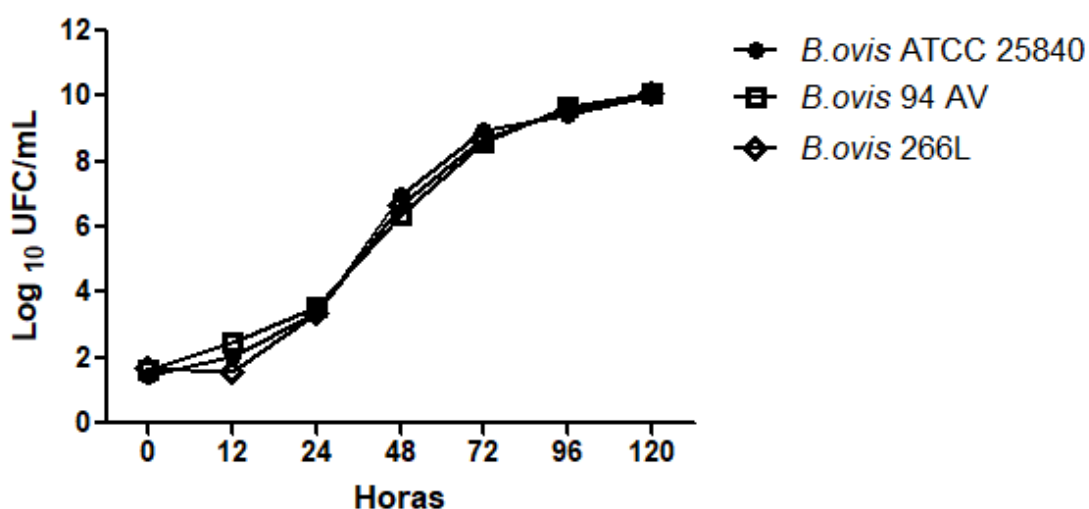


Figura 4. Curva de crescimento *in vitro* de diferentes cepas de *Brucella ovis* (ATCC 25840, 94AV e 266L), estas foram cultivadas em placas de TSA com 1% hemoglobina a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

### 5.3 Infecção de macrófagos Raw 264.7

Após a confirmação de que os isolados de campo 94 AV e 266L apresentam perfil semelhante de crescimento *in vitro*, células RAW 264.7, linhagem imortalizada de macrófagos murinos, foram utilizadas para infecção com as cepas de campo, com o objetivo de avaliar se há alguma adaptação das cepas isoladas de campo ao ambiente intracelular que resultem em diferente cinética de crescimento intracelular. Os resultados, na figura 5, no tempo 0 e 4 horas pós-infecção, mostraram vários perfis de internalização das bactérias testadas. *B. ovis* ATCC 25840 foi internalizada em maior número pelas células RAW, quando comparada às cepas de campo, com aproximadamente 1 Log de UFC de diferença entre a cepa de referência e as amostras de campo. No tempo de 24 horas pós infecção, avaliou-se a capacidade de *Brucella ovis* sobreviver à degradação lisossomal e o tempo de 48 horas mostra a habilidade desta se multiplicar no interior das células (Liautard *et al.*, 1996). A habilidade de sobrevivência a degradação lisossomal e posterior multiplicação é muito maior nas cepas de *B. ovis* isoladas de campo (94AV e 266L) do que em *B. ovis* ATCC 25840. Ambas as cepas de campo mostraram semelhante curva de infecção, com entrada, adaptação e multiplicação no ambiente intracelular. As diferenças nas fases de internalização, sobrevivência e multiplicação podem estar relacionados a adaptações fenotípicas como as metabólicas ou de membrana das cepas isoladas



de campo ao hospedeiro natural. Cepas da mesma espécie de *Brucella*, podem apresentar diferentes cinética intracelular. Por exemplo, cepas a qual sofreram diferentes mutações apresentam cinéticas distintas das cepas de referencia (Harmor et al., 1988; Bangués et al., 2004; Silva et al., 2011; Kohler et al., 2012, Silva et al., 2014).

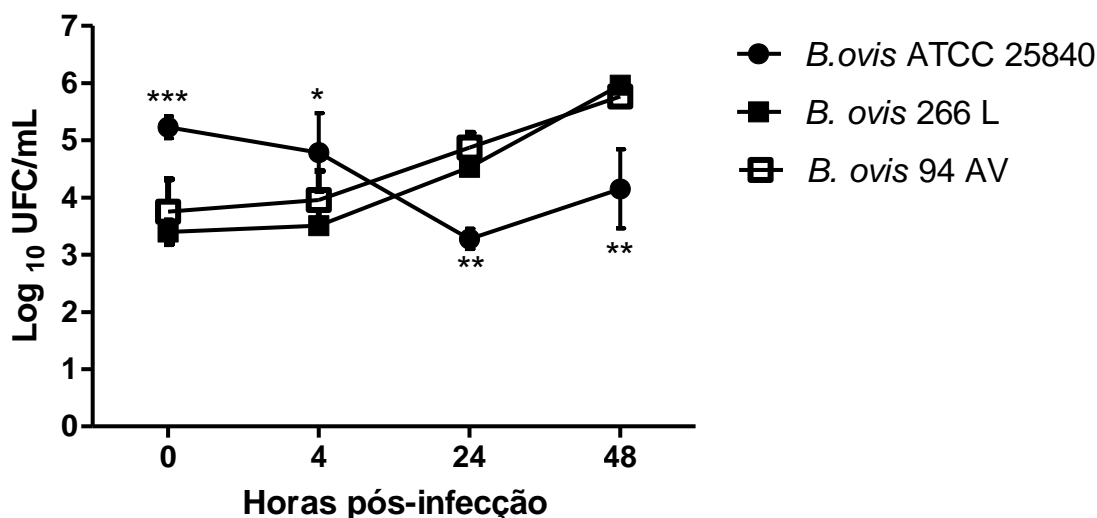


Figura 5. Infecção *in vitro* de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 com a cepa de referência de *Brucella ovis* (ATCC 25840) ou isolados de campo (94AV ou 266L). Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e infectados com as cepas de *B. ovis* com MOI de 1:100. As bactérias intracelulares foram recuperadas às 0, 4, 24 e 48 hpi. O tempo zero representa o número de UFC de bactérias após 1 hora de incubação com gentamicina. Os dados representam a media de dois experimentos em triplicata, com o seu desvio padrão. Todos os dados foram transformados para escala logarítmica e submetidos a ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Turkey Diferenças estatisticamente significativas estão indicadas por asteriscos (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

#### 5.4 Cinética *in vivo*

Considerando as diferenças de internalização e multiplicação intracelular entre as cepas isoladas de campo e a cepa de referência, o próximo passo foi a caracterização do perfil de infecção em camundongos dessas cepas isoladas de campo. Para isso, camundongos Balb/c fêmeas, foram infectadas com  $1 \times 10^6$  UFC/animal das cepas *B. ovis* ATCC 25840 ( $n = 15$ ), *B. ovis* 94 AV ( $n = 15$ ) e *B. ovis* 266L ( $n = 15$ ) por via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados aos 1, 7 e 30 dpi. Na fase inicial da infecção (1 dpi) os valores de UFC/g de fígado e baço, em ambas as cepas isoladas de campo, foram similares e menores que o recuperado dos mesmos órgãos do grupo infectado com a cepa de referência representado na Figura 6 (~2 Logs de diferença). Na fase subsequente (7 dpi), os valores de UFC/g do fígado foi menor que o do baço em todos os grupos. Neste tempo, o número de bactérias recuperadas no baço foi similar entre todas as cepas. No fígado houve diferença significativa entre *B. ovis* ATCC 25840 e *B. ovis* 266L. Aos 30 dpi, o UFC/g dos órgãos avaliados a carga bacteriana foi maior no grupo infectado com *B. ovis* 266L. O perfil de cinética de infecção da *B. ovis* ATCC 25840 mostrou-se similar ao previamente descrito por Silva et al. (2011). Estes dados demonstram que as cepas isoladas de campo são capazes de infectar, colonizar e persistir no fígado e baço de animais por pelo menos quatro semanas após a infecção. Apesar das diferenças de UFC em alguns pontos analisado, no geral, o padrão de colonização dos órgãos mostrou-se bastante semelhante. O período onde observou-se maior carga bacteriana UFC em todos os grupos em ambos os órgãos foi aos 7 dpi. Com 1 dpi, a contagem de UFC do fígado mostrou-se maior que o do baço, já nos tempos 7 dpi

e 30 dpi, o UFC do baço de todos os grupos foi maior que os do fígado de todos os grupos. A carga bacteriana aos 30 dpi está decaindo, e a bactéria começa a ser eliminada do organismo do camundongo, no fígado a contagem bacteriana apresenta-se próximo ao limite de detecção (2 Logs de UFC). Este padrão de colonização e persistência nos órgãos é semelhante a cinética de infecção murina descrita para *Brucella* sp. (Silva et al., 2011; Grilló et al., 2012).

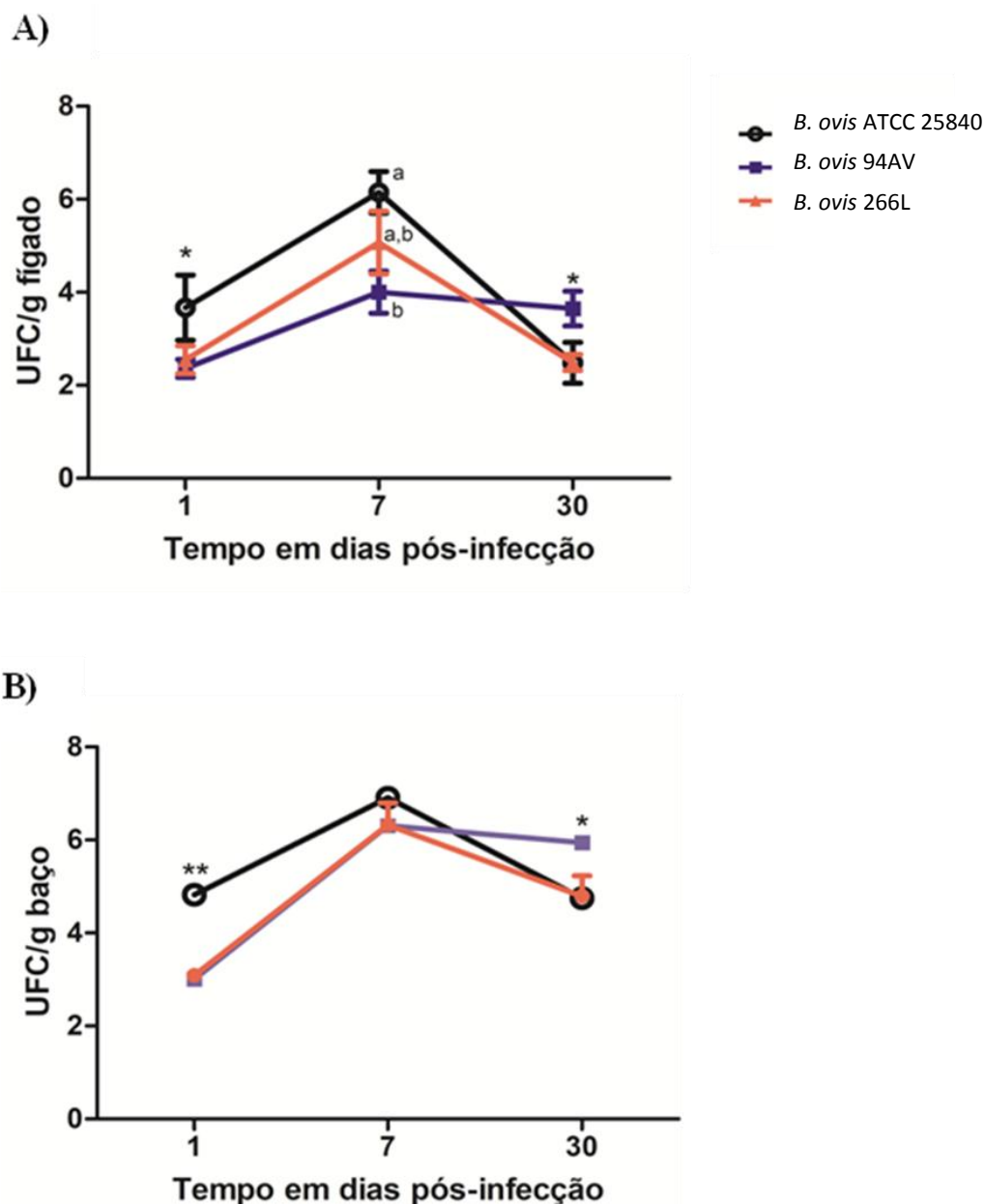


Figura 6. Cinética de infecção em camundongos fêmea Balb/c infectados com diferentes cepas de *Brucella ovis*. Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  UFC de *B. ovis* ATCC 25840, 94AV ou 266L por via intraperitoneal. Fragmentos de fígado (A) e baço (B) foram coletados para a contagem bacteriana aos 1, 7 e 30 dpi. Cada ponto representa a média de 5 animais e a barra indica o desvio padrão. Os dados sofreram transformação logarítmica seguida de ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no mesmo tempo são indicadas por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ). Aos 7 dpi no fígado as diferenças entre os grupos são representada por letras diferentes ( $p < 0.05$ ).

Nos estágios iniciais de infecção (1 dpi), não foram observadas lesões no fígado nem baço dos camundongos infectados, mesmo no grupo infectado com *B. ovis* ATCC 25840, o que mostrou carga bacteriana mais elevada nestes órgãos. Aos 7 e 30 dpi, o baço apresentou

microgranulomas multifocais moderados, com localização predominantemente adjacente ao tecido linfóide. No fígado foram observados microgranulomas multifocais aleatórios moderados no parênquima hepático. Os padrões histopatológicos foram semelhantes em todos os grupos. Os escores histopatológicos no fígado e no baço não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos tempos analisados.

#### 5.5. Imunização com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada e desafio com cepas isoladas de campo

Estudos prévios mostraram o potencial vacinal da cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada, diminuindo as lesões e a carga bacteriana em camundongos e ovinos desafiados com a cepa de referência *B. ovis* ATCC 25840 (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b). Considerando a hipótese de que a vacinação com a mutante viva atenuada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  é capaz de proteger camundongos desafiados com as cepas de campo, 30 camundongos fêmeas C57BL/6 foram utilizados, pois esta linhagem em ensaios anteriores demonstraram melhores índices de proteção com esta mesma vacina (Silva et al., 2015). Os camundongos foram divididos em seis grupos, sendo três desses grupos vacinados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  e os outros três grupos inoculados com PBS estéril. Após a vacinação, o local de inoculação foi monitorado e mensurado com auxílio de paquímetro durante todo o experimento. Nos animais vacinados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  observou-se um aumento no local da aplicação, que aos poucos foi regredindo de tamanho, regredindo totalmente na maioria dos animais até os 45 dias (Figura 7). Histologicamente, os sítios de aplicação da vacina apresentavam infiltrado inflamatório focal com macrófagos epitelioides e neutrófilos. Esta reação no local da vacina já era esperada, e havia sido observado por Silva et al. (2015).

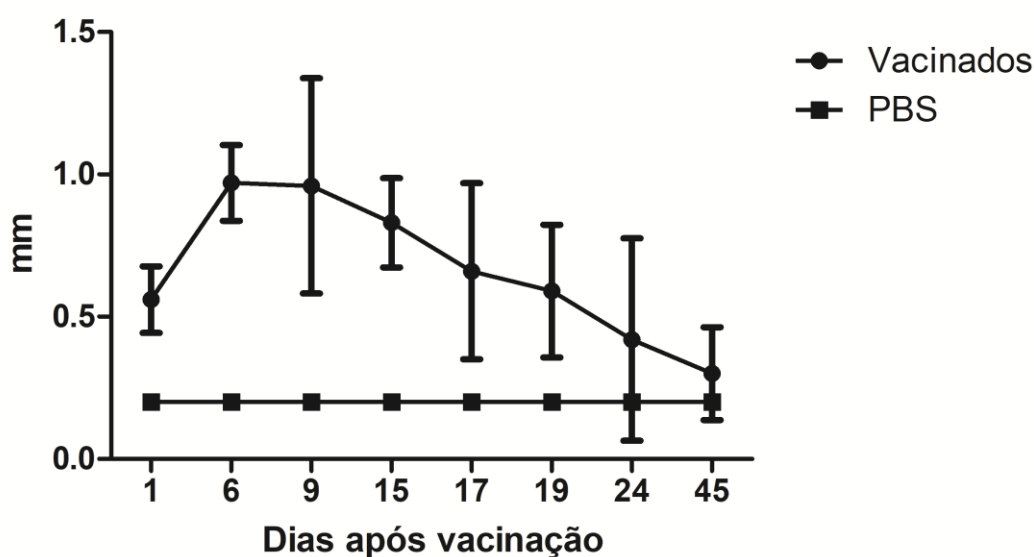


Figura 7. Mensuração do local de aplicação da vacina *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$ , o local foi mensurado com paquímetro durante todo o experimento. Os dados representam a média e desvio padrão da mensuração do local da aplicação dos grupos vacinados e do grupo PBS.

Os grupos imunizados com a vacina viva atenuada e posteriormente infectados apresentaram significativa redução na carga bacteriana do fígado e baço ( $p < 0,001$ ), comparados aos grupos não imunizados. Houve proteção em todos os grupos vacinados. O índice de proteção dos animais vacinados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada foi diferente, variando com a cepa do desafio (*B. ovis* ATCC 25840, 266L e 94AV) como detalhado na Tabela 3. O índice de proteção

foi maior para as cepas isoladas de campo *B. ovis* 266L (2,746) e *B. ovis* 94AV (1,736) quando comparadas com a cepa de referência *B. ovis* ATCC 25840 (0,751). A diferença entre os índices de proteção observada foi atribuída às diferenças entre as cepas utilizadas no desafio. Visto que o índice de proteção varia de acordo com a patogenicidade de *Brucella* sp. utilizada no desafio pós-vacinal (Carvalho et al., 2016). Portanto, a vacina mostrou-se mais eficiente na proteção de cepas isoladas diretamente do hospedeiro naturalmente infectado.

Tabela 3. Proteção induzida pela vacina viva atenuada de *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada com alginato a 1% em camundongos C57BL/6 experimentalmente desafiados com diferentes cepas de *B. ovis*. \* \*\* Diferenças estatisticamente significativas (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ) entre os grupos vacinados e os não vacinados.

<b>Desafio (1 x 10<sup>6</sup> por camundongo)</b>	<b>Log<sub>10</sub> UFC/g de baço dos animais vacinados</b>	<b>Log<sub>10</sub> UFC/g de baço dos animais não vacinados</b>	<b>Índice de Proteção</b>
<i>B. ovis</i> ATCC 25840	4,668 ± 0,383	5,419 ± 0,219	0,751*
<i>B. ovis</i> 266 L	3,786 ± 0,276	6,532 ± 0,649	2,746**
<i>B. ovis</i> 94 AV	4,846 ± 0,599	6,596 ± 0,355	1,736**

A carga bacteriana foi menor no baço, nos grupos vacinados, independente do desafio. Portanto, a vacina viva atenuada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foi eficiente independente da cepa utilizada para desafio. O grupo vacinado e desafiado com *B. ovis* ATCC 25840 apresentou quase 1 Log de redução na carga bacteriana do baço em comparação ao grupo não vacinado. Estes resultados mostraram-se semelhantes aos de Silva et al. (2015a) que também observou redução da carga bacteriana no baço de quase 1 Log em relação ao grupo não vacinado com o mesmo desafio. Surpreendentemente, nos grupos desafiados com as cepas isoladas de campo, esta redução da carga bacteriana mostrou-se mais acentuada quando comparada com o grupo desafiado com a cepa de referência. No grupo desafiado com *B. ovis* 94AV a redução foi quase 2 Logs de diferença entre o grupo com o mesmo desafio não vacinado. O grupo com maior índice de proteção foi o desafiado com *B. ovis* 266L, com diferença de 3 Logs. Macroscopicamente, o baço dos camundongos vacinados apresentou discreta esplenomegalia, comparado com os não imunizados, nos quais o órgão estava moderadamente aumentado de tamanho. No fígado de todos os animais não vacinados, havia nódulos brancos de 1 a 3 mm de diâmetro, com distribuição multifocal a coalescente (Figura 8). Na macroscopia do fígado dos camundongos não vacinados havia nódulos esbranquiçados milimétricos multifocais, enquanto nos animais dos grupos vacinados nódulos semelhantes eram pouco perceptíveis (Figura 8B). A carga bacteriana do fígado também foi mais baixa nos grupos vacinados, assim como observado no baço. No grupo desafiado com *B. ovis* ATCC 25840 a diferença entre o grupo vacinado e não vacinado foi de 0,5 Logs, e nos grupos das cepas de campo 1 Log de diferença (Figura 9).

As alterações histopatológicas no baço dos camundongos não vacinados foram caracterizadas por infiltrado inflamatório composto por macrófagos, macrófagos epitelioides e neutrófilos associados a discreto acúmulo de fibrina, caracterizando esplenite piogranulomatosa multifocal moderada a intensa. Lesões semelhantes foram observadas nos grupos vacinados, porém muito mais discretas. O escore das lesões histopatológicas dos grupos vacinados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foi significativamente menor que os grupos não vacinados ( $p < 0,01$ ) (Figura 10).

Os nódulos observados macroscopicamente correspondiam a focos com infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, neutrófilos e alguns linfócitos, com distribuição multifocal e aleatória, com intensidade variando de discreta a moderada, associados em alguns focos a áreas de necrose e trombose. Estas lesões são semelhantes às descritas em outros experimentos deste estudo (Figura 11). Os grupos vacinados apresentaram poucos microgranulomas no fígado. O escore histopatológico hepático (Figura 9B) apresentou diferença estatística entre os grupos vacinados e não vacinados ( $p < 0,01$ ). Estes resultados são animadores, visto que a vacina

mutante viva atenuada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada diminui a carga bacteriana e as lesões dos grupos vacinados independente do desafio, corroborando com o fato da maior eficiência das vacinas vivas em relação aos outros tipos de vacina (Carvalho et al., 2016). Ainda é importante ressaltar a eficiência na proteção e prevenção de lesões no desafio com cepas isoladas diretamente do hospedeiro natural, ou cepa circulantes. Levando em consideração a eficiência da vacina, perdas reprodutivas provocadas pela bactéria se as poucas medidas de prevenção da brucelose ovina no Brasil (Carvalho et al., 2012; Poester et al., 2013) esta vacina pode ser utilizada para a prevenção de rebanho de ovinos, para melhores perdas econômicas e como medida de controle da infecção no Brasil. Além disso, ao contrário da vacina de *B. melitensis* utilizadas em outros países, a vacina mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  não apresenta potencial zoonótico, assim diminuindo o risco de infecções humanas devido a acidentes vacinais (Xavier et al., 2009).

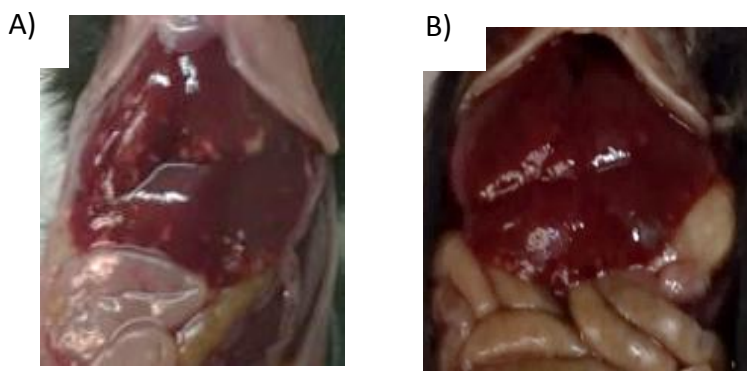


Figura 8. Lesões macroscópicas em camundongos desafiados com *Brucella ovis* isolada de campo (cepa 94AV). Proteção induzida pela vacina viva atenuada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada com alginato em C57BL/6 desafiado com diferentes cepas de *B. ovis*. Imagem representativa do fígado de um camundongo controle inoculado com PBS e desafiado com *B. ovis* 94AV (A) com nódulos esbranquiçados multifocais; e (B) fígado de camundongo imunizado com a cepa vacinal *B. ovis*  $\Delta abcBA$  sem lesões macroscópicas.

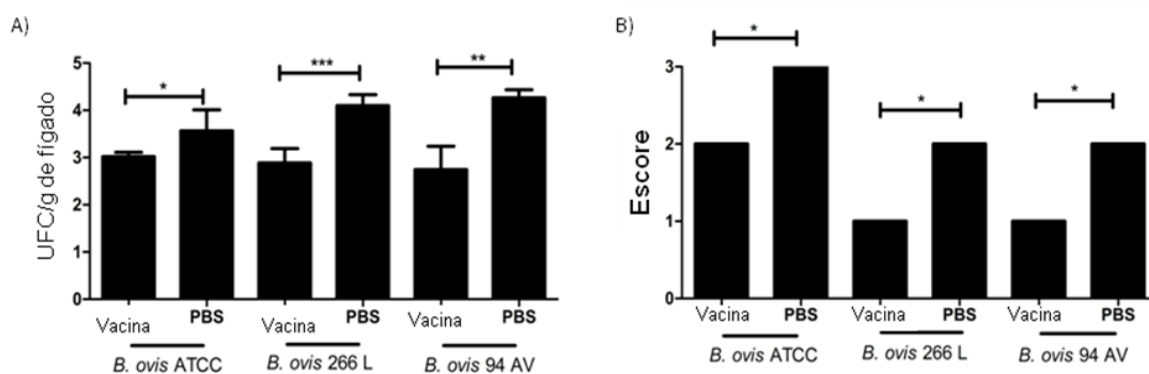


Figura 9. Contagem de UFC e escores de histopatologia do fígado de camundongos imunizados com a cepa vacinal *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$ , comparados aos controles inoculados com PBS e desafiados com a cepa de referência (ATCC 25840) e isolados de campo (cepas 266L e 94AV). (A) camundongos imunizados com a vacina experimental apresentaram menor carga bacteriana no fígado quando comparado aos animais do grupo não vacinado com o mesmo desafio. Os dados sofreram transformação logarítmica seguida de ANOVA e teste de Tukey. As colunas representam a média de cada grupo e a barra indica o desvio padrão. (B) Escores histopatológicos do fígado dos mesmos camundongos. Diferenças estatisticamente significativas, segundo o teste não paramétrico de Mann-Whitney, estão indicadas por asteriscos (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

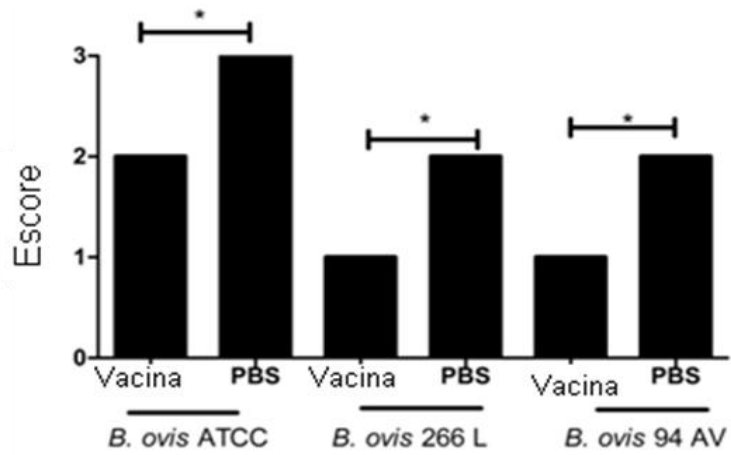


Figura 10. Escore das lesões inflamatórias no baço dos camundongos vacinados e não vacinados e desafiados com diferentes cepas de *Brucella ovis*. As colunas representam a mediana de cada grupo. O escore das lesões histopatológicas dos grupos vacinados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foi significativamente menor que os grupos não vacinados. Diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Mann Whitney são indicadas por asteriscos (\* $p < 0,01$ ).

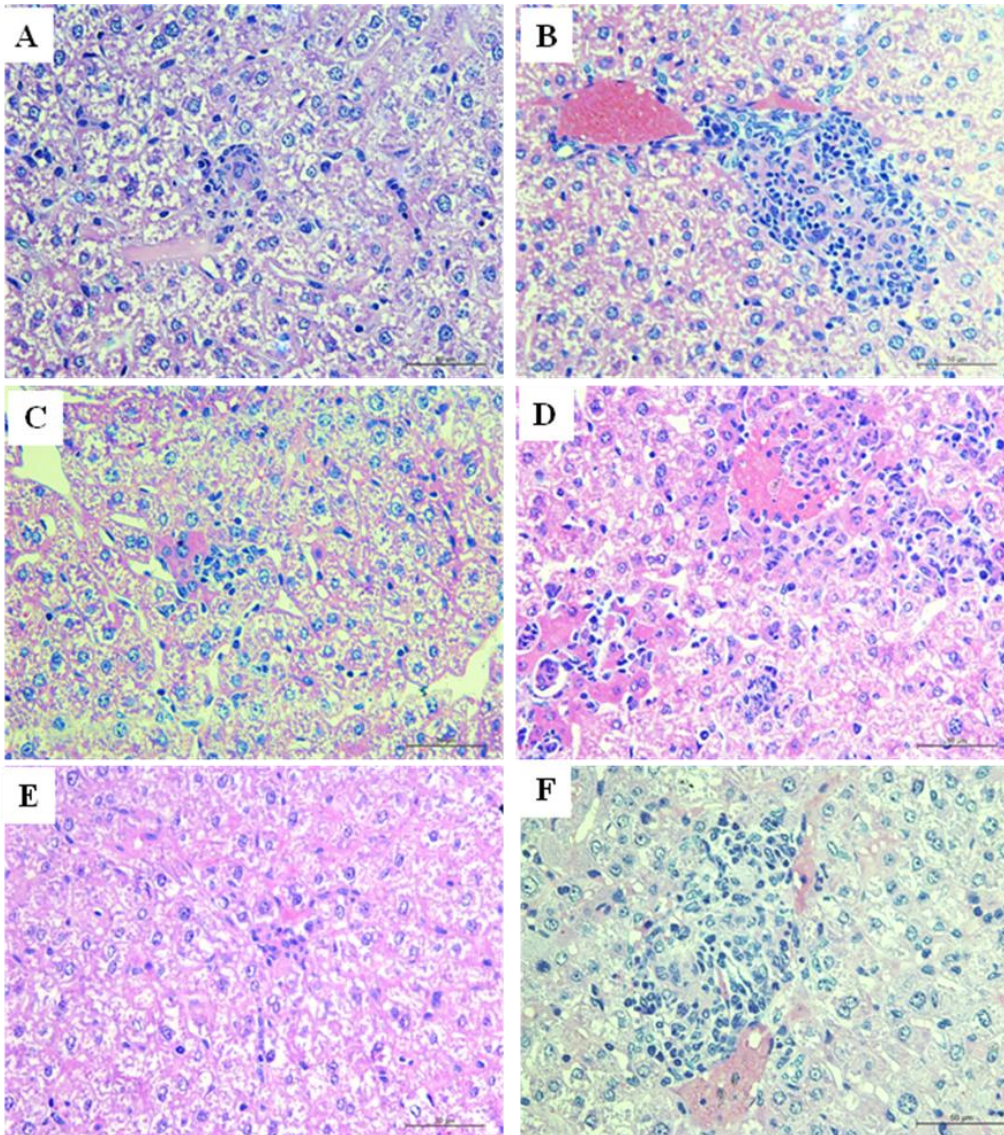


Figura 11. Fígado de camundongos imunizados com a cepa vacinal *Brucella ovis*  $\Delta abcB$  (A,C e E) e controles inoculados com PBS estéril (B, D e F) e desafiados com a cepa de referência *B. ovis* ATCC 25840 (A e B), ou com os isolados de campo: *B. ovis* 94 AV (C e D) ou *B. ovis* 266 L (E e F). Microgranulomas no parênquima hepático com maior intensidade nos camundongos controle não vacinados, quando comparados aos camundongos vacinados.

## 6. CONCLUSÃO

As cepas isoladas de campo de *B. ovis* são capazes de se adaptar e crescer *in vitro* em meio de cultura sólido, semelhante à cepa de referência *B. ovis* ATCC 25840. Os isolados de campo avaliados foram capazes de infectar e induzir lesão sistêmica em camundongos. As cepas isoladas de campo apresentaram capacidade para sobrevivência e multiplicação intracelular em macrófagos. As cepas isoladas de campo colonizam e provocam lesões no fígado e no baço de camundongos Balb/c experimentalmente infectados. Além de, apresentarem cinética distinta para colonização do fígado e do baço dos camundongos infectados, quando comparadas à cepa de referência.

A cepa vacinal *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foi capaz de gerar bons índices de proteção, sendo o índice maior quando as cepas utilizadas para o desafio foram cepas isoladas de campo. Desta forma, esta vacina demonstrou proteção contra o desafio experimental com cepas circulantes, adaptadas aos hospedeiros, corroborando o potencial vacinal de *B. ovis*  $\Delta abcBA$ .

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL DAHOUK, S.; LE FLÈCHE, P.; NOCKLER, K.; et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods*, v.69, n.1, p.137-145, 2007.
- ARENAS, G.N.; STASKEVICH, A.S.; ABALLAY, A.; et al. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, v.68, n.7, p.4255-4263, 2000.
- BAGUES, M.P.J.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; et al. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect. Immun.*, v.72, n.4, p.2429-2433, 2004.
- BALDWIN, C.L.; GOENKA, R. Host cellular immune responses against *Brucella* spp. evaluated using the mouse model *Brucella*. *Mol. Cell. Bio.*, p.287-312, 2004.
- BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.367-382, 2002.
- BLASCO, J.M. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, v.31, p.275-283, 1997.
- BLASCO, J.M.; DÍAZ, R. *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet*, v.342, p.805, 1993.
- BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551-575, 1985.
- CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin. Res.*, v.102, p.213-222, 2012.

- CARVALHO, T.F.; HADDAD, J.P.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Meta-Analysis and advancement of brucellosis vaccinology. *PLos One*, v.11, e0166582, 2016.
- CASCALES, E.; CHRISTIE, P.J. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, n.1, p.137-149, 2003.
- CHEERS, C.; HO, M. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. *J. Reticuloendothel. Soc.*, v.34, p.299-309, 1983.
- CORBEL M.J. Brucellosis in humans and animals. *WHO Press*, 2006.
- COSTA, L.F.; PESSOA, M.S.; GUIMARÃES, L.B.; et al. Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. *BMC Res. Notes.*, v.9, p.190-195, 2016.
- CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O.; BOUMEDINE, K.S. Classification of *Brucella* stains isolated from marine mammals by infrequent restriction site PCR identification tests. *Microb. Infect.*, v.5, n.7, p.593-602, 2003.
- DANESE, I.; HAINE, V.; DELRUE, R.; et al. The Ton system, an ABC transporter, and a universally conserved GTPase are involved in iron utilization by *Brucella melitensis* 16M. *Infect. Immun.*, v.72, p.5783-5790, 2004.
- DAVIDSON, A.L.; CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Review Biochem.*, v.73, p.241-268, 2004.
- DELPINO M.V.; MARCHESINI, M.I.; ESTEIN, S.M.; et al. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infect. Immun.*, v.75, p.299-305, 2007.
- DETMERS, F.J.M.; LANFERMEIJER, F.C.; POOLMAN, B. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res. Microbiol.*, v.152, n.3-4, p.245-258, 2001.
- DORNELES, E.M.S.; FREIRE, G.N.; DASSO, M.G.; et al. Genetic diversity of *Brucella ovis* isolates from Rio Grande do Sul, Brazil, by MLVA16. *BMC Res. Notes*, v.7, p.447, 2014.
- ESQUIVEL, M.S.; VILLALOBOS, N.R.; ROJAS, C.J.; et al. *Brucella neotomae* infection in humans, Costa Rica. *Emerg. Infect. Dis.*, v.23, n.6, p.997-1000, 2017.
- ENRIGHT, F.M.; ARAYA, L.N.; WINTER, A.J.; et al. Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.26, n.2, p.171-182, 1990.
- GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; BLASCO, J.M. Experimental *Brucella ovis* infections in pregnant ewes. *Vet. Record*, v.144, p.555-558, 1999.
- GRILLÓ, M.J.; BLASCO, J.M.; GORVEL, J.P.; et al. What we have to learn from brucellosis in the mouse models? *Vet. Res.*, v.13, n.1, p.29, 2012.
- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular multiplication. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.281-297, 2002.
- GYLES, C.L.; PRESCOTT, F.J.; SONGER, G.J.; THOEN, C.O. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4 ed. Wiley-blackwell, v.22, p. 429-438, 2011.



- HAMER, I; GOFFIN, E.; DE BOLLE, X.; et al. Replication of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in fibroblasts does not require Atg5-dependent macroautophagy. *BCM Microbiol.*, v.14, p.223-227, 2014.
- HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p.1092-1097, 1988.
- HOFER, E.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; DAHOUK, A.S.; et al. A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. *Vet. Microbiol.*, v.155, p.93-99, 2012.
- HOSIE, A.H.F.; POOLE, P.S. Bacterial ABC transporters of amino acids. *Res. Microbiol.*, v.152, n.3-4, p.259-270, 2001.
- IGARASHI, K.; ITO, K.; KASHIWAGI, K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, v.152, n.3-4, p.271-278, 2001.
- JAHANS, K.L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E.S. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet. Microbiol.*, v.57, n.4, p.373-382, 1997.
- JENNER, D.C.; DASSA, E.; WHATMORE, A.M.; ATKINS, H.S. ATP-binding cassette systems of *Brucella*. *Comp. Funct. Genomics.*, ID 354649, 2009.
- JIMÉNEZ-DE-BAGÜÉS, M.P.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; BLASCO, J.M. Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine*, v.11, p.61-66, 1993.
- KAHL-MCDONAGH, M.M.; ARENAS-GAMBOA, A.M.; FICHT, T.A. Aerosol infection of BALB/c mice with *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* and protective efficacy against aerosol challenge. *Infect. Immun.*, v.75, p.4923-4932, 2007.
- KO, J.; SPLITTER, A.M. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, p.65-78, 2003.
- KOHLER, S.; FOULONGNE, V.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.99, p.15711-15716, 2002.
- LIAUTARD, J.P.; GROSS, A.; DORNAND, J.; KÖHLER, S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiology* v.12, n.2, p.197-206, 1996.
- MARTIROSYAN, A.; GORVEL, JP. *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol.*, v.8, p.147-154, 2013.
- MARÍN, C.M.; JIMENES DE BAGUES, M.P.; BLASCO, J.M.; et al. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.*, v.125, p.504-508, 1989.
- MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P.; BLASCO, J.M. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, v.48, p.209-215, 1990.
- NICOLETTI, P. Vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19 administered by differing routes and doses. *Vaccine*, v.2, p.133-1355, 1984.OIE (2015). "Chapter 2.7.8. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*)," in *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*.

PAPPAS, G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.36, p.8-11, 2010.

PARDON, P.; MARLY, J. Resistance of *Brucella abortus* infected mice to intravenous or intraperitoneal *Brucella* reinfection. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur*, n.127C, p.57-70, 1976.

PLOMMET, M.; PLOMMET, A.M. Virulence of *Brucella*: bacterial growth and decline in mice. *Ann. Vet. Res.*, v.19, p.65-67. 1988.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech.*, v.32, n.1, p.105-115, 2013.

RIDLER, A.L.; WEST, D.M. 2011. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.27, p.61-66, 2010.

RODRIGUEZ, A.M.; DELPINO, M.V.; MIRAGLIA, M.C; et al. *Brucella abortus*-activated microglia induce neuronal death through primary phagocytosis. *Glia*, v.65, n.7, p.1137-1151, 2017.

SÁ, J.C.; SILVA, T.M.; COSTA, E.A.; et al. The *virB* encoded type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice. *Vet. Microbiol.*, v.159, n.1-2, p.130-140, 2012.

SANGARI, F.J.; GRILLÓ, M.J.; JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P.; et al. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus* B19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice. *Vaccine*, v.16, p. 1640-1645, 1988.

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; et al. *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, v.58, n.2, p.375- 382, 2008.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, v.60, n.4, p.801-808, 2010.

SCHOLZ, H.C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; AL DAHOUK, S.; et al. *Brucella vulpis* sp. nov. isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.66, n.5, p.2090-2098, 2016.

SHEHABI, A.; SHAKIIR, K.; EL-KHARTERB, M.; et al. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J. infect.* v. 20, n.1, p.5-10, 1990.

SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A., COSTA, E.A.; et al. Putative ATP-Binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect. Immun.*, v.79, n.4, p.1706-1717, 2011.

SILVA, A.P.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F.; et al. *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet. Microbiol.*, v.167, p 546-553, 2013.

SILVA, T.M.A.; MOL, J.P.S.; WINTER, M.G.; et al. The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*. *Plos One*, v.12, e114532, 2014.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; SILVA, T.M.; et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated  $\Delta abcBA$  strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, p.789-97, 2015a.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F.; et al. Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ( $\Delta abcBA$ ) protects against wild type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS One*, v.10, e0136865, 2015b.

SMITHER, S.J.; PERKINS, S.D.; DAVIES, C.; et al. Development and characterization of mouse models of infection with aerosolized *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.16, p.779-783, 2009.

STEVENS, M.G.; PUGH, G.W.; TABATABAI, L.B. Effects of  $\gamma$ -interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect Immun.*, v.60, p.4407-4409, 1992.

XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Cienc. Rural*, v.39, p.2252-2260, 2009.

WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, v.9, p.1168-1184, 2009.

WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, v.64, p.4120-4128, 2014.