

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Brunno Gardiman Sossai

**AVALIAÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES ANTI-*BRUCELLA* PARA DETECÇÃO
DE *BRUCELLA* spp. POR IMUNOISTOQUÍMICA**

Belo Horizonte

2021

Brunno Gardiman Sossai

**AVALIAÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES ANTI- *BRUCELLA* PARA DETECÇÃO
DE *BRUCELLA* spp. POR IMUNOISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre (a) em Patologia - área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientadora: Tatiane Alves da Paixão

Coorientador: Renato de Lima Santos

Belo Horizonte

2021

043

Sossai, Brunno Gardiman.

Avaliação de soros hiperimunes anti-Brucella para detecção de Brucella spp. por imunoistoquímica [manuscrito] / Brunno Gardiman Sossai. – 2021. 64 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Tatiane Alves da Paixão. Coorientador: Renato de Lima Santos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Brucelose. 3. Imuno-Histoquímica. I. Paixão, Tatiane Alves da. II. Santos, Renato de Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 435 DE BRUNO GARDIMAN SOSSAI.

Realizou-se, no dia 19 de julho de 2021, às 8:30 horas, no formato *on-line*, a defesa de Dissertação, intitulada **“Avaliação de Soros Hiperimunes Anti- Brucella para Detecção de Brucella spp por Imunoistoquímica”**, apresentada por **Bruno Gardiman Sossai**, número de registro 2019700675, graduado no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Tatiane Alves da Paixão** – ICB/UFMG – ORIENTADORA; **Prof. Dr. Renato de Lima Santos** - Escola de Veterinária/UFMG; **Profª. Dra. Tayse Domingues de Souza** – Universidade Vila Velha/ES; e **Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri** – ICB/UFMG.

A Comissão considerou a Dissertação:

- Aprovada
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 19 de julho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Alves da Paixao, Professora do Magistério Superior**, em 21/07/2021, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Luiz Tafuri, Professor do Magistério Superior**, em 22/07/2021, às 00:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tayse Domingues de Souza, Usuário Externo**, em 27/07/2021, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior**, em 28/07/2021, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0845943** e o código CRC **1425B259**.

Referência: Processo nº 23072.235758/2021-51

SEI nº 0845943



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES ANTI- *BRUCELLA* PARA DETECÇÃO DE *BRUCELLA spp* POR IMUNOISTOQUÍMICA"

BRUNO GARDIMAN SOSSAI

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em **Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 19 de julho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

PROF^ª. TAYSE DOMINGUES DE SOUZA - UNIVERSIDADE VILA VELHA

PROF. WAGNER LUIZ TAFURI - ICB/UFMG

PROF. RENATO DE LIMA SANTOS - ESCOLA DE VETERINÁRIA/UFMG - COORIENTADOR

PROF^ª. TATIANE ALVES DA PAIXÃO - ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 19 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Alves da Paixao, Professora do Magistério Superior**, em 21/07/2021, às 16:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Luiz Tafuri, Professor do Magistério Superior**, em 22/07/2021, às 00:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tayse Domingues de Souza, Usuário Externo**, em 27/07/2021, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior**, em 28/07/2021, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0845949** e o código CRC **0B51D17D**.

Referência: Processo nº 23072.235758/2021-51

SEI nº 0845949

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família que mesmo de longe se manteve presente nos menores gestos de carinho, mas em especial a minha mãe que sempre teve ao meu lado torcendo em todos os momentos, incluindo por mais esta conquista.

A minha orientadora, Tatiane Alves da Paixão, por ser presente em todos os momentos durante essa trajetória incluindo os seus mínimos gestos. Contigo aprendi muito mais do que é ciência. Obrigado por ter me recebido como aluno para cursar o mestrado no Departamento de Patologia Geral (ICB-UFMG).

Ao meu coorientador, Renato de Lima Santos, por me proporcionar momentos incríveis durante o mestrado, adquirindo conhecimentos, troca de experiências profissionais, e acima de tudo respeito, dedicação e companheirismo por nosso trabalho e ao do colega.

Agradeço aos colegas e amigos de pós-graduação do Departamento de Patologia Geral (ICB-UFMG) e da Escola de Veterinária (UFMG) que fiz durante o período do mestrado.

A todos os colegas e amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Patologia Molecular (312), em que dividimos bons momentos, troca de conhecimentos e experiências, mas em especial a Heloísa, Pamela, Monique (MÔNICA) e Cláudia, que sempre estenderam as mãos para ajudar com conselhos ou auxílio na pesquisa.

As técnicas do Laboratório de Histopatologia Leimar e Valéria, pelos conhecimentos de colorações e risos.

As minhas grandes inspirações no universo da patologia veterinária, Tayse Domingues de Souza e Mayra Cunha Flecher.

Aos amigos de república Aline, Breno e José, e aos amigos Felipe, Cosme e Renan. Obrigado pelos ótimos momentos!!!

A minha amiga de longa data Jaqueline por sempre me ouvir e dar conselhos nos momentos mais difíceis.

As agências de desenvolvimento científico CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Muito Obrigado!

Brucelose é uma importante doença infectocontagiosa zoonótica no cenário mundial de curso crônico que causa principalmente alterações reprodutivas em animais domésticos e silvestres. As identificações de animais infectados ocorrem por meio de avaliação clínica, associado a testes diagnósticos, que podem ser provas diretas ou indiretas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de quatro diferentes soros hiperimunes de coelho anti-*Brucella* spp. em detectar por IHQ antígenos de *Brucella* spp. em tecidos parafinizados de animais infectados experimentalmente ou naturalmente com *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis*. A produção dos soros hiperimunes partiu da imunização de quatro coelhas, com uma espécie *Brucella* inativada por radiação gamma, ou com proteína BP26 recombinante. O teste de ELISA foi usado para determinar a soro conversão das coelhas ao imunógeno e reação cruzada dos soros hiperimunes aos antígenos. A imunistoquímica utilizou os soros hiperimunes em três diluições (1/100, 1/500 e 1/1000) para determinar a diluição ideal de uso e reação cruzada entre eles. Observou-se que os anticorpos anti-*B. abortus* e anti-*B. ovis* detectaram maior número de casos de animais acometidos pela brucelose, anti-*B. canis* apresentou menor capacidade de detecção e soro anti-BP26 não identificou nenhum animal infectado. A imunização de coelhos com *Brucella* sp inativada por radiação produziu soros hiperimunes anti-*Brucella* eficazes na identificação do antígeno de *Brucella* na lesão, mas o soro hiperimune anti-BP26 não foi capaz de identificar o antígeno na lesão.

Palavras-chave: brucelose, histopatologia, imunodeteção, anticorpo policlonal.

Brucellosis is an important zoonotic infectious disease with worldwide distribution. It has a chronic course that mainly causes reproductive changes in domestic and wild animals. Identification of infected animals occurs through clinical evaluation, associated with direct or indirect diagnostic tests. The present study aimed to evaluate the efficacy of four different rabbit hyperimmune anti-*Brucella* sera for detection of *Brucella* spp. antigens in paraffinized tissues of animals experimentally or naturally infected with *B. abortus*, *B. canis*, or *B. ovis*. The hyperimmune sera were produced by immunizing four rabbits, with a *Brucella* spp. inactivated by gamma radiation, or with a recombinant BP26 protein. ELISA test was used to determine the serum conversion of the rabbits to the immunization and cross-reactivity of the hyperimmune sera to the antigens. Immunohistochemistry was performed with three dilutions (1/100, 1/500, and 1/1000) of the hyperimmune sera to determine the ideal dilution for use and cross-reactivity. It was observed that anti-*B. abortus* and anti-*B. ovis* antibodies detected a greater number of cases of animals affected by brucellosis, anti-*B. canis* antibody showed lower detection and anti-BP26 serum did not identify any infected animal. Immunization of rabbits with radiation inactivated *Brucella* spp. produced anti-*Brucella* hyperimmune sera effective in identifying the *Brucella* antigens in the lesion, but the anti-BP26 hyperimmune serum was not able to identify those antigens.

Keywords: brucellosis, histopathology, immunodetection, polyclonal antibody.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies ou estirpes de *Brucella* spp. com seu respectivo hospedeiro preferencial.

Tabela 2: A técnica de imunoistoquímica como ferramenta de diagnóstico de *Brucella* spp. em tecidos de diferentes espécies animais naturalmente infectados.

Tabela 3: A técnica de imunoistoquímica como ferramenta para estudo de patogênese ou resposta imunológica avaliando localização da bactéria na lesão ou distribuição da bactéria em diferentes tecidos de animais experimentalmente infectados.

Tabela 4: Reatividade na imunoistoquímica dos diferentes tecidos parafinizados testados sabidamente infectados por *Brucella* spp. para os quatro anticorpos policlonais anti-*Brucella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Soros hiperimunes anti-*Brucella* expostos aos diferentes extratos brutos nas diluições de 1/100 e 1/1000. As linhas pontilhadas determinam o limite de reatividade de cada diluição.

Figura 2: Camundongo experimentalmente infectado com *Brucella ovis*. **A)** Fígado, microgranuloma, contendo neutrófilos, macrófagos epitelióides e linfócitos, HE, 40x; **B e D)** Reatividade dos anticorpos por imunistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticos e extracelulares, pelo sistema estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 40x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/500), fundo intenso, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/500), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/500), marcação negativa, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/500), marcação negativa.

Figura 3: Camundongo infectado experimentalmente com *B. abortus*. **A)** Fígado, microgranuloma, contendo neutrófilos, macrófagos epitelióides e linfócitos, HE, 40x; **B, C e D)** Reatividade dos anticorpos por imunistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticos e extracelulares, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 40x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/1000), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/500), marcação negativa, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/500), marcação negativa. 40x.

Figura 4: Bovino infectado experimentalmente com *Brucella abortus*. **A)** Placenta bovina, padrão inflamatório formado por macrófagos epitelióides, neutrófilos, com áreas de hemorragia e necrose, HE, 20x, **B, C e D)** Reatividade dos anticorpos por imunistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticos e extracelulares, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX). 20x. **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/1000), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal-*B. canis* (1/1000), marcação negativa, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/1000), marcação negativa.

Figura 5: Bovino infectado experimentalmente com *Brucella abortus*. **A)** Pulmão de feto bovino, infiltrado inflamatório constituído de neutrófilos, HE, 40x; **B, C e D)** Reatividade dos anticorpos por imunistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticos e extracelulares, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 40x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis*

(1/1000), marcação positiva, **E**) anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/1000), marcação negativa, **F**) anticorpo policlonal anti-BP26 (1/1000), marcação negativa.

Figura 6: Canino infectado naturalmente por *Brucella* spp. **A**) Placenta canina, vilosidade placentária com predomínio de monocamada de trofoblastos canino, discreta congestão, e raros histiócitos aleatórios no interstício, HE, 20x; **B, C, D e E**) Reatividade dos anticorpos por imunistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticas, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 20x; **B**) anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C**) anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D**) anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/1000), marcação positiva, **E**) anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/100), marcação positiva, **F**) anticorpo policlonal anti-BP26 (1/1000), marcação negativa.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT-antígeno acidificado tamponado

BSA-albumina sérica bovina

CDTN-Centro de Desenvolvimento e Tecnologia Nuclear

DNA-ácido desoxirribonucleico

ELISA-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FC-fixação de complemento

HE-hematoxilina/eosina

IDGA-imunodifusão em gel de ágar

IgG-imunoglobulina G

IHQ-imunoistoquímica

IPTG-isopropyl β -D-thiogalactoyranoside

KG-quilograma

LPS-lipopolissacarídeo

mg-miligrama

mL-mililitro

μ L-microlitro

ng-nanograma

nm-nanômetro

OMP-proteína de membrana externa

PCR-reação em cadeia da polimerase

TSA-ágar triptose de soja

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. O gênero <i>Brucella</i>	19
2.2. Brucelose em animais domésticos	21
2.2.1. Brucelose bovina	21
2.2.2. Brucelose ovina por <i>Brucella ovis</i>	22
2.2.3. Brucelose canina	23
2.3. Diagnóstico de brucelose animal	24
2.3.1. Isolamento bacteriano	25
2.3.2. Técnicas sorológicas	25
2.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	27
2.3.4. Imunoistoquímica	28
2.3.5. Imunoistoquímica anti- <i>Brucella</i> spp.	29
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL e MÉTODOS	36
4.1. Proteína recombinante BP26	36
4.2. Preparação de <i>Brucella</i> spp. gama irradiada	36
4.3. Imunização	36
4.4. Obtenção dos soros hiperimunes	37
4.5. ELISA indireto e eutanásia dos coelhos	38
4.6. Amostras de tecidos parafinizados	39
4.7. Imunoistoquímica	39
4.8. Análise estatística	40

5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
9. ANEXO 1	63

1. INTRODUÇÃO

Brucelose é uma importante doença infecciosa zoonótica causada por bactérias do gênero *Brucella*, que afeta principalmente mamíferos domésticos com distribuição mundial (Gyles et al., 2011; Sola et al., 2014). Atualmente são reconhecidas 17 espécies, pertencentes ao gênero, com grande similaridade genética entre elas, afetando diferentes espécies de animais (Moreno, 2021).

A manifestação clínica da brucelose em animais domésticos é principalmente relacionada com alterações no sistema reprodutor, tanto em machos quanto em fêmeas. Nas fêmeas, a principal característica é o aborto, fetos fracos quando nascem e queda na produção de leite; em machos, subfertilidade e quadros de orquite, epididimite e vesiculite são observados causando grande impacto econômico na saúde animal (Xavier et al., 2009a; Carvalho Neta, et al., 2010; McCollum et al, 2011; Greene e Carmichael, 2012; Petrovic et al., 2014; Silva et al, 2015; Camargo-Castañeda, et al., 2021).

As infecções por *Brucella* spp. têm impacto na saúde pública por se tratar de uma importante zoonose. O homem é infectado por contato direto com animais ou indiretamente pela ingestão de produtos de origem animal e pela inalação de agentes transportados pelo ar (Acha e Szyfres, 2003). Assim, brucelose é doença de caráter ocupacional afetando médicos veterinários e criadores que manipulam secreções ou tecidos de animais com problema reprodutivo.

O diagnóstico da brucelose é baseado nas manifestações clínicas em associação de exames laboratoriais, sendo as provas diretas como o isolamento bacteriano, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou Imunoistoquímica, e provas sorológicas indiretas diversas os exames laboratoriais usualmente empregados. (Mol et al., 2012; Mol et al, 2020). A imunoistoquímica utiliza anticorpos policlonais ou monoclonais anti-*Brucella* para detecção do agente no tecido. Os anticorpos policlonais podem ser obtidos após alguns meses do início das imunizações em animais de laboratório, enquanto a geração de hibridomas e subsequente produção de anticorpos monoclonais podem levar até um ano ou mais em alguns casos, exigindo, portanto, custo e tempo consideravelmente mais elevados (Lipman et al., 2005). Para a produção de anticorpos policlonais, os coelhos são usados com mais frequência devido ao seu tamanho conveniente, facilidade de manuseio e sangramento, tempo de vida relativamente longo e produção adequada de antissoro precipitante com altos títulos e alta afinidade (Stills, 1994). Nosso grupo de pesquisa realiza estudos científicos de infecção natural ou experimental relacionados à brucelose a mais de uma década (Paixão et al., 2009;

Xavier et al., 2009b; Carvalho Neta et al., 2010; Carvalho Junior et al., 2012; Silva et al., 2015; Souza et al., 2018; Eckstein et al., 2020; Mol et al., 2020). O diagnóstico da brucelose baseia-se principalmente em técnicas bacteriológicas e sorológicas. O isolamento bacteriano tem alta especificidade, mas longos períodos de incubação são necessários e exigem instalações de nível 3 de biossegurança (Poester et al., 2005). Portanto, o uso de testes sorológicos é recomendado para obter provas indiretas da infecção. No entanto, a presença de anticorpos não prova diretamente um caso de brucelose e frequentemente fornecem resultados falso-positivos devido a reações cruzadas com outras bactérias (Corbel, 1985; Alton et al., 1988; Weynants et al., 1996). E ainda, no caso de brucelose canina, testes sorológicos disponíveis podem resultar em falso-negativos (Mol et al., 2020).

O exame imunoistoquímico de tecidos parafinizados para antígenos de *Brucella* spp. é considerado sensível e específico além de ser o único teste que exhibe a morfologia do tecido, e portanto, capaz de demonstrar a distribuição e localização de patógenos nos tecidos. Assim, essa técnica pode ser considerada uma ótima alternativa para os outros métodos diagnósticos e uma ferramenta valiosa para o patologista (Pérez et al., 1998; Ilhan e Yener, 2008; Xavier et al., 2009). No entanto, a reação cruzada com outras bactérias ou entre bactérias do gênero *Brucella*, pode ser uma limitação, principalmente na ausência de outros testes diagnósticos (Pérez et al., 1998; Ilhan e Yener, 2008).

São empregados anticorpos monoclonais e policlonais na reação imunoistoquímica para diagnóstico ou patogênese de *Brucella* (Sozmen et al., 2004; Ilhan e Yener, 2008; Paixão et al., 2009; Benna et al., 2017; Camargo-Castañeda et al., 2021), e a maioria dos estudos envolve anticorpos policlonais desenvolvidos a partir das principais espécies de *Brucella* lisa (Ilhan e Yener, 2008; Paixão et al., 2009; Souza et al., 2018; Camargo-Castañeda et al., 2021).

A proteína periplasmática BP26 de *Brucella* spp. já foi expressa e purificada por Zygmunt et al. (2002) e reconhecida como proteína antigênica útil no diagnóstico de brucelose ovina causada por *B. melitensis* ou *B. ovis* (Cloeckert et al., 1996; Debbarh et al., 1996; Qiu, 2012). Em ensaios Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), BP26 já demonstrou ser um antígeno promissor para confirmação de infecções causadas por *B. melitensis* e *B. ovis* (Cloeckert et al., 2001; França et al. 2014). No entanto, seu uso como antígeno para produção de anticorpo primário para teste de imunoistoquímica ainda não foi explorado.

Assim o presente estudo avalia o uso de diferentes soros hiperimunes anti- *Brucella* em imunoistoquímica na detecção de diferentes espécies de *Brucella* em amostra de animais

naturalmente ou experimentalmente infectados por *Brucella* spp. Até o presente momento, ainda não existe um trabalho que empregue a imunistoquímica para diferenciar as espécies de *Brucella* em amostra de tecido parafinizado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Brucella*

Brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella*, pertencentes à família *Alpha-2-Proteobacteracea*. As bactérias desse gênero são cocobacilos Gram-negativos, intracelulares facultativos, imóveis e não formadoras de esporos (Gyles et al., 2011; Sola et al., 2014). A primeira nota sobre a existência dessas bactérias foi no ano de 1887, onde David Bruce isolou o micro-organismo do baço de soldados mortos na região do Mediterrâneo (Bruce, 1887).

O gênero *Brucella* apresentou grande expansão nos últimos anos com inicialmente 6 espécies clássicas, ampliando continuamente para 12 diferentes espécies (Pappas, 2006; Whatmore et al., 2009; Whatmore et al., 2014), e hoje se somam 17 espécies ou isolados em diversos animais, principalmente mamíferos terrestres e marinhos, mas também descrito já em anfíbios como sumarizado na Tabela 1 (Moreno, 2021). Cinco espécies infectam animais domésticos sendo, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis* e *Brucella ovis*. Esta última é a única considerada não zoonótica (Gysles et al., 2011; Esquivel et al., 2017).

A incidência de brucelose humana está diretamente relacionada à ocorrência da doença em animais, principalmente em animais domésticos. Por esta razão, existem esforços mundiais para controle e erradicação da brucelose em animais domésticos, que geralmente são baseados em identificação e eliminação de animais positivos em rebanhos ou criações e na vacinação no caso de ruminantes (Xavier et al., 2009b; Mol et al., 2012).

A manifestação clínica da brucelose é bem caracterizada e semelhante entre as espécies de animais domésticas principalmente relacionadas às alterações reprodutivas. Nas fêmeas, observam-se falhas na reprodução como retorno ao cio, placentite, metrite, abortamento, e nascimento de feto fraco quando vem a termo e queda na produção de leite. Nos machos pode ocorrer subfertilidade, associada à orquite, vesiculite e epididimite. Contudo alterações articulares também são descritas (Wank, 2004; Xavier et al., 2009a; Gyuranecz et al., 2011; Silva et al., 2015).

Tabela 1: Espécies ou estirpes de *Brucella* spp. com seu respectivo hospedeiro preferencial.

Hospedeiro	Espécies	Potencial Zoonótico	Referência
Ovinos e caprinos	<i>Brucella melitensis</i>	Alto	Gardner et al., 1932
Bovinos e bubalinos	<i>Brucella abortus</i>	Moderado	Dickson, 1927
Canídeos	<i>Brucella canis</i>	Baixo	Jones et al., 1968
Suínos	<i>Brucella suis</i>	Moderado	Park et al., 1932
Ovinos e cervídeos	<i>Brucella ovis</i>	Ausente	Buddle, 1956
Roedores	<i>Brucella neotomae</i>	Baixo	Cameron e Meyer, 1958
Baleias e golfinhos	<i>Brucella ceti</i>	Baixo	Foster et al., 2007
Roedores	<i>Brucella microti</i>	Não relatado	Scholz et al., 2008
Raposa vermelha	<i>Brucella vulpis</i>	Não relatado	Scholz et al., 2016
Babuínos	<i>Brucella papionis</i>	Não relatado	Whatmore et al., 2014
Desconhecido	<i>Brucella inopinata</i>	Baixo	Scholz et al., 2010
Foca	<i>Brucella pinnipedialis</i>	Baixo	Foster et al., 2007
Sapo	<i>Brucella</i> spp. Frogs	Baixo	Eisenberg et al., 2012
Camaleão	<i>Brucella</i> spp. Chameleon	Baixo	Eisenberg et al., 2020
Raia	<i>Brucella</i> spp. Fish	Baixo	Eisenberg et al., 2017
Golfinho	<i>Brucella</i> ST27	Baixo	Cloekaert et al., 2011
Rato	<i>Brucella</i> spp. Rodent/Australian	Baixo	Tiller et l., 2010

Fonte: Moreno, 2021

Brucelose humana manifesta-se com sinais inespecíficos de febre ondulante, sudorese, perda de peso, fadiga e cefaleia (Lawinsky et al., 2010; Silva et al., 2011). Na forma crônica da doença, ocorre manifestação sistêmica com lesões graves, acarretando esplenomegalia, hepatomegalia, endocardite, meningoencefalite e osteoartrite (Pappas et al., 2006; Byndloss e Tsolis, 2015). A transmissão da *Brucella* para o homem depende de fatores passivos ou não, por exemplo, a ingestão de lácteos contaminados, contato com material biológico placentário, membranas fetais e fluidos corporais, inoculação acidental de vacinas, ou exposição durante trabalho em laboratórios e frigoríficos (Pereira et al., 2020).

2.2. Brucelose em animais domésticos

No Brasil, dentre as manifestações de brucelose animal destaca-se a brucelose bovina causada por *B. abortus*, um dos principais agentes causadores de aborto em rebanhos bovinos; brucelose ovina causada por *B. ovis*; considerado um dos principais agentes de epididimite infecciosa ovina; e brucelose canina causada por *B. canis*, responsável por abortamento e natimortalidade e mortalidade perinatal em cães (Carvalho Neta et al., 2010; Carvalho Junior et al., 2012; Souza et al., 2018). Brucelose ovina e caprina por *B. melitensis* é considerada exótica no Brasil, e brucelose suína tem menor importância principalmente devido o seu controle na suinocultura tecnificada. Desta forma, serão abordados os aspectos clínicos e anatomopatológicos da brucelose bovina, ovina e canina.

2.2.1. Brucelose bovina

Brucelose bovina é caracterizada principalmente por alterações em órgãos do trato reprodutivo. Vacas sexualmente madura apresentam abortamento no terço final de gestação, queda na produção leiteira, aumento no número de células somáticas, e retorno ao cio, touros por vezes apresentam redução na taxa de fertilidade, orquite, epididimite, vesiculite, além de febre e anorexia. Os bezerros podem nascer fracos, e óbito em um curto espaço de tempo ou não apresentar alteração clínica (Carvalho Neta et al., 2010). Quadros de artrite é pouco comum em animais infectados por *B. abortus* resultam em aumento articular, pelo envolvimento da cápsula e aumento na produção de líquido sinovial (Johnson et al., 1984). Vale ressaltar que o aparecimento de sinais clínicos depende de fatores, que incluem status imunológico, a via de infecção (principal trato gastrointestinal) e a idade do animal (Carvalho Neta et al., 2010).

Macroscopicamente o tecido acometido nas fêmeas, apresenta útero com aumento de tamanho e presença de líquido em seu interior de odor fétido, placenta com áreas de hemorragia e necrose. Outros órgãos como glândula mamária, linfonodos superficiais e internos, e o baço apenas há aumento de tamanho. A microscopia observa-se placentite necro-hemorrágica neutrofílica, com colônias bacterianas, resto fetal e infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário e neutrofílico perivascular; endometrite linfoplasmocitária e neutrofílica multifocal a difusa, associada à vasculite, necrose fibrinóide, edema periglandular, com áreas de ulceração multifocal na superficial endometrial. Na mama têm-se mastite intersticial multifocal com a presença de neutrófilos, histiócitos e cocobacilos intracelulares, que podem

chegar a atingir os linfonodos mamários com a presença da bactéria. O tecido linfoide apresenta-se hiperplásico, e infiltrado inflamatório composto de neutrófilos e histiócitos perifolicular ou se estendo do córtex para a medula respectivamente (Xavier et al., 2009b; Carvalho Neta et al., 2010).

Os fetos abortados ou natimortos têm alterações significativas em pericárdio, pulmões, pleura, fígado, baço, timo, adrenal e linfonodos bronquiais e esplênicos. Na macroscopia nota-se exsudato fibrinoso generalizado nas cavidades torácica e abdominal incluindo, hipotrofia de timo com áreas de hemorragia petequial, aumento no tamanho dos órgãos linfoides e adrenal. Na microscopia dos órgãos fetais têm-se pericardite e pleurite fibrinosa severa, rico em linfócitos, neutrófilos e plasmócitos, e congestão difusa; broncopneumonia ou por vezes pneumonia intersticial com inúmeros neutrófilos, associados a vasculite e trombose. Linfonodos possuem hiperplasia linfoide, mas também inflamação neutrofílica multifocal. Esplenite e hepatite são vistos, e o padrão inflamatório encontrado é formado principalmente por neutrófilos (Pérez et al., 1998; Xavier et al., 2009b; Carvalho Neta et al., 2010).

2.2.2. Brucelose ovina por *Brucella ovis*

Em carneiros infectados por *B. ovis* observa-se aumento da bolsa escrotal, geralmente com o acometimento de um único lado, mas que pode envolver ambos, associada à sensibilidade dolorosa a palpação, e infertilidade decorrente de orquite e principalmente epididimite (Carvalho Junior et al., 2012). As fêmeas, por sua vez de forma menos frequente, apresentam quadro clínico semelhante ao que se observa em vacas, como infertilidade, queda na produção, incluindo também quadros de aborto, natimortos ou neonatos fracos (McCollum et al, 2011).

A macroscopia de carneiros infectados com *B. ovis*, nota-se aumento de epidídimo e da glândula vesícula seminal. Assimetria epididimária na porção distal do órgão, que pode apresentar nódulos de coloração branco-amarelado com aspecto cremoso na superfície de corte (Carvalho Junior et al., 2012; Petrovic et al., 2014; Silva et al., 2015). Observa-se também fibrose na porção interna da túnica vaginal, e formação de aderência entre a cauda do epidídimo e testículo (Petrovic et al., 2014; Silva et al., 2015). As lesões histológicas são caracterizadas por infiltrado inflamatório intersticial composto por neutrófilos, linfócitos e histiócitos com intensidades diferentes no epidídimo, testículo, ampolas e glândula vesicular. Em alguns casos, granulomas espermáticos podem ser observados no epidídimo de carneiros

(Foster et al., 1988; Carvalho Junior et al., 2012; Petrovic et al., 2014; Silva et al., 2015). Inflamação também pode ser observada no baço, fígado, e linfonodos ilíacos (Silva et al., 2015).

Alterações macroscópicas em ovelhas são pouco observadas, e o quadro geralmente é de mastite, metrite e placentite. Em ovelhas que ocasionalmente tem lesões decorrentes de infecção por *B. ovis*, observam-se na microscopia lesões diversas em útero, placenta e glândula mamária. Infiltrado inflamatório de linfócitos, neutrófilos, restos celulares e fibrina estão presentes do lúmen do útero e no interior das glândulas endometriais, que por sua vez podem chegar até o miométrio. Na placenta focos de necrose e hemorragia, e processo inflamatório constituído por macrófagos e neutrófilos; o útero apresenta macrófagos e neutrófilos, com restos celulares necrosados, e na glândula mamária, processo inflamatório constituído de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, que se situam intersticial ou no interior das glândulas acinares (McCollum et al., 2011).

Os fetos de ovelhas apresentam padrão macro e microscópico de pleuropneumonia, e a inflamação na histopatologia é leve a moderada com presença de linfócitos e neutrófilos intersticial e às vezes perivascular. A placenta fetal tem padrão de necrose e degeneração em grau variado com inflamação de neutrófilos (McCollum et al., 2011).

2.2.3. Brucelose canina

A brucelose canina apresenta manifestação clínica variada, e apesar de serem quadros sistêmicos, normalmente são brandos (Greene e Carmichael, 2012). Clinicamente, os machos apresentam aumento escrotal, testicular e epididimária, sem qualquer dor na palpação, porém em situações que o animal é utilizado para cópula, expressa sinais de dor durante a ejaculação, observados na fase aguda da doença. Quando o quadro se torna crônico, os animais apresentam atrofia testicular e dermatite escrotal (Silva e Manhoso, 2010; Greene e Carmichael, 2012; Meló et al., 2013; Rodrigues et al., 2017; Camargo-Castañeda, et al., 2021). Fêmeas maduras sexualmente por sua vez, podem apresentar quadro de abortamento a partir de 45 dias de gestação, e secreção vaginal. Os neonatos fracos vão ao óbito, ou em alguns casos o filhote viável tem quadro clínico de febre transitória, convulsão e linfadenomegalia (Greene e Carmichael, 2012; Meló et al., 2013; Rodrigues et al., 2017). Além da manifestação relacionada ao trato reprodutivo nesta espécie, outras causas como, esplenomegalia, linfadenomegalia, discoespondilite, poliartrite e osteomielite que geram

claudicação e dor são notados em machos e fêmeas adultos sem predileção sexual (Greene e Carmichael, 2012).

Os achados macroscópicos da brucelose canina são caracterizados por linfadenomegalia superficial e interna, tanto em machos quanto em fêmeas adultas ou filhotes (Greene e Carmichael, 2012). Os machos por sua vez no estado crônico da doença apresentam dermatite ulcerativa, atrofia testicular e epididimária; na fase aguda caracteriza-se por alteração de epididimite, orquite e prostatite. (Graham e Taylor, 2012; Camargo-Castañeda et al., 2021). Nas fêmeas, as lesões macroscópicas envolvem o útero e glândula mamária, com metrite e mastite, respectivamente. (Wank, 2004; Gyuranecz et al., 2011). Microscopicamente, a intensidade de inflamação mais severa nos machos está presente na próstata, e epidídimo, constituído principalmente por linfócitos, neutrófilos e macrófagos (Gyuranecz et al., 2011; Hofer et al., 2012), e que também pode conter focos de necrose (Camargo-Castañeda et al., 2021; Santos et al., 2021). A forma grave da doença na cadela é encontrada no endométrio e placenta, com quadro grave de endometrite histiocítica e linfocítica subaguda a crônica com hiperplasia das glândulas endometriais, e placentite linfocítica (Greene e Carmichael, 2012; Camargo-Castañeda et al., 2021). Outras alterações macroscópicas e microscópicas como hepatite necrosante, esplenite, nefrite, pneumonia intersticial, linfadenite, uveíte, meningoencefalite, edema e hemorragia intestinal e do subcutâneo são reportadas em cães adultos (Wank, 2004; Gyuranecz et al., 2011; Greene e Carmichael, 2012).

As alterações macroscópicas de natimortos oriundo do aborto são edema subcutâneo, congestão e hemorragia na cavidade abdominal, e se inclui graus de autólise fetal (Greene e Carmichael, 2012). Os neonatos e natimortos possuem lesões microscópicas em diversos órgãos, incluindo do trato reprodutivo e reticulo endotelial. *Brucella* spp. foi detecta no rim, sistema nervoso central, pulmão, intestino, fígado, bexiga, baço, placenta fetal, olho, coração, pele e cordão umbilical. O padrão de resposta inflamatória é basicamente formado de macrófagos (Souza et al., 2018).

2.3. Diagnóstico de Brucelose animal

O diagnóstico de brucelose em animais domésticos pode ser feito com métodos diretos ou indiretos. O reconhecimento da manifestação clínica, associada de testes sorológicos, isolamento bacteriano ou molecular para a detecção de DNA do agente por meio da PCR ou

detecção de antígeno do agente por imunistoquímica é o caminho para obter sucesso no diagnóstico da enfermidade em animais individualmente (Watt, 1972; Mol et al., 2012).

No Brasil, assim como em diferentes partes do mundo, para diagnosticar a brucelose ainda se requer associação de técnicas de diagnóstico (Souza et al., 2018; Mol et al., 2020). *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis*, são agentes bacterianos importantes no âmbito nacional, e o isolamento bacteriano a partir de amostras biológicas ainda é a principal ferramenta para o diagnóstico definitivo, embora PCR e imunistoquímica também detectam o agente (Alves et al., 2010; Xavier et al., 2010; Nardi Júnior et al., 2017; Souza et al., 2018; Mol et al., 2020). Já testes sorológicos são amplamente utilizados, principalmente para diagnóstico de rebanho ou canil ou estudos epidemiológicos (Magalhães Neto et al., 1996; Costa et al., 2016; Ferreira Neto et al., 2016; Mol et al., 2020).

2.3.1. Isolamento bacteriano

O isolamento do microrganismo é considerado o método padrão ouro no diagnóstico da brucelose. Ao isolar a cultura pura da cepa bacteriana, segundo suas características de crescimento em placa, e provas bioquímicas fornecem dados relevantes para determinar a espécie (Dahouk et al., 2003; Mol et al., 2012). Por ter espécies pertencentes ao gênero *Brucella* com potencial zoonótico, o uso de laboratório de biossegurança de nível 3 é necessário para o seu isolamento. *Brucella* é um microrganismo que requer meio de cultura rico em nutrientes, e por isso um meio usual para a cultura como ágar triptose de soja (TSA) acrescido ou não com hemoglobina a 1%, em determinadas situações acerca de possível contaminação da amostra, suplementação do ágar com antibióticos são necessários. Antibióticos são usados para inibir e limitar o crescimento de bactérias oportunistas, pois *Brucella* tem crescimento lento e apenas é notada na placa de cultivo com no mínimo três dias (Dabral et al., 2019; Eckestein et al., 2020; Hensel et al., 2020). Amostras biológicas frescas e coletadas de forma correta fornecem resultados positivos sem qualquer relação com contaminantes, em contrapartida havendo contaminação da amostra, e uso prévio de antibiótico diminui as chances de isolamento (Xavier et al., 2009b; Eikestein et al., 2020).

2.3.2. Técnicas Sorológicas

Testes sorológicos são importantes para o diagnóstico da brucelose, visto que programas de controle e erradicação da doença, utilizam e se baseiam no resultado obtido por

essas técnicas para definir as intervenções a serem feitas em rebanhos ou criações. Testes como aglutinação de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol, fixação do complemento (FC), ELISA, imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e microaglutinação em lâmina e teste imunocromatográfico são utilizados no diagnóstico da brucelose animal (Mol et al., 2012; Keid et al., 2015; Mol et al., 2020).

Microaglutinação em placa, rosa de bengala ou AAT é o teste mais usual no monitoramento e triagem da brucelose em rebanhos bovinos (Alton et al., 1988). O teste laboratorial apresenta fácil execução em um curto espaço de tempo, e necessita de poucos equipamentos. Resumidamente, uma placa de vidro com várias subdivisões nela é existente, dando para fazer diversas amostras ao mesmo tempo. Em um dessas áreas é colocado 25 µL de soro da amostra a ser testada e 25 µL do antígeno, que são misturados, girando a placa de vidro em movimentos circulares, durante 4 minutos. O resultado é observado quando se coloca a placa de vidro sobre uma câmara escura contra um feixe de luz central. Havendo a formação de grumos aglutinantes a amostra do soro é considerada positiva na reação (Alton et al., 1988; Díaz et al., 2011).

Comumente, o teste de 2-mercaptoetanol apresentam boa sensibilidade e especificidade, e considerada importante ferramenta confirmatória de brucelose principalmente em rebanhos e adotada pelo Ministério da Agricultura do Brasil (Stemshorn et al., 1985; Gall e Nielsen, 2004; Brasil; 2006). A finalidade e eficiência da técnica é gerar a precipitação e permanência intacta da imunoglobulina G (IgG) na amostra de soro, não restando qualquer outra classe de imunoglobulina (Butler et al., 1990; Brasil 2006). A prova é realizada em tubos de vidro com diluição seriada do soro, a fim de quantificar o IgG decorrente da formação de um halo (Brasil, 2006).

IDGA é uma prova sorológica utilizada no diagnóstico de *Brucella rugosa* como *B. ovis* e *B. canis* (Silva et al., 2015; Mol et al., 2020). O teste é realizado usando lâmina de vidro, e colocando sobre ela uma solução de agarose a 1%. No gel de agarose solidificado são feitos sete orifícios em formato de roseta, tendo um central. O antígeno é colocado no centro, e os soros que se quer testar é posto em três dos orifícios intercalados e nos demais se coloca soro controle positivo, e o resultado é obtido em 72 horas (Silva et al., 2015).

O FC é considerado específico para a detecção de animais positivos, mas a especificidade varia quanto ao antígeno utilizado (Adone et al., 2001; Massis et al., 2005; Bastos et al., 2018). Brasil e Canadá são países pertencentes ao continente americano, e usam o FC como prova confirmatória em programas de controle e erradicação da doença em

bovinos (Stemshorn et al., 1985; Bastos et al., 2018). O ensaio da reação para o diagnóstico permite a detecção no soro de animais suspeito, anticorpos das subclasses de imunoglobulinas M e G, por meio da ativação e ligação com proteínas do sistema complemento (Godfroid e Nielsen, 2010). Características de vantagens desta técnica são apresentar boa sensibilidade e especificidade, baixo custo, rapidez no diagnóstico e não necessitar de manuseio de amostra biológica por longo período, que reduz o risco de infecção acidental (Bastos et al., 2018).

Teste de ELISA indireto é outra ferramenta de diagnóstico sorológico para brucelose. A técnica é baseada na ligação de anticorpos anti-*Brucella* produzidos pelo animal, e sua ligação ao antígeno colocado na placa, formando uma reação colorimétrica e mensurada absorvância da intensidade de cor (Mol et al., 2012; França et al., 2014; Sánchez-Jiménez et al., 2020). Os antígenos mais utilizados na reação para identificar animais positivos em diferentes espécies são extrato bruto bacteriano, lipopolissacarídeo (LPS), proteínas de membrana externa (OMP) como OMP19, OMP25, OMP28, OMP31 e proteína periplasmática como BP26 (Mol et al., 2012, França et al., 2014, Manat e tal., 2016; Bulashev et al., 2020) ou outras proteínas (França et al., 2014; Sánchez-Jiménez et al., 2020).

2.3.3. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica molecular usada para detectar o DNA bacteriano ou caracterizar um isolado através da amplificação do material genético num curto espaço de tempo. Secreções vaginais ou prepuciais, sangue, urina, sêmen, leite ou mesmo tecido de animais adultos ou fetos abortados podem ser utilizadas como amostras (Xavier et al, 2009b; Mol et al., 2012; Silva et al., 2015; Çiftci et al., 2017).

A PCR convencional é o mais amplamente utilizada sendo a maioria capaz de identificar o grande gênero *Brucella*, considerando que o genoma das espécies é altamente conservado, ou seja, apresentam similaridade de mais de 95% de igualdade (Mol et al., 2020), embora tenha estudos que busquem o desenvolvimento de PCR espécie-específico para *Brucella* (Xavier et al., 2010). A principal vantagem da técnica de PCR é o diagnóstico fidedigno com a detecção do DNA bacteriano de amostras biológicas de animais infectados naturalmente ou experimentalmente, mas gera custo elevado quando se refere ao seu uso em grandes rebanhos (Mol et al., 2012).

2.3.4. Imunoistoquímica

Imunoistoquímica (IHQ) é uma técnica que pode ter um papel fundamental na rotina de um patologista veterinário no diagnóstico de doenças infecciosas. Por meio dela é possível a identificação da presença da bactéria na lesão característica da doença (Mol et al., 2012). *Brucella* spp. tem capacidade de causar lesões em órgãos alvo, principalmente do sistema reprodutor em animais domésticos (Xavier et al., 2009b; Carvalho Neta et al., 2010; Helsen et al., 2020). Recentemente Souza et al. (2018) demonstrou por imunoistoquímica a presença do agente infeccioso em diferentes tecidos de neonatos e natimortos caninos além dos órgãos com tropismo sabidamente reconhecido. Em estudos experimentais com camundongos, a espécie é amplamente utilizada para novas descobertas sobre a patogênese da doença; a imunoistoquímica demonstra a bactéria associada a lesões em baço e fígado, órgãos consistentemente infectados em modelo murino de brucelose (Silva et al., 2011; Silva et al., 2014; Byndloss et al., 2019).

A técnica de imunoistoquímica se baseia na detecção de antígenos da bactéria no tecido por anticorpos primários, estes por sua vez, são detectados por anticorpos secundários ligados a um complexo enzimático de revelação, onde o cromógeno atua nesta enzima para revelar a reação. Anticorpos primários podem ser monoclonais ou policlonais, e sensibilidade e especificidade pode variar consideravelmente (Paixão et al., 2009; Xavier et al., 2009b; Souza et al., 2018; Sierra et al., 2019). A sensibilidade em detectar o agente na lesão pode estar comprometida em decorrência do estado de conservação da amostra, o tempo prolongado que permanece em contato com a solução de fixação, autólise do material, oxidação do tecido por contato com o ar ambiental, gerando a perda de epítomos. Estes são alguns fatores que conferem desvantagens no uso da imunoistoquímica. As principais vantagens no uso da imunoistoquímica são o diagnóstico em curto espaço de tempo comparada ao isolamento, custo relativamente baixo, não necessita de laboratório de biossegurança de nível 3, o que resulta em menor risco de infecção acidental de laboratoristas (Mol et al., 2012).

Produção de anticorpos primários é um dos cerne para desenvolvimento de uma boa técnica de imunoistoquímica. Os anticorpos primários podem ser policlonais ou monoclonais. Os anticorpos monoclonais foram desenvolvidos a partir da década de 70 com intuito de melhorar a afinidade e especificidade destas proteínas quando utilizadas com fins laboratoriais (Köhler e Milstein, 1975). Para produzir um anticorpo monoclonal, é necessário conhecer o antígeno de interesse. Após imunizações geralmente de camundongos, linfócitos B do baço

secretando imunoglobulinas contra o antígeno alvo são coletados. Os linfócitos B são colocados em cultivo com células tumorais imortalizadas para fusão *in vitro* e formação do hibridoma (Qiu et al., 2012). Os hibridomas são as células capazes de produzir o anticorpo de interesse contra o epítipo desejado. Por meio da expansão clonal produzem grande quantidade do anticorpo monoclonal (Douglas e Palmer, 1988; Qiu et al., 2012; Li et al., 2017). Diferente dos anticorpos monoclonais, os anticorpos policlonais, são imunoglobulinas produzidas por diferentes linfócitos B. Esse conjunto de linfócitos B produzem anticorpos específicos capazes de reconhecimento de diferentes antígenos. Anticorpos policlonais obtidos através da produção de soro em animais imunizados com múltiplos antígenos contidos no extrato total ou parcial ou proteínas específicas do agente de interesse (Tolar et al., 2008).

A desvantagem na utilização de anticorpos monoclonais é que eles apresentam custo elevado, diferentemente dos anticorpos policlonais que são os mais empregados na imunoistoquímica, e são inversamente mais baratos, e sua produção ligeiramente demorada, todavia, apresentam menor sensibilidade na reação imunoistoquímica quando comparado ao anticorpo monoclonal (Ilhan e Yener, 2008; Sierra et al., 2017).

2.3.5. Imunoistoquímica anti-*Brucella* spp.

O primeiro trabalho na literatura que descreve o uso de técnica de imunoistoquímica para detecção de *Brucella* spp. foi realizado por Foster et al. (1988), detectando *B. ovis* em tecido reprodutivo de carneiros. Desde então, inúmeros outros trabalhos surgiram com a finalidade de diagnosticar animais possivelmente infectados por diferentes espécies do gênero conforme apresentado na Tabela 2. Os estudos norteiam principalmente a utilização de anticorpos policlonais, produzidos em laboratórios de pesquisa (Foster et al., 1988; Ilhan et al., 2008; Silva et al., 2015). Em sua maioria, os anticorpos policlonais são capazes de reconhecer diferentes epítipos expressos pelas diversas espécies de *Brucella*. Em sua maioria, estes anticorpos são produzidos principalmente por grupos de pesquisa, e não há seleção de um antígeno em específico como alvo na produção do anticorpo (Ilhan e Yener, 2008; Xavier et al., 2009b; Silva et al., 2015; Nurul-Izzati et al., 2018), o que difere dos anticorpos monoclonais, que são produzidos a partir de um antígeno alvo (Paixão et al., 2009). A produção de anticorpos normalmente utiliza coelhos como animais para serem imunizados contra um antígeno, e assim induzir a formação de anticorpos. A espécie é de fácil manutenção, produz quantidade considerável de soro hiperimune, além de requerer pouco

espaço físico para a produção de (Meador et al., 1989; Ilhan e Yener, 2008; Antoniassi et al., 2016; Camargo-Castañeda et al., 2021).

A técnica de imunoistoquímica tem sido utilizada como ferramenta para diagnóstico de brucelose em diferentes hospedeiros com a finalidade de detectar o antígeno presente principalmente em lesões como demonstrado na Tabela 2 e também para estudo da patogênese de *Brucella* em tecido de animais de laboratório ou hospedeiro infectados experimentalmente como demonstrado na Tabela 3. A técnica de imunoistoquímica por vezes é empregada em associação com técnicas moleculares como PCR, para que o resultado seja mais robusto (Souza et al., 2018; Sánchez-Sarmiento et al., 2019).

Poucos trabalhos usam anticorpos produzidos a partir de antígenos específicos como a OMP31 e LPS, que estão presentes em maior quantidade nas principais espécies de *Brucella* lisa (González-Barrientos et al., 2010; Beena et al., 2017). Outros utilizam extrato bruto de *Brucella* spp. ou mesmo o uso da cepa vacinal comercial como *B. abortus* B19 (Antoniassi et al., 2016; Camargo-Castañeda et al., 2021).

Por se tratar de uma doença com ampla distribuição mundial, gerar grandes perdas econômicas principalmente a produtores de ruminantes, e conter algumas espécies de *Brucella* com potencial zoonótico, é de suma importância reconhecer a manifestação clínica e realizar o diagnóstico correto da doença em indivíduos suspeitos. O emprego de técnicas de diagnóstico direto e indireto é preconizado, porém há o afinilamento quanto ao uso de algumas destas técnicas, como o isolamento bacteriano, tido como teste padrão ouro, mas requer instalações especializadas para isolar algumas espécies de *Brucella*. Assim técnicas que não necessitem de grandes instalações, como no caso da imunoistoquímica são usadas para determinar casos suspeitos para a doença em tecido parafinizado. Neste contexto, o desenvolvimento de diferentes soros hiperimunes anti-*Brucella* produzidos em coelhos a partir de antígenos de *B. abortus*, *B. canis* ou *B. ovis* inativadas por radiação gama, e uma proteína sabidamente antigênica conhecida como BP26, que induzam a produção de anticorpos específicos contra *Brucella* spp., e são capazes de detectar o agente bacteriano presente em lesões características da brucelose é considerado relevante.

Tabela 2: A técnica de imunistoquímica como ferramenta de diagnóstico de *Brucella* spp. em tecidos de diferentes espécies animais naturalmente infectados.

Animal avaliado	Amostras de tecido	Antígeno usado	AC ^a primário	Produção do AC	Referências
Bovino	Diversos tecidos fetais	<i>B. abortus</i>	Policlonal	IND ^b	Orlando et al., 2014
Bovino	Pulmão, fígado e rim	<i>B. abortus</i>	Policlonal	Coelho	Pérez et al., 1998
Bovino	Pulmões, fígado, coração, rins, baço, cérebro, linfonodo brônquico, timo e abomaso	<i>B. abortus</i>	Policlonal Comercial (Difco)	Coelho	Sozmen et al., 2004
Bovino	SNC, pulmão e placenta	<i>B. abortus</i> (B19-viva)	Policlonal	Coelho	Antoniassi et al., 2016
Canino	Diversos tecidos de neonatos e placenta	<i>B. abortus</i> (B19-viva)	Policlonal	Coelho	Souza et al., 2018
Canino	Placenta, pulmão, fígado, rim, baço, coração, pulmão, intestinos, testículos, epidídimo, ovários, útero e linfonodos	IND	Policlonal	Coelho	Gyuranecz et al. 2011
Canino	Placenta e pulmão	<i>Brucella</i> spp.	Policlonal Comercial (AMS BD)	Coelho	Hofer et al., 2012
Canino	Testículo e epidídimo	Extrato Bruto de <i>Brucella</i>	Policlonal Comercial (Bioss)	Coelho	Camargo-Castañeda et al., 2021
Caprino	Útero	Omp31	Policlonal Comercial (Sigma Aldrich)	Coelho	Beena et al., 2017
Golfinho nariz-de-garrafa (<i>Tursiops Truncatus</i>)	Cérebro e articulação glenoumeral	IND	Monoclonal	IND	Sierra et al., 2019

Golfinho-listrado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Cérebro, medula espinhal, coração, placenta e feto	LPS de <i>Brucella</i>	Policlonal	Coelho	González-Barrientos et al., 2010
Logomorfo (<i>Lepus europaeus</i>)	Coração, pulmão, fígado, baço, nódulos linfáticos, rim, intestino grosso, ovário e útero	<i>B. suis</i> biovar 2 (viva)	Policlonal	Camundongo	Gyuranecz et al., 2011
Ovino	Fígado, baço, rim e pulmão	<i>B. melitensis</i> 16M (inativada)	Policlonal	Coelho	Ilhan e Yener, 2008
Ovino	Testículo, epidídimo, ampola, vesícula seminal.	Extrato Bruto <i>B. ovis</i>	Policlonal	Coelho	Foster et al., 1988
Ovino e caprino	Pulmão	<i>B. melitensis</i>	Policlonal	Cabra (soropositiva naturalmente infectada)	Nurul-Izzati et al., 2018

^aAC – Anticorpo, ^bIDN – indeterminado,

Tabela 3: A técnica de imunistoquímica como ferramenta para estudo de patogênese ou resposta imunológica avaliando localização da bactéria na lesão ou distribuição da bactéria em diferentes tecidos de animais experimentalmente infectados.

Animal avaliado	Espécie inoculada	Amostras avaliadas	Antígeno usado	AC primário	Produção AC	Referências
Ave (<i>Gallus gallus</i>) – ovo embrionado	<i>B. microti</i>	Coração, pulmão, fígado, baço, rins, trato gastrointestinal, tegumento, medula espinhal, cérebro, olhos, mucosa da cavidade oral e nasal, membrana cório alantoide e saco vitelino	Extrato Bruto de <i>Brucella</i>	Policlonal Comercial (Bioss)	Coelho	Wareth et al., 2015
Bovino	<i>B. abortus</i>	Tecido materno - Linfonodo ilíaco, baço, fígado, placentoma, glândula mamária e endométrio Tecido fetal – baço, fígado, linfonodo bronquial e pulmão	<i>B. abortus</i> (B19-viva)	Policlonal	Coelho	Xavier et al., 2009b
Bovino	<i>B. abortus</i> (B19)	Testículo, epidídimo	<i>B. abortus</i> (B19)	Policlonal	Bovino (soro de um animal inoculado subcutâneo com B19, deste experimento)	Santos et al., 1998
Camundongo	<i>B. canis</i>	Baço, fígado linfonodo mesentérico e útero.	Extrato Bruto de <i>Brucella</i>	Policlonal Comercial (Bioss)	Coelho	Stranahan et al., 2019
Camundongo	<i>B. ovis</i>	Baço, fígado, testículo, vesícula seminal.	<i>B. ovis</i>	Policlonal	Coelho	Silva et al., 2011
Camundongos	<i>B. melitensis</i> e <i>B. canis</i>	Baço, fígado	Proteína antigênica de <i>B.</i>	Monoclonal	IND	Paixão et al., 2009

			<i>melitensis</i>			Eckstein et al., 2020
Caprino	<i>B. abortus</i>	Membrana conjutival, membrana sinovial da articulação, linfonodo, fígado, baço, testículo, prepúcio, epidídimo, glândula bulbouretral e vesícula seminal.	IND	Policlonal	Coelho	Nasruddin et al., 2014
Caprino	<i>B. abortus</i>	Linfonodo supramamário e glândula mamária	<i>B. abortus</i> 2308 (inativada calor)	Policlonal	Coelho	Meador et al., 1989
Ovino	<i>B. melitensis</i>	Placenta, pulmão, fígado, baço e útero	Extrato Bruto de <i>Brucella</i>	Policlonal comercial (Bioss)	Coelho	Hensel et al., 2020
Ovino	<i>B. ovis</i>	Baço, fígado, intestino, placenta, pulmão, testículo, ampola, glândula vesicular, abomaso, epidídimo, próstata.	<i>B. ovis</i>	Policlonal	Coelho	McCullen et al., 2012
Primata (<i>Macaca mulata</i>)	<i>B. melitensis</i> 16M	Diversos órgãos.	LPS de <i>Brucella abortus</i>	Policlonal	Coelho	Mense et al., 2004

^aAC – Anticorpo, ^bIDN – indeterminado,

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a eficácia de quatro diferentes soros hiperimunes de coelho anti-*Brucella* em detectar por imunistoquímica antígenos de *Brucella* spp. em tecidos parafinizados de animais infectados experimentalmente ou naturalmente com *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis*.

3.2. Objetivos específicos

- Produzir quatro diferentes soros hiperimunes de coelho anti-*Brucella* imunizados com *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis* inativada por radiação gama ou proteína recombinante BP26.
- Avaliar eficácia e determinar a diluição de uso dos soros hiperimunes anti-*Brucella* nos tecidos dos animais infectados naturalmente e experimentalmente com *Brucella* spp.
- Determinar ocorrência de reação cruzada dos soros hiperimunes anti-*Brucella* na detecção de antígenos de *Brucella abortus*, *Brucella canis* e *Brucella ovis* em tecidos de dos animais *naturalmente* e *experimentalmente infectados*.
- Testar especificidade dos soros hiperimunes anti-*Brucella* em tecido de animais infectados com *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, *Actinobacillus seminis*, *Trueperella pyogenes* e *Bacillus cereus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Proteína Recombinante BP26

A BP26 é uma proteína periplasmática já estudada e conservada entre as principais espécies de *Brucella*, e sabe-se que apresenta potencial antigênico (Salih-Alj Debbbarh et al., 1996; Cloeckert et al., 2001; Qiu, 2012; França et al., 2014). Por esta razão, esta proteína foi escolhida como antígeno para produção de anticorpo policlonal. O plasmídeo de expressão contendo a proteína recombinante de BP26 utilizada neste estudo, foi previamente produzido no Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária por França et al. (2014), segundo a metodologia descrita por Davies et al. (2005). De forma resumida, a sequência do gene BMEI0536 localizado no cromossomo I de *B. melitensis* (número de acesso no GenBank AE008917.1), que codifica a proteína BP26 foi amplificada e clonada em um plasmídeo de expressão, vetor pXT7 (França et al., 2014). Uma alíquota de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo de expressão para BP26, foi adicionada em caldo LB sob agitação a 200 rpm durante 4 horas a 37°C. O início da expressão foi iniciado pela adição de IPTG na concentração de 1 mM (Invitrogen, EUA). Ao final, a suspensão bacteriana foi alíquotada, centrifugada, e o sobrenadante desprezado. O precipitado sofreu sonicação e purificação por cromatografia de afinidade para obtenção da proteína recombinante (França et al., 2014).

4.2. Preparação de *Brucella* spp. gama irradiada

Bactérias usadas como antígenos foram inativadas por radiação gama. Uma suspensão de 10⁹ UFC/mL de *B. abortus* (cepa 2308), *B. ovis* (ATCC 25840) e *B. canis* (ATCC 23365) em PBS foram submetidos a 15 Kgray de radiação gama no Centro de Desenvolvimento e Tecnologia Nuclear (CDTN, UFMG). Para confirmar a inativação, 100 µL do inóculo foi semeado em TSA com 1% de hemoglobina e incubado a 37°C, e 5% de CO₂ por no mínimo sete dias. Nenhuma colônia cresceu em nenhuma das três suspensões.

4.3. Imunização

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, sobre o protocolo (CEUA-UFMG: 67/2019).

Quatro coelhas (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, com idade de dois meses, foram alojadas em gaiolas individuais apropriadas durante todo o período experimental, localizadas no Departamento de Preventiva Veterinária, da Escola de Veterinária da UFMG. Cada animal recebeu ração e água *ad libitum*, e foram supervisionadas diariamente. Para a produção do soro foram usadas três suspensões diferentes de bactéria inativada por irradiação gama, *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis*, e uma proteína recombinante BP26.

Cada coelha recebeu uma das bactérias gama irradiada ou a proteína recombinante purificada com intervalo médio de 21 dias, em um total de três doses, exceto a coelha que recebeu a suspensão de *B. canis*, que recebeu cinco doses. Cada dose tinha 5×10^8 UFC de bactéria ou 200 µg de proteína em um volume de 0,5 mL, associado a 0,5 mL de adjuvante de hidróxido de alumínio (volume total de 1 mL). A administração do imunógeno foi realizada em sítio único, pela via subcutânea na região do flanco. Antes de qualquer aplicação do imunizante, eram coletados de 1 a 2 mL de sangue total de veia da orelha por gotejamento em microtubo autoclavado, utilizando agulha hipodérmica (13 galjes - 1/2"). Este sangue coletado foi para obtenção do soro correspondente a cada fase de imunização para avaliação de soroconversão por *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay Indirect* (ELISAI). As alíquotas de soros foram denominadas como T0 (pré-imunização), T1 (21 dias após 1º dose), T2 (21 dias após 2º dose), T3 (21 dias após 3º dose), quando necessário T4 (21 dias após 4º dose), e T5 (21 dias após 5º dose).

4.4. Obtenção do soro hiperimune

Após confirmação de reatividade do soro por ELISAI, as coelhas foram eutanasiadas para obtenção do soro hiperimune. O procedimento de eutanásia foi realizado em sala separada dos demais animais. As doses de xilazina (15 mg/kg, via intramuscular) e cetamina (80 mg/kg, via intramuscular) foram administradas no membro pélvico entre os músculos semitendinoso e semimembranoso. Com o animal anestesiado, foi feita a sangria pela veia jugular e coletado o máximo de sangue total em tubo falcon de 50 mL para obtenção do soro hiperimune. Ao término da coleta de sangue, foi administrada solução concentrada de cloreto de potássio para induzir parada cardíaca e óbito do animal ainda sobre efeito anestésico.

Tubos falcon contendo o sangue total de cada animal foram deixados em repouso em média de 18 horas em geladeira, e temperatura entre quatro e 8°C. Após, os tubos foram

centrifugados sob 4000 rpm, a 20°C por 10 minutos. Cada soro foi alíquotado em 1000 µL em microtubo estéril, identificado e estocado a -20°C.

Cada soro hiperimune anti-*Brucella* foi testado para determinar a concentração proteica, utilizando o Kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay (Thermoscientific), em duplicatas, seguindo as instruções do fabricante. A concentração de proteína estimada foi de 58,6 mg/mL no soro anti-*B. abortus*, 74,45 mg/mL de proteína no soro anti-*B. ovis*, 74,05 mg/mL de proteína no soro anti-*B. canis* e 40,7 mg/mL no soro anti-BP26.

4.5. Elisa indireto e eutanásia dos coelhos

A avaliação do soro conversão das coelhas foi feita pela análise de reatividade dos soros hiperimunes por meio de teste de ELISAI com antígenos brutos sonicados de *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis* e proteína recombinante BP26 em comparação aos soros obtidos antes da imunização. Os soros dos quatro animais antes da primeira imunização foram usados como soros negativos para determinar o ponto de corte de densidade óptica e determinar se soro dos animais era reagente após a imunização.

Placas de ELISA de 96 poços (Greiner-Bio-One, EUA) foram sensibilizadas com 0,25, 0,5, 1 e 2 ng antígeno bruto em 100 µL por 18 horas a 4°C. Após a adsorção do antígeno, as placas foram lavadas duas vezes solução de lavagem (PBST - 0,05% Tween), e bloqueadas com 200 µL de PBS acrescido de 3% de soro albumina bovina (BSA) durante 1 hora a 37°C. Após bloqueio, toda a solução dos poços foi removida, e as placas lavadas duas vezes com PBST 0,05%. Posteriormente, as amostras de soros nas diluições 1:100 e 1:1000 (soro diluído em PBS com 3% de BSA), foram adicionadas aos poços e incubadas por 1 hora a 37°C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBST 0,05%, e 100 µL do anticorpo secundário (IgG) conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) diluído 1:2000 em PBS-BSA 3% foram adicionados aos poços. Procedeu a incubação a 37°C por 1 hora, e as placas novamente lavadas por três vezes com solução de lavagem, e então adicionadas 100 µL/poço do substrato (0,1 M ácido cítrico anidro, 0,2 M fosfato de sódio, 0,05% OPD e 0,1% H₂O₂). Protegido contra a luminosidade a 37°C durante 20 minutos, cada poço recebeu solução reveladora, que foi interrompida usando a adição de 50 µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi medida comprimento de onda 492 nm em leitor de ELISA (MR-96^a Microplate reader). Os ensaios foram realizados em duplicatas, utilizando soro pré-imunizados e coletados no dia da eutanásia em estado bruto.

4.6. Amostras de tecidos parafinizados

As amostras utilizadas no trabalho foram recuperadas do arquivo de experimentos anteriormente ou diagnóstico de infecção natural realizado por nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Patologia Molecular, localizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

As amostras de infecção experimental avaliadas foram tecidas de fígado de camundongos infectados com *B. abortus*, *B. ovis* e *B. canis*, pulmão e placenta de bovinos infectados com *B. abortus*, testículos, glândula vesícula-seminal e epidídimo de carneiros infectados com *B. ovis*. Placenta de cadela sabidamente infectada (sorologia e PCR positivo para *Brucella* spp.) foi utilizada (gentilmente cedida por Prof^a. Dr^a. Tayse Domingues-UVV). Para determinar se há reação inespecífica da reação com outros agentes bacterianos, fígado de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*, fígado e baço de camundongos e intestino de bovinos infectados com *Samonella enterica* sorovar *Typhimurium*, e testículo e epidídimo de carneiro infectado com *Actinobacillus seminis*, músculo esquelético e nervo óptico de cervídeo infectado naturalmente com *Trueperella pyogenes* e placenta bovina infectada naturalmente com *Bacillus cereus* foram utilizados.

4.7. Imunoistoquímica

Para detecção de *Brucella* spp. secções com 4 µm de espessura das amostras de tecidos selecionados, foram submetidos a reação imunoistoquímica.

Na reação imunoistoquímica, foram utilizados quatro anticorpos primários policlonais, três anti-*Brucella* spp. e um anti-BP26 recombinante (proteína de membrana externa) produzidos em coelho. Os anticorpos foram testados nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000. A reação de imunoistoquímica foi realizada como descrito por Xavier et al. (2009b), com modificações. Para controle da reação, foi usado anticorpo policlonal anti-*B. abortus*, produzido a partir da imunização de coelho com vacina comercial B19. Os cortes de tecido foram desparafinizados, hidratados em concentrações decrescentes de álcool, e incubados em banho de peróxido de hidrogênio 10%, por uma hora, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, a etapa da reação, os cortes de tecidos foram lavados três vezes seguidas em PBS por 5 minutos. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com a incubação dos cortes em leite desnatado (Molico®) na concentração de 3%, por uma hora. Então, os tecidos foram

incubados com o anticorpo primário, em câmara úmida a 37°C, por uma hora. O anticorpo secundário usado foi um anticorpo universal (anti-coelho/anti-camundongo) biotilado e o complexo estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX, K800021-2), os quais foram incubados, respectivamente, por 30 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por 30 segundos (DAKO-EnVision FLEX, K800021-2). Em seguida, foi realizada a contra coloração com Hematoxilina de Mayer. Os tecidos foram avaliados em microscopia óptica de luz, e a observação quanto à marcação positiva e negativa nas amostras e a presença de fundo.

4.8. Análise Estatística

Os dados foram avaliados de forma descritiva quanto à reação específica dos soros hiperimunes (positividade) e reação inespecífica (reação de fundo) em tecidos parafinizados.

5. RESULTADOS

O ELISAI foi utilizado para determinar a soro conversão aos antígenos utilizados para a imunização dos coelhos (Anexo 1), e de determinar reação cruzada dos soros hiperimunes aos diferentes antígenos (Figura 1).

Todos os soros hiperimunes reagiram ao seu extrato bruto na diluição (1/100) e na menor concentração avaliada (0,25 ng) do extrato. Todos os soros hiperimunes se tornaram reagentes ao seu extrato bruto, a partir da segunda dose imunizante. Embora reagente, o valor da densidade óptica (OD) do soro hiperimune de *B. canis* foi muito baixo em todas as concentrações de extrato bruto testadas, 5 a 10 vezes menor que os demais soros hiperimunes. Por esta razão, optou-se por imunizar a coelha com mais duas doses de *B. canis* gama irradiada associada ao hidróxido de alumínio (Anexo 1).

A reação cruzada dos quatro soros hiperimunes produzidos foi avaliada quando expostos aos mesmos quatro extratos brutos. Os soros quando expostos ao extrato bruto de *B. canis*, apenas o soro hiperimune anti-*B. abortus* não reagiu na diluição de 1/100. Todos os quatro soros reagiram com extrato bruto de *B. canis* na diluição 1/1000. Quando os soros hiperimunes foram colocados sobre o extrato bruto de *B. abortus*, foi observado que os soros anti-*B. abortus* e anti-*B. ovis* reagiram na diluição 1/100 e os dois soros e o soro anti-BP26 reagiram na diluição 1/1000. O soro anti-*B. canis* não reagiu com extrato de *B. abortus*.

Todos os soros hiperimunes expostos ao extrato bruto de *B. ovis* tiveram reação cruzada nas duas diluições testadas, 1/100 e 1/1000. Não foi observada reação cruzada nos soros hiperimunes anti-*B. abortus*, anti-*B. canis* e anti-*B. ovis* quando expostos a proteína recombinante BP26, reagindo somente o soro anti-BP26 nas duas diluições testadas. A Figura 1 mostra o gráfico dos diferentes soros policlonais expostos aos diferentes extratos brutos nas diluições 1/100 e 1/1000.

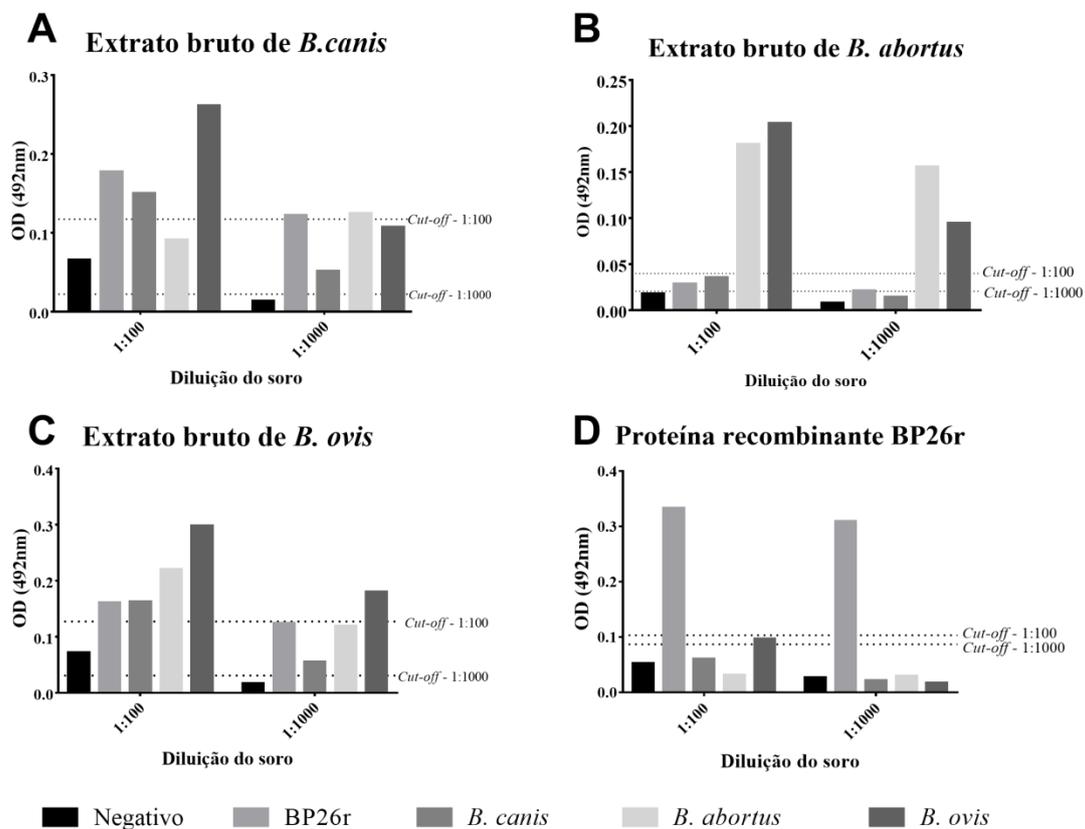


Figura 1: Soros hiperimunes anti-*Brucella* expostos aos diferentes extratos brutos nas diluições de 1/100 e 1/1000. As linhas pontilhadas determinam o limite de reatividade de cada diluição.

A reação imunoistoquímica foi utilizada avaliar a eficácia dos soros hiperimunes em detectar a *Brucella* spp. nas lesões características da brucelose, tanto em modelo murino quanto nas diferentes espécies de mamíferos domésticos.

Em camundongo infectado experimentalmente com *B. canis* não foi observada marcação positiva na imunoistoquímica para o anticorpo primário anti-*B. abortus* B19 1/1000

considerado o controle positivo da reação ou em qualquer reação com os quatro soros hiperimunes. Em camundongo infectado com *B. ovis*, entre os quatro soros hiperimunes apenas o anticorpo policlonal primário anti-*B. ovis* apresentou marcação positiva na imunoistoquímica como mostrado na Figura 2. Em camundongo infectado com *B. abortus*, observamos marcação positiva com soro hiperimune anti-*B. abortus* e anti-*B. ovis* como demonstrado na Figura 3.

Na placenta de vaca ou pulmão de feto deste mesmo animal experimentalmente infectado com *B. abortus* observamos marcação positiva apenas para os anticorpos primários anti-*B. abortus* e anti-*B. ovis* na diluição 1/1000 e ausência de marcação aos anticorpos anti-*B. canis* e anti-BP26 como demonstrado nas Figuras 4 e 5. Ao avaliar a marcação na placenta canina de uma cadela naturalmente infectada observamos marcação positiva para anticorpos primários anti-*B. abortus* e anti-*B. ovis*, mas também no anticorpo anti-*B. canis* sendo a diluição 1/500 a diluição ideal neste soro. Imunoistoquímica foi realizada em testículo, epidídimo e glândula vesicular de dois carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis*, e apesar de apresentar lesão característica decorrente do quadro clínico da doença, não foi detectada qualquer marcação positiva dos anticorpos aplicados na reação, inclusive com anticorpo anti-*B. abortus* B19. Esses mesmos animais já haviam sido testados para o anticorpo anti-*B. abortus* B19 com marcação positiva, como demonstrado por Silva et al. (2015).

A Tabela 4 demonstra as diferentes diluições testadas e resultados de fundo ou de positividade dos diferentes tecidos infectados por *Brucella* spp. aos soros hiperimunes. A positividade tecidual foi observada a partir da menor diluição testada (1/100), mais associada a um intenso fundo na maioria dos tecidos, o que dificultou a interpretação. Quando se realizava aumento na diluição do anticorpo, o fundo da reação diminuía ou desaparecia permitindo a identificação clara das marcações positivas.

A especificidade dos anticorpos anti-*Brucella* foi determinado em tecido de diferentes animais infectados: fígado de camundongo com *Listeria monocytogenes*, intestino e ceco de camundongo com *Salmonella Typhimurium*, epidídimo de ovino com *Actinobacillus seminis*, placenta de vaca com *Bacillus cereus*, abscesso de cervo com *Trueperella pyogenes*, fígado e baço de bovino com *Samonella Typhimurium*, e em todos os casos não foram notados marcação imunoistoquímica, sendo considerados negativos.

Tabela 4: Reatividade na imunistoquímica dos diferentes tecidos parafinizados testados sabidamente infectados por *Brucella* spp. para os quatro anticorpos policlonais anti-*Brucella*.

Espécie	Tecido	Infecção	Anticorpos policlonais													
			B19	<i>B. abortus</i>			<i>B. ovis</i>			<i>B. canis</i>			Bp26			
			1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	
Camundongo	Fígado	<i>B. abortus</i>	Pos	FD	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Camundongo	Fígado	<i>B. ovis</i>	Pos	FD	FD	Neg	FD	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	FD	Neg	Neg	Neg
Camundongo	Fígado	<i>B. canis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Bovino	Placenta	<i>B. abortus</i>	Pos	FD	Pos	Pos	FD	Pos	Pos	FD	FD	Neg	FD	Neg	Neg	Neg
Bovino (feto)	Pulmão	<i>B. abortus</i>	Pos	FD	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Ovino	Epidídimo	<i>B. ovis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Canino	Placenta	<i>Brucella</i> spp.	Pos	FD	NR	Pos	FD	NR	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	NR	Neg	Neg

pos=positivo, neg=negativo, FD=Fundo, NR=não realizado, cor verde= resultado na diluição ideal para reação

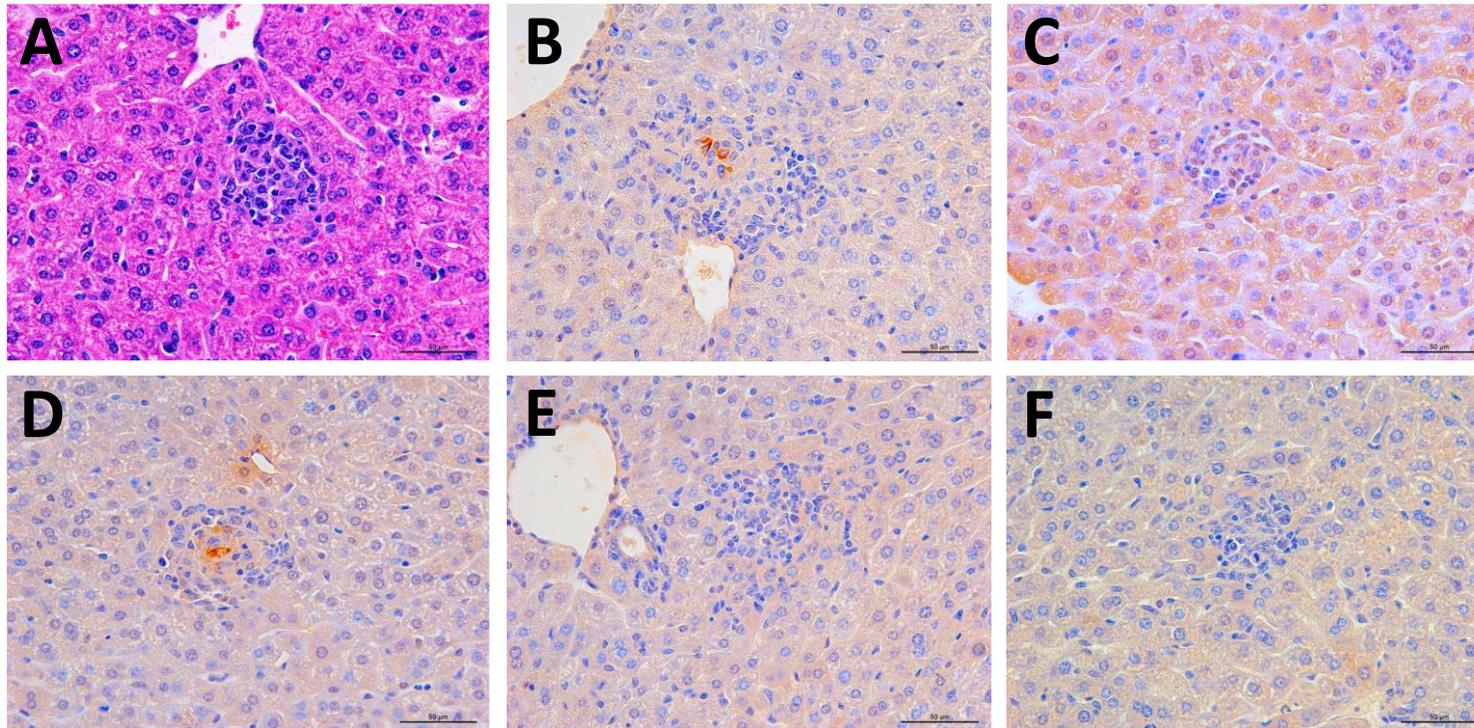


Figura 2: Camundongo experimentalmente infectado com *Brucella ovis*. **A)** Fígado, microgranuloma contendo neutrófilos, macrófagos epitelióides e linfócitos, HE, 40x; **B e D)** Reatividade dos anticorpos por imunoistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticas e extracelulares, pelo sistema estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 40x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/500), fundo intenso, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/500), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/500), marcação negativa, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/500), marcação negativa.

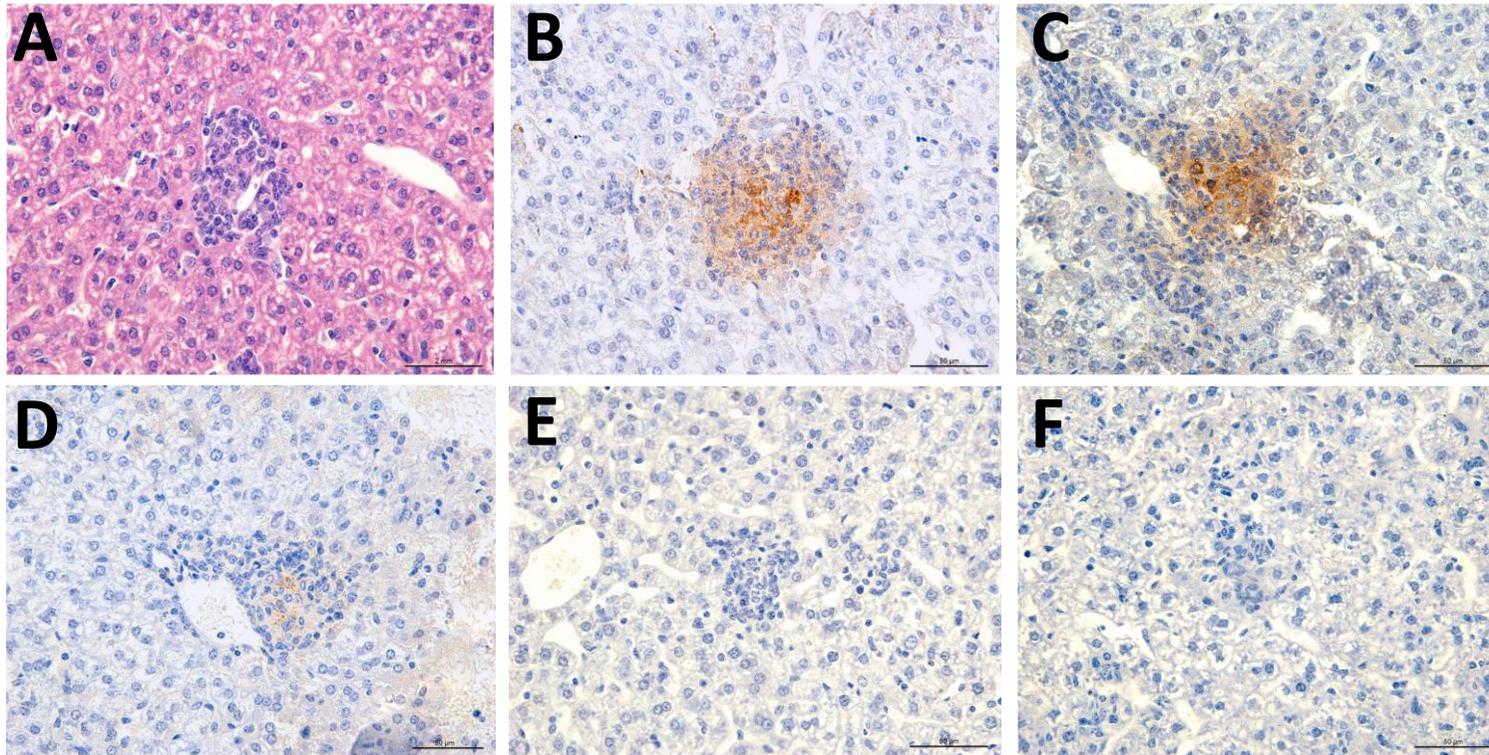


Figura 3: Camundongo infectado experimentalmente com *B. abortus*. **A)** Fígado, microgranuloma, contendo neutrófilos, macrófagos epitelióides e linfócitos, HE, 40x; **B, C e D)** Reatividade dos anticorpos por imunistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticas e extracelulares, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 40x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/1000), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/500), marcação negativa, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/500), marcação negativa. 40x.

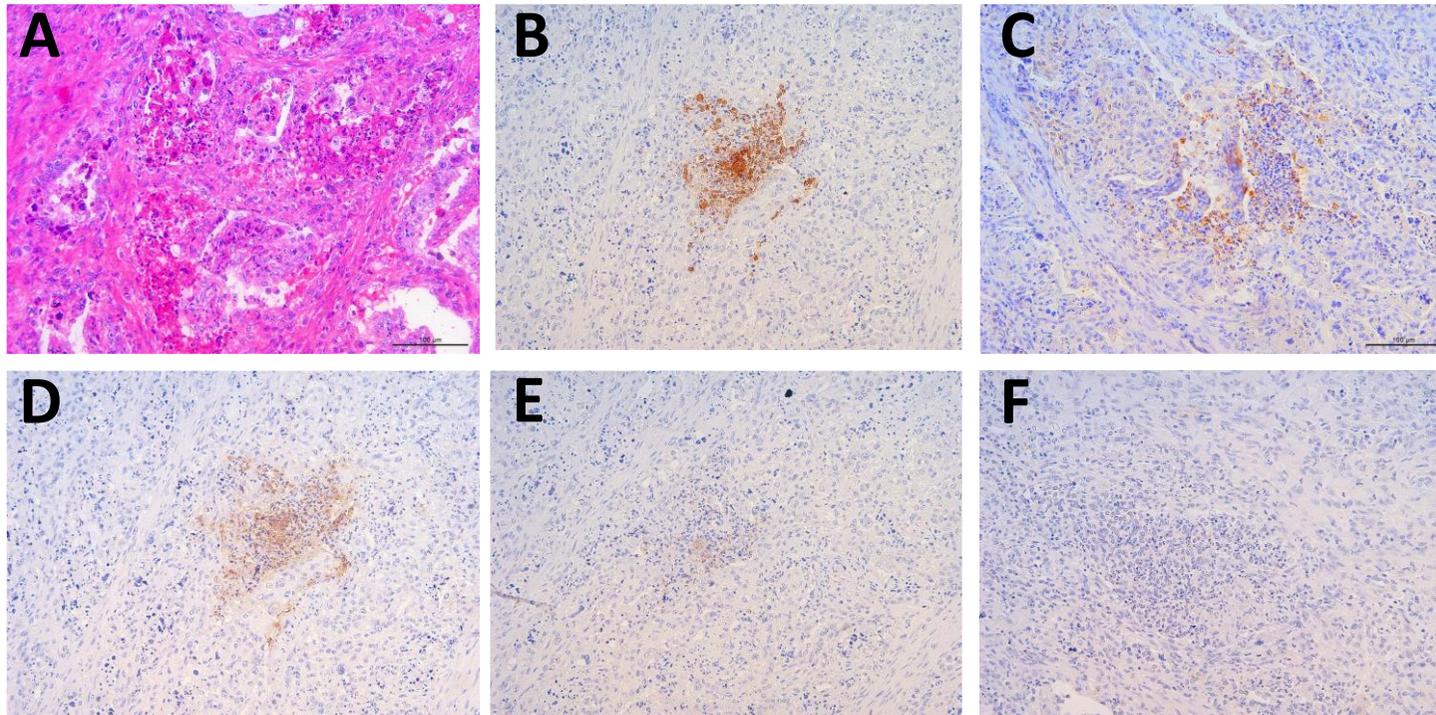


Figura 4: Bovino infectado experimentalmente com *Brucella abortus*. **A)** Placenta bovina, padrão inflamatório formado por macrófagos epitelióides, neutrófilos, com áreas de hemorragia e necrose, HE, 20x; **B, C e D)** Reatividade dos anticorpos por imunohistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticos e extracelulares, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX). 20x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/1000), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal-*B. canis* (1/1000), marcação negativa, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/1000), marcação negativa.

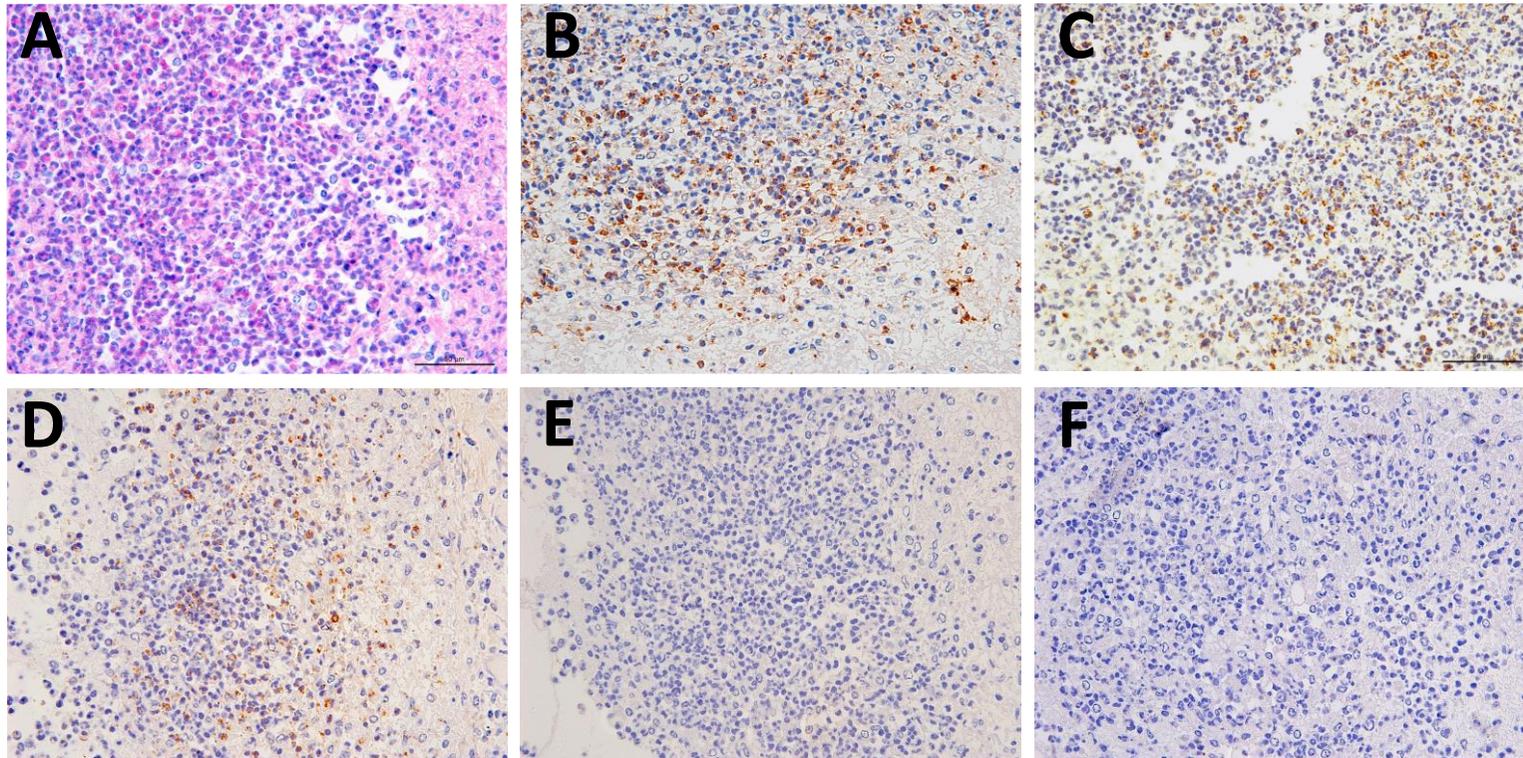


Figura 5: Bovino infectado experimentalmente com *Brucella abortus*. **A)** Pulmão de feto bovino, infiltrado inflamatório constituído de neutrófilos, HE, 40x; **B, C e D)** Reatividade dos anticorpos por imunoistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticas e extracelulares, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 40x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/1000), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/1000), marcação negativa, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/1000), marcação negativa.

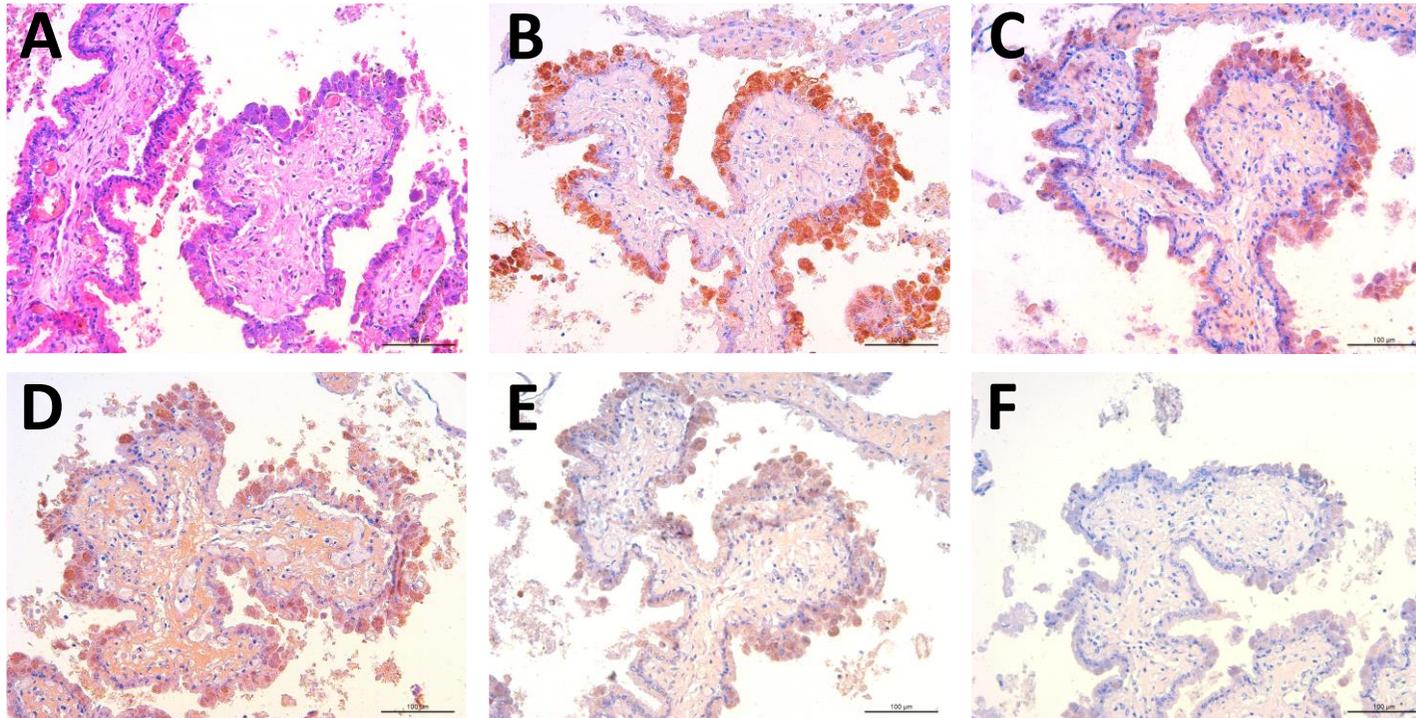


Figura 6: Canino infectado naturalmente por *Brucella* spp. **A)** Placenta canina, vilosidade placentária com predomínio de monocamada de trofoblastos canino, discreta congestão, e raros histiócitos aleatórios no interstício, HE, 20x; **B, C, D e E)** Reatividade dos anticorpos por imunohistoquímica visualizada com marcações marrons intracitoplasmáticos, pelo sistema de detecção estreptoavidina-peroxidase (DAKO-EnVision FLEX), 20x; **B)** anticorpo policlonal anti-B19 (1/1000), marcação positiva, **C)** anticorpo policlonal anti-*B. abortus* (1/1000), marcação positiva, **D)** anticorpo policlonal anti-*B. ovis* (1/1000), marcação positiva, **E)** anticorpo policlonal anti-*B. canis* (1/100), marcação positiva, **F)** anticorpo policlonal anti-BP26 (1/1000), marcação negativa.

6. DISCUSSÃO

Por se tratar de uma doença com ampla distribuição mundial, gerar grandes perdas econômicas principalmente na saúde animal, e ter agentes etiológicos com potencial zoonótico, é de suma importância reconhecer a manifestação clínica de brucelose e realizar o diagnóstico correto da doença em animais suspeitos (Xavier et al., 2009b; Gyles et al., 2011). O emprego de técnicas de diagnóstico direto e indireto é preconizado, porém há o afunilamento quanto ao uso de algumas destas técnicas, como o isolamento bacteriano, tido como teste padrão ouro, que requer condições laboratoriais especializadas para isolar algumas espécies de *Brucella* (Paixão et al., 2009; Stranahan et al., 2019; Eckstein et al., 2020). Assim técnicas diretas de realização mais simples e segura, como no caso da imunistoquímica são usadas para determinar casos suspeitos para a doença em tecido parafinado (Hofer et al., 2012; Mol et al., 2012; Mol et al., 2020).

Apesar das diferentes espécies de *Brucella* compartilharem grande similaridade genômica, cada uma delas podem apresentar um perfil único e individual na expressão de proteínas antigênicas quando presentes no organismo do hospedeiro (Perkins et al., 2010). Além disso, as espécies de *Brucella* podem ser classificadas morfológicamente como lisas ou rugosas de acordo a presença ou ausência da cadeia O do LPS (Moreno, 2021). Estas características fazem com que testes de diagnósticos baseados no reconhecimento de antígeno por anticorpos (sorologia ou imunistoquímica) possam detectar diferentes espécies, mas não todo o gênero (Mol et al., 2012).

Já foi demonstrado que a inativação bacteriana por radiação gama, e subsequente uso dessas para fins de imunização, o organismo do hospedeiro reage contra o antígeno, e produz anticorpos específicos e confere proteção (Moustafa et al., 2011; Rocha et al., 2020). Alguns trabalhos utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais produzido a partir de extrato bruto, cepa vacinal viva atenuada, ou algum constituinte específico de *Brucella* como o LPS (Paixão et al., 2009; González-Barrientos et al., 2010; Antoniassi et al., 2016), mas este é o primeiro estudo que utilizada a bactéria inativada por radiação.

Em nosso estudo, observamos que o anticorpo anti-*B. abortus* B19 tem elevada afinidade aos tecidos infectados por *Brucella*, mas vale ressaltar que este tipo de anticorpo foi produzido a partir da imunização de coelhos com cepa vacinal B19 (Xavier et al., 2009b), que leva consigo resquícios de patogenicidade (Osman et al., 2015; Pereira et al., 2021). Isso gera risco de infecção acidental ao homem durante a manipulação (Pereira et al., 2021). O uso da

Brucella spp. inativada por radiação gama como imunógeno elimina este risco de infecção acidental.

Quando avaliamos a reação cruzada dos diferentes soros hiperimunes anti-*Brucella*, no teste de ELISAI observamos que não ocorre reação cruzada dos soros hiperimunes anti-*B. abortus*, anti-*B. canis* e anti-*B. ovis* ao antígeno da proteína recombinante. Já se sabe que a BP26 é uma proteína periplasmática encontrada nas espécies clássicas de *Brucella*, e que apresenta potencial antigênico (Cloekart et al., 2001; Qiu et al., 2012), e apresenta resultado satisfatório para detecção de anticorpos específicos de ovinos infectados por *B. melitensis* e *B. ovis* (Cloekaert et al., 2001 e França et al., 2014). O anticorpo policlonal anti-BP26 produzido em coelhos não marcou em qualquer tecido de animal infectado naturalmente ou experimentalmente por *Brucella*, apesar de trabalhos demonstrarem em prova sorológica que há produção de anticorpos anti-BP26 em hospedeiros naturais com brucelose (Cloekaert et al., 2001; França et al., 2014). Vale mencionar que o anticorpo reconhece a porção do antígeno expresso pelas bactérias, e a não reatividade deste soro pode ser justificado pela proteína BP26 não ser abundante ou disponível para reconhecimento por anticorpo nos tecidos, diferente do LPS, presente na membrana externa da bactéria e facilmente reconhecido por anticorpo. Além disso, a bactéria presente no organismo vivo pode induzir a produção de anticorpos específicos a determinados antígenos de forma distinta em diferentes hospedeiros (Zhao et al., 2018; Dabral et al., 2019).

O soro hiperimune anti-*B. ovis* apresentou reação cruzada no ELISAI aos extratos bruto de *B. ovis*, *B. abortus* e *B. canis*, e quando foi avaliado por imunistoquímica foi único anticorpo que reagiu em todos os diferentes tecidos testados infectados por *Brucella* spp. Isto indica que este anticorpo policlonal de anti-*B. ovis* pode ser usado como anticorpo para detecção do gênero *Brucella*. De forma semelhante, o soro anti-*B. abortus* apresentou reação cruzada no ELISAI aos extratos brutos de *Brucella* spp. Entre todos os anticorpos policlonais desenvolvidos para nosso estudo, o anticorpo anti-*B. abortus* aparentemente foi o que marcou com maior intensidade por imunistoquímica, embora de forma inferior ao anticorpo controle (anti-*B. abortus* B19). Contudo, este anticorpo detectou *Brucella* spp. na placenta canina, mas não foi capaz de detectar *B. ovis* em camundongo.

O diagnóstico da brucelose canina ainda é um desafio (Santos et al., 2021). Geralmente os animais são assintomáticos, e quando apresenta quadro da doença, os sinais observados estão associados às alterações reprodutivas, e que em determinados momentos são

sutis (Meló et al., 2013; Rodrigues et al., 2017). Este estudo conseguiu demonstrar que os diferentes soros hiperimunes produzidos a partir da *Brucella* spp. gama irradiada são capazes de detectar *Brucella* na placenta canina com brucelose. Essa positividade para *Brucella* em tecido parafinado de cães, apenas foi obtida até o presente momento a partir de soros policlonais anti-*B. abortus* (Hofer et al., 2012; Souza et al., 2018; Camargo-Castañeda et al., 2021). Soro hiperimune anti-*B. canis* apenas apresentou reação com o seu próprio antígeno e o antígeno de *B. ovis* no teste de ELISAI. Essa reação pode ser justificada pelo fato das duas compartilharem parede celular semelhante, ou seja, tem parede celular rugosa devido a ausência da cadeia O no LPS (Moreno, 2021). Apesar das duas espécies serem rugosas, o anticorpo policlonal anti-*B. canis* foi capaz de detectar antígeno de *Brucella* spp. apenas em tecido placentário de cão, ainda sim em uma diluição mais baixa que os demais soros hiperimunes reagentes. Estudos demonstram que *B. canis* não induz resposta imune satisfatória quando comparado a *B. abortus* e *B. ovis* que pode justificar menor reatividade deste anticorpo (Chacón-Díaz et al., 2015; Dorneles et al., 2015a; Dorneles et al., 2015b; Eckstein et al., 2020).

A ausência de reação dos diferentes anticorpos policlonais incluindo, anticorpo anti-*B. abortus* B19 em tecido de camundongo experimentalmente infectado com *B. canis* pode ser justificada pela necessidade de uma dose infectante elevada, capaz de induzir a doença com lesões consistentes e a detecção da bactéria por imunoistoquímica (Stranhan et al., 2019; Stranhan et al., 2020). A ausência de reação dos diferentes anticorpos policlonais incluindo, anticorpo anti-*B. abortus* B19 em tecido de ovino experimentalmente infectado com *B. ovis*, previamente positivo por imunoistoquímica (Silva et al., 2015) pode ser justificada pelo desgaste do bloco com perda da região contendo a bactéria na lesão e também por preservação inadequada do bloco levando a perda de reatividade do tecido a imunoistoquímica (Sierra et al., 2019).

Tecido de animais infectados com outros agentes infecciosos intracelulares ou não capazes de causar problema reprodutivo não expressaram qualquer marcação positiva na reação imunoistoquímica aos diferentes anticorpos, indicando uma alta especificidade dos soros hiperimunes anti-*Brucella* produzidos em coelho neste estudo.

7. CONCLUSÕES

Os soros hiperimunes anti-*Brucella* demonstraram potencial específico para diagnosticar a brucelose em amostras de tecidos parafinizadas de animais naturalmente ou experimentalmente infectados. O soro hiperimune anti-*B. ovis* foi o anticorpo capaz de detectar o maior número de animais infectados. O soro hiperimune anti-*B. canis* somente marcou a placenta canina, e aparentemente apresenta afinidade em marcar apenas tecido de canídeos, mas serão necessários estudos futuros com este anticorpo para identificar outros tecidos de cães naturalmente ou experimentalmente infectados.

8. REFERÊNCIAS

- ADONE, R.; CIUCHINI, F.; OLSEN, S. Field validation of the use of RB51 as antigen in a complement fixation test to identify calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51, *Clin Diagn. Lab. Immunol.* v.8, p.385-387, 2001.
- ADONE, R.; PASQUALI, P. Epidemiological surveillance of brucellosis. *Rev. Sci. Tech.* v.32, p.199-205, 2013.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris, France: INRA; 1988.
- ALVES, C.J.; FIGUEREDO, S.M.; AZEVEDO, S.S.; CLEMENTINO, I.J.; KEID, L.B.; VASCONCELOS, S.A. BATISTA C.S.A., ROCHA, V.C., HIGINO, S.S. Detection of *Brucella ovis* in ovine from Paraíba State, in the Northeast region of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* v.41, p.365-367, 2010.
- ANTONIASSI, N.A.B.; JUFFO, G.D.; PESCADOR, L.G.; CORBELLINI, L.G.; SONNE, L.; GOMES, M.J.P.; NAKAZATO, L.; DRIEMEIER, D. Occurrence and characterization of bovine abortion caused by *Brucella abortus* infection in southern Brazil. *Arch. Med. Vet.*, v.48, p.43-49, 2016.
- BASTOS, C.R.; MATHIAS, L.A.; JUSI, M.; SANTOS, R.F.; SILVA, G.C.P.; AANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z.; BÜRGER, K.P. Evaluation of dot-blot test for serological diagnosis of bovine brucellosis. *Braz. J. Microbiol.*, v.49, n.3, p.564-568, 2018.
- BRASIL. Manual Técnico. MAPA / SDA / DAS, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), Brasília, p. 184, 2006.
- BUDDLE, M.B. Studies on *Brucella ovis* (n.spp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J. Hyg.*, v.54, n.3, p.351-364, 1956.

BUTLER, J.E.; SEAWRIGHT, G.L.; MCGIVERN, P.L.; GILSDORF, M. Preliminary evidence for a diagnostic immunoglobulin G1 antibody response among culture-positive cows vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenge exposed with strain 2308. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, n.6, p.1258-1264, 1986.

BYNDLOSS, M.X.; TSOLIS, R.M. *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v.4, n.1, p.111-127, 2016.

BYNDLOSS, M.X.; TSAI, A.Y.; WALKER, G.T.; MILLER, C.N.; YOUNG, B.M.; ENGLISH, B.C.; SEYFFERT, N.; KERRINNES, T.; JONG, M.F.; ATLURI, V.L.; WINTER, M.G.; CELLI, J.; TSOLIS, R.M. *Brucella abortus* infection of placental trophoblasts triggers endoplasmic reticulum stress-mediated cell death and fetal loss via type IV secretion system-dependent activation of CHOP. *mBio*, v.10, n.4, e01538-19, 2019.

CAMARGO-CASTAÑEDA, A.M.; STRANAHAN, L.W.; EDWARDS, J.F.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; ROA, L.; AVILA-GRANADOS, L.M.; HENSEL, M.E.; ARENAS-GAMBOA, A.M. Characterization of epididymal and testicular histologic lesions and use of immunohistochemistry and PCR on formalin-fixed tissues to detect *Brucella canis* in male dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.33, n.2, p.352-356, 2021.

CAMERON, H.S.; MEYER, M.E. Metabolic studies on *Brucella neotomae* (Stoenner and Lackman). *J. Bacteriol.*, v.76, n.5, p.546-548, 1958.

CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; COSTA, L.F.; SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, P.A.; BORGES, A.M.; GOUVEIA, A.M.G.; SANTOS, R.L. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin. Res.*, v.102, p.213-222, 2012.

COSTA, L.F.; PESSOA, M.S.; GUIMARÃES, L.B.; FARIA, A.K.S.; MORÃO, R.P.; MOL, J.P.S.; GARCIA, L.N.N.; ALMEIDA, A.C.; GOUVEIA, A.M.G.; SILVA, M.X.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. 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, 2016.
 CHACÓN-DIAZ, C.; ALTAMIRANO-SILVA, P.; GONZÁLEZ-ESPINOZA, G.; MEDINA, A.C.; ALFARO-ALARCÓN, A.; BOUZA-MORA, L.; JIMÉNEZ-ROJAS, C.; WONG, M.; BARQUERO-CALVO, E.; ROJAS, N.; GUZMÁN-VERRI, C.; MORENO, E.; CHAVES-OLARTE, E. *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts. *Infect. Immun.*, v.83, n.12, p.4861-4870, 2015.

CHAND, P.; KHANNA, R.N.; SADANA, J.R. Counter-immunoelectrophoresis for the detection of *Brucella* antigen and antibodies in the diagnosis of brucellosis in buffaloes. *J. Appl. Bacteriol.*, v.64, n.5, p.445-449, 1988.

CHIN, J.C.; PANG-TURNER, B. Profiles of serological reactivity against cytosoluble antigens of *Brucella ovis* in experimentally infected rams. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n.12, p.2647-2652, 1990.

ÇİFTÇİ, A.; İÇA, T.; SAVASAN, S.; SAREYYYÜPOĞLU, B.; AKAN, M.; DIKER, K.S. Evaluation of PCR methods for detection of *Brucella* strains from culture and tissues. *Trop. Anim. Health Pro.*, v.49, n.4, p.755-763, 2017.

CLOECKAERT, A.; BAUCHERON, S.; VIZCAINO, N.; ZYGMUNT, M.S. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.8, n.4, p.772-775; 2001.

CLOECKAERT, A.; BERNARDET, N.; KOYLASS, M.S.; WHATMORE, A.M.; ZYGMUNT, M.S. Novel IS711 chromosomal location useful for identification of marine mammal *Brucella* genotype ST27, which is associated with zoonotic infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.49, n.11, p.3954-3959, 2011.

DABRAL, N.; BURCHAM, G.N.; JAIN-GUPTA, N.; SRIRANGANATHAN, N.; VEMULAPALLI, R. Overexpression of *wbkF* gene in *Brucella abortus* RB51WboA leads to increased O-polysaccharide expression and enhanced vaccine efficacy against *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M, and *B. suis* 1330 in a murine brucellosis model. *PLoS One*, v.14, n.3, e0213587, 2019.

DAVIES, D.H.; LIANG, X.; HERNANDEZ, J.E.; RANDALL, A.; HIRST, S.; MU, Y.; ROMERO, K.M.; NGUYEN, T.T.; KALANTARI-DEHAGHI, M.; CROTTY, S.; BALDI, P.; VILLARREAL, L.P.; FELGNER, P.L. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: Highthroughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, n.3, p.547-552, 2005.

DEBBARH, H.S.; ZYGMUNT, M.S.; CLOECKAERT, A. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev.1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol.*, v.53, n.3-4, p.325-37, 1996.

DÍAZ, R.; CASANOVA, A.; ARIZA, J.; MORIYÓN, I. The Rose Bengal Test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS negl.trop. dis.*, v.5, n.4, p.e950, 2011.

DICKSON, E.C. Disease Prevention: Pathogenicity of *Brucella mellitensis*, Variety Abortus, for Human Beings. *Cal. West. Med.*, v.26, n.6, p. 810, 1927.

DOUGLAS, J.T.; PALMER, D.A. Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, n.7, p.1353–1356, 1988.

DORNELES, E.M.S.; LIMA, G.K.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ARAÚJO, M.S.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; SRIRANGANATHAN, N.; QUBLAN, H.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P. Immune Response of Calves Vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and Revaccinated with RB51. *PloS One*, v.10, n.9, p.e0136696, 2015a.

DOENELES, E.M.S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ARAÚJO, M.S.S.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A.P. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine*, v.33, n.31, p.3659-3666, 2015b.

ECKSTEIN, C.; MOL, J.P.S.; COSTA, F.B.; NUNES, P.P.; LIMA, P.A.; MELO, M.M.; CARVALHO, T.P.; SANTOS, D.O.; SILVA, M.F.; CARVALHO, T.F.; COSTA, L.F.; MELO JÚNIOR, O.A.; GIUNCHETTE, R.C.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.S. *Brucella*

ovis mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. *Plos One*, v.15, n.4, p.e0231893, 2020.

EISENBERG, T.; HAMANN, H.P.; KAIM, U.; SCHLEZ, K.; SEEGER, H.; SCHAUERTE, N.; MELZER, F.; TOMASO, H.; SCHOLZ, H.C.; KOYLASS, M.S.; WHATMORE, A.M.; ZSCHÖCK. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environment. Microbiol.*, v.78, n.10, p.3753–3755, 2012.

EISENBERG, T.; RIBE, K.; SCHAUERTE, N.; GEIGER, C.; BLOM, J.; SCHOLZ, H.C. Isolation of a novel 'atypical' *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.110, n.2, p.221–234, 2017.

EISENBERG, T.; SCHLEZ, K.; FAWZY, A.; VÖLKER, I.; HECHINGER, S.; CURIĆ, M.; SCHAUERTE, N.; GEIGER, C.; BLOM, J.; SCHOLZ, H.C. Expanding the host range: infection of a reptilian host (*Furcifer pardalis*) by an atypical *Brucella* strain. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.113, n.10, p.1531–1537, 2020.

FERREIRANETO, J.S.; SILVEIRA, G.B.; ROSA, B.M.; GONÇALVES, V.S.P.; GRISIFILHO, J.H.H.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, E.O.; LAGE, A.P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina Ci. Agr.*, v.37, n.5, p.3385-3402, 2016.

FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; HOFFMANN, D.; GLEESON, L.J. Identification of *Brucella ovis* in formalin-fixed paraffin-embedded genital tissues of naturally infected rams by the indirect peroxidase-antiperoxidase technique. *Aust. Vet. J.*, v.65, n.10, p.324-326, 1988.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* spp. nov. and *Brucella pinnipedialis* spp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Microbiol. Int. J. Syst. Evol.*, v.57, n.11, p.2688-2693, 2007.

GALL, D.; NIELSEN, K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and coast comparison. *Rev. Sci. Tech.* v. 23, n.3, p.989-1002, 2004.

GARDNER, A.D.; GIRDLESTONE, G.R.; GILLESPIE, N.A. Bone Abscesses due to *Brucella melitensis*. *Br. Med. J.*, v.2, n.3731, p.53-54, 1932.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of Brucellosis in livestock and wildlife. *Croat. Med. J.*, v.51, n.4, p.296-305, 2010.

GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; MORALES, J.A.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E. Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*. *J. Comp. Pathol.*, v.142, n.4, p.347-352, 2010.

GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.2, p.281-297, 2002.

- GRAHAM, E.M.; TAYLOR, D.J. Bacterial Reproductive Pathogens of Cats and Dogs. *Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract.*, v.42, n.3, p.561-582, 2012.
- GREENE, C.E.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, p.398-411, 2012.
- 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.
- HENSEL, M.E.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; CHAKI, S.P.; HARTWIG, A.; GORDY, P.W.; BOWEN, R.; FICHT, T.A.; ARENAS-GAMBOA, A.M. Vaccine candidate *Brucella melitensis* 16MΔvjbR is safe in a pregnant sheep model and confers protection. *mSphere*, v.5, n.3, p.e00120-20, 2020.
- HOFER, E.; BAG, Z.N.; NDEZ, S.R.F.; MELZER, F.; TOMASO, H.; LÓPEZGOÑI, I.; FASCHING, G.; SCHMOLL, F. First detection of *Brucella canis* infections in a breeding kennel in Austria. *New Microbiol.*, v.35, n.4, p.507-510, 2012.
- HOLMAN, P.J.; ADAMS, L.G.; HUNTER, D.M.; HECK, F.C.; NIELSEN, K.H.; WAGNER, G.G. Derivation of monoclonal antibodies against *Brucella abortus* antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.4, n.5-6, p.603-614, 1983.
- ILHAN, F.; YENER, Z. Immunohistochemical Detection of *Brucella melitensis* Antigens in Cases of Naturally Occurring Abortions in Sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.20, n.6, p.803-806, 2008.
- JOHNSON, B.; MOSIER, D.A.; MORTON, R.J.; CONFER, A.W. Experimental *Brucella abortus* Strain 19 Arthritis in Young Cattle. *J. Vet. Diagn. Inves.*, v.6, n.1, p. 56–61, 1994.
- JONES, L.M.; ZANARDI, M.; LEONG, D.; WILSON, J.B. Taxonomic position in the genus *Brucella* of the causative agent of canine abortion. *J. Bacteriol.*, v.95, n.2, p.625-630, 1968.
- KEID, L.B.; DINIZ., J.A.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; FERREIRA, H.L.; SOARES, R.M. Evaluation of an Immunochromatographic Test to the Diagnosis of Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. *Reprod. Domest. Anim.*, v.50, n.6, 939–944, 2015.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.256, n.5517, p.495–497, 1975.
- LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, n.1, p.60–66, 2005.
- LAWINSKY, M.L.J.; OHARA, P.M.; ELKHOURY, M.R.; FARIA, N.C.; CAVALCANTE, K.R.L.J. Estado da arte da brucelose em humanos. *Rev Pan-Amaz Saude*, v.1, n.4, p.75-84, 2010.
- LI, M.; ZHOU, X.; LI, J.; SUN, L.; CHEN, X.; WANG, P. Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Medicine*, v.97, n.9, p.e0062, 2018.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; MORIYÓN, 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.

- MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.16, n. 2-3, p. 75-79, 1996.
- MANAT, Y.; SHUSTOV, A.V.; EVTEHOVA, E.; ESKENDIROVA, S.Z. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species. *Open Vet. J.*, v.6, n.2, p.71–77, 2016.
- McCOLLUM, M.; RHYAN, J.; COBURN, S.; EWALT, D.; LAHR, C.; NOL, P.; KEEFE, T.; KIMBERLING, C.; SALMAN, M. Clinical, culture, serology, and histopathology outcomes of bighorn sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *J. Wildl Dis.*, v.49, n.4, p.900-910, 2013.
- MELÓ, S.K.M.; SILVA, E.R.R.; HUNK, M.M.; MANSO, H.E.C.C. Brucelose Canina: Revisão de Literatura. *Ciênc. Vet. Tróp.*, Recife-PE, v. 16, no 1/2/3, p. 7-17, 2013.
- MENSE, M.G.; BORSCHER, R.H.; WILHELMSSEN, C.L.; PITT, M.L.; HOOVER, D.L. Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am. J. Vet. Res.*, v.65, n.5, p.644–652, 2004.
- MOEINI-ZANJANI, A.; POURNAJAF, A.; FERDOSI-SHAHANDASHTI, E.; GHOLAMI, M.; MASJEDIAN, F.; KHAFRI, S.; RAJABNIA, R. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and conventional PCR tests for diagnosis of common *Brucella* species. *BMC Res. notes*, v.13, n.1, p.533-537, 2020.
- MOHAMMADI, E.; GOLCHIN, M. Detection of *Brucella abortus* by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v.27, n.5, p.643-648, 2018.
- MOL, J.P.S.; FRANÇA, S.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. *R. Bras. Ci. Vet.*, v.19, n.3, p.117-126, 2012.
- MOL, J.P.S.; GUEDES, A.C.B.; ECKSTEIN, C.; QUINTAL, A.P.N.; SOUZA, T.D.; MATHIAS, L.A.; HADDAD, J.P.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 32, n.1, p.77–86, 2020.
- MORENO, E. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiol. Rev.*, v.45, n.1, p.1-22, 2021.
- MOUSTACAS, V.S.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; COSTA, L.F.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Real-time PCR for detection of *Brucella ovis* and *Histophilus somni* in ovine urine and sêmen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.6, p.1751-1755, 2015.
- MOUSTAFA, D.; GARG, V.K.; JAIN, N.; SRIRANGANATHAN, N.; VEMULAPALLI, R. Immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* and its recombinant strains induces protection against virulent *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis* challenge. *Vaccine*, v.29, n.4, p.784–794, 2011.
- MUNÔZ, P.M.; MIGUEL, M.J.; GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; BLASCO, J.M. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, v.26, n.21, p.2562–2569, 2008.

- NARDI JÚNIOR, G.; MEGID, J.; MATHIAS, L.A.; PAULIN, L.; VICENTE, A.F.; CORTEZ, A.; LISTONI, F.J.P.; LARA, G.H.B.; MOTTA, R.G.; CHACUR, M.G.M.; MONTEIRO, F.M.; RIBEIRO, M.G. Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. *Biologicals*, v.48, p.6–9, 2017.
- NASRUDDIN, N.S.; MAZLAN, M.; SAAD, M.Z.; HAMZAH, H.; SABRI, J. Histopathology and Immunohistochemistry Assessments of Acute Experimental Infection by *Brucella melitensis* in Bucks. *Open J. Pathol.*, v.4, n.2, p.54-63, 2014.
- NETA, A.V.C. MOL, J.P.S.; Xavier, M.N.; PAIXÃO, T.A.; LAGE, A.P.; Santos, R.L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, v.184, n.2, p.146–155, 2010.
- NIELSEN, K.H.; EWALT, D.R. Bovine Brucellosis. Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, Paris, FR. p.328–345, 2004.
- NURUL-IZZATI, U.Z.; TANKO, P.N.; SABRI, M.Y.; ONILUDE, O.P. Immunohistochemical Detection of *Brucella melitensis* Antigens in Lungs tissues of Sheep and Goats Diagnosed with Different Diseases at Necropsy. *Nigerian Vet. J.*, v.39, n.4, p.346-357, 2018.
- OLIVEIRA, A.L.B.; MACEDO, G.C.; ROSINHA, G.M.S.; MELGAREJO, J.L.; ALVES, A.G.L.; BARRETO, W.T.G.; SANTOS, F.M.; CAMPOS, J.B.V.; HERRERA, H.M.; OLIVEIRA, C.E. Detection of *Brucella* spp. in dogs at Pantanal wetlands. *Braz. J. Microbial.*, v.50, n.1, p.307-312, 2019.
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis., Ginebra: OMS, 1986. 149p.
- ORLANDO, D.R.; COSTA, R.C.; ABREU, R.V.S.; NAKAGAKI, K.Y.R.; WOUTERS, A.T.B.; RAYMUNDO, D.L.; VARASCHIN, M.S. Caracterização morfológica e imunohistoquímica de lesões em casos de aborto bovino bacteriano e viral no sul de Minas Gerais. *Pesq. Vet. Brasil.*, v.34, n.10, p.974-980, 2014.
- OSMAN, A.E.F.; HASSAN, A.N.; ALI, A.E.; ABDOEL, T.H.; SMITS, H.L. *Brucella melitensis* Biovar 1 and *Brucella abortus* S19 Vaccine Strain Infections in Milkers Working at Cattle Farms in the Khartoum Area, Sudan. *PLoS One.*, v.10, n.5, p.e0123374, 2015.
- PAIXÃO, T.A.; ROUX, C.M.; HARTIGH, A.B.; SANKARAN-WALTERS, S.; DANDEKAR, S.; SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect. Immun.*, v.77, n.10, p.4197–4208, 2009.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E.V. The new global map of human brucellosis. *Lancet. Infect. Dis.*, v.6, n.2, p.91-99, 2006.
- PAPPAS, G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.36, n.1, p.S8-S11, 2010.
- PARK, S.E.; GRAHAM, R.; PRUCHA, M.J.; BRANNON, J.M. Pasteurization of Milk Artificially Infected with Two Strains of *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, v.24, n.6, p.461–471, 1932.

- PEREIRA, C.R.; ALMEIDA, J.V.F.C.; OLIVEIRA, I.R.C.; OLIVEIRA, L.F.; PEREIRA, L.J.; ZANGERÔNIMO, M.G.; LAGE, A.P.; DORNELES, E.M.S. Occupational exposure to *Brucella* spp.: A systematic review and meta-analysis. *PloS Negl. Trop. Dis.*, v.14, n.5, p.e0008164, 2020.
- PEREIRA, C.R.; OLIVEIRA, I.R.C.; OLIVEIRA, L.F.; OLIVEIRA, C.S.F.; LAGE, A.P.; DORNELES, E.M.S. Accidental exposure to *Brucella abortus* vaccines and occupational brucellosis among veterinarians in Minas Gerais state, Brazil. *Transbound Emerg. Dis.*, v.68, n.3, p.1363-1376, 2021.
- PÉREZ, J.; QUEZADA, M.; LÓPEZ, J.; CASQUET, O.; SIERRA, M.A.; MARTÍN de las MULAS, J. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.10, n.1, p.17-21. 1998.
- PERKINS, S.D.; SMITHER, S.J.; ATKINS, H.S. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.34, n.3, p.379-394, 2010.
- PETROVIĆ, M.; SPICIC, S.; POTKONJAK, A.; LAKO, B.; KOSTOV, M.; CVETNIC, Z.. First evidence of *Brucella ovis* infection in rams in the Pirot Municipality, Serbia. *Vet. Ital.*, v.50, n.4, p.259-268, 2014.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L.; OLSEN, S.; SCHURING, G.G.; LAGE, A.P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, n.25, p.5327-5334, 2006.
- QIU, J.; WANG, W.; WU, J.; ZHANG, H.; WANG, Y.; QIAO, J.; CHEN, C.; GAO, G.F.; ALLAIN, J.P.; LI, C. Characterization of Periplasmic Protein BP26 Epitopes of *Brucella melitensis* Reacting with Murine Monoclonal and Sheep Antibodies. *PLoS One*, v.7, n.3, p.e34246, 2012.
- ROCHA, C.E.V.; SILVA, M.F.; GUEDES, A.C.B.; CARVALHO, T.P.; ECKSTEIN, C.; RIBEIRO, N.Q.; SANTOS, D.A.; MELO, M.M.; ARAÚJO, M.S.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; SANTOS, R.L.; PAIXÃO, T.A. Alginate-chitosan microcapsules improve vaccine potential of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* against listeriosis in murine model. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.176, p.567-577, 2020.
- RODRIGUES, R.T.G.A.; BEZERRA, J.A.B.; MEDEIROS, V.B.; FILGUEIRA, K.D. Brucelose canina: uma revisão prática para o clínico veterinário de pequenos animais. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.11, n.2, p.216-232, 2017.
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M.M.; ZULUAGA, J.J.C.; GARCIA-MONTOYA, G.M.; DABRAL, N.; ALZATE, J.F.; VEMULAPALLI, R.; OLIVEIRA-ANGEL, M. Diagnosis of human and canine *Brucella canis* infection: development and evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *Brucella* proteins. *Heliyon.*, v.6, n.7, p.e04393, 2020.
- SALIH-ALJ DEBBARH, H.; CLOECKAERT, A.; BÉZARD, G.; DUBRAY, G.; ZYGMUNT, M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Partially Purified Cytosoluble 28-Kilodalton Protein for Serological Differentiation between *Brucella melitensis*-Infected and *B. melitensis* Rev.1-Vaccinated Sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.3, n.3, p.305-308, 1996.

SANTOS, R.L.; PEIXOTO, M.T.D.; SERAKIDES, R.; COSTA, G.M.; MARTINS, N.E. Detecção de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa en el testículo y em el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch. Reprod. Anim.*, v.6, p.34-41, 1998.

SANTOS, R.S.; SOUZA, T.D.; MOL, J.P.S.; EICKSTEIN, C.; PAIXÃO, T.A. Canine Brucellosis: An Update. *Front. Vet. Sci.*, v.8, p.594291, 2021.

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S.A.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* spp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.58, n.2, p.375-82, 2008.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S.A.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYFMUNT, M.P.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* spp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.60, n.4, p.801-808, 2010.

SCHOLZ, H.C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; DAHOUK, S.A.; HAMMERL, J.A.; ZYGMUNT, M.S.; CLOECKAERT, A.; KOYLASS, M.; WHATMORE, A.M.; BLOM, J.; VERGNAUD, G.; WITTE, A.; AISTLEITNER, K.; HOFER, E. *Brucella vulpis* spp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.66, n.5, p.2090-2098, 2016.

SIERRA, E.; FERNÁNDEZ, A.; FELIPE-JIMÉNEZ, I.; FRANCESCO, G.D.; DÍAZ-DELGADO, J.; SACCHINI, S.; RIVERO, M.A.; ARBELO, M. Neurobrucellosis in a common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Canary Islands. *BMC Vet. Res.*, v.15, n.1, p.353, 2019.

SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; TSOLIS, R.M.; SANTOS, R.L. Laboratory animal models for brucellosis research. *J. Biomed. Biotechnol.*, v.2011, p.1-9, 2011.

SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A.; XAVIER, M.N.; SÁ, J.C.; MOUSTACAS, V.S.; HARTIGH, B.D.; CARVALHO NETA, A.; OLIVEIRA, S.C.; TSOLIS, R.; SANTOS, R.L. Putative ATP-Binding Cassette Transporter Is Essential for *Brucella ovis* Pathogenesis in Mice. *Infect. Immunit.*, v.79, n.4, p.1706-1717, 2011.

SILVA, R.M.; MANHOSO, F.F.R. Ocorrência de Brucelose Canina no Brasil: Revisão de Literatura. *Unimar Ciências*, v.22, p.1-2, 2013.

SILVA, T.M.A.; MOL, J.P.S.; WINTER, M.G.; ATLURI, V.; XAVIER, M.N.; PIRES, S.F.; PAIXAO, T.A.; ANDRADE, H.; SANTOS, R. L.; TSOLIS, R.M. The Predicted ABC Transporter AbcEDCBA Is Required for Type IV Secretion System Expression and Lysosomal Evasion by *Brucella ovis*. *PLoS One*, v.9, n.12, p.e114532, 2014.

SILVA, A.P.C.; MACEDO, A.A.; COSTA, L.F.; ROCHA, C.E.; GARCIA, L.N.N; FARIAS, J.R.D.; GOMES, P.P.R.; TEIXEIRA, G.C.; FONSECA, K.W.J.; MAIA, A.R.F.; NEVES, G.G.; ROMÃO, E.L.; MOL, J.P.S.; OLIVEIRA, R.M.; ARAÚJO, M.S.S.; NASCIMENTO,

- E.F.; MARTINS-FILHO, O.A.; BRANDÃO, H.M.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Encapsulated *Brucella ovis* Lacking a Putative ATP-Binding Cassette Transporter ($\Delta abcBA$) Protects against Wild Type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS ONE*, v.10, n.8, p.e0136865, 2015.
- SÖZMEN, M.; ERGINSOY, S.D.; GENÇ, O.; BEYTUT, E.; ÖZCAN, K. Immunohistochemical and Microbiological Detection of *Brucella abortus* in Aborted Bovine Fetuses. *Acta Vet. Brno*, v.73, n.4, p.465–472, 2004.
- SOLER-LLORENS, P.F.; QUANCE, C.R.; LAWHON, S.D.; STUBER, T.P.; EDWARDS, J.F.; FICHT, T.A.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; O'CALLAGHAN, D.; KERIEL, A. A *Brucella* spp. isolate from a Pac-man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical brucellae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v.6, p.116, 2016.
- SOUZA, T.D.; CARVALHO, T.F.; MOL, J.P.S.; MENEZES, J.V.L.; SILVA, M.F.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Tissue distribution and cell tropism of *Brucella canis* in naturally infected canine fetuses and neonates. *Sci. Rep.*, v.8, n.1, p.7203, 2018.
- STEMSHORN, B.W.; FORBES, L.B.; EAGLESOME, M.D.; NIELSEN, K.H.; ROBERTSON, F.J.; SAMAGH, B.S. A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. *Can. J. Comp. Med.*, v.49, n.4, p.391-4, 1985.
- STOURNARA, A.; MINAS, A.; BOURTZI-CHATZOPOULOU, E.; STACK, J.; KOPTOPOULOS, G.; PETRIDOU, E.; SARRIS, K. Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*. *Vet. Microbiol.*, v.119, n.1, p.53–64, 2007.
- STRANAHAN, L.W.; KHALAF, O.H.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; ARENAS-GAMBOA, A.M. Characterization of *Brucella canis* infection in mice. *PLoS One*, v.14, n.6, p.e0218809, 2019.
- STRANAHAN, L.W.; CHAKI, S.P.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; KHALAF, O.H.; ARENAS-GAMBOA, A.M. Evaluation of the Efficacy of the *Brucella canis* RM6/66 $\Delta vjbR$ Vaccine Candidate for Protection against *B. canis* Infection in Mice. *mSphere*, v.5, n.3, p.e00172-20, 2020.
- TILLER, R.V.; GEE, J.E.; FRACE, M.A.; TAYLOR, T.K.; SETUBAL, J.C.; HOFFMASTER, A.R.; FR, B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.76, n.17, p.5837–5845, 2010.
- TOLAR, P.; SOHN, H.W.; PIERCE, S.K. Viewing the antigen-induced initiation of B-cell activation in living cells. *Immunol. Rev.*, v.221, p.64-76, 2008.
- VATANKHAH, M.; BEHESHTI, N.; MIRKALANTARI, S.; KHORAMABADI, N.; AGHABABA, H.; MAHDAVI, M. Recombinant Omp2b antigen-based ELISA is an efficient tool for specific serodiagnosis of animal brucellosis. *Braz. J. Microbiol.*, v.50, n.4, p.979-984, 2019.
- WANG, X.; WANG, L.; LU, T.; YANG, Y.; CHEN, S.; ZHANG, R.; LANG, X.; YAN, G.; QIAN, J.; WANG, X.; MENG, L.; WANG, X. Effects of partial deletion of the wzm and wzt genes on lipopolysaccharide synthesis and virulence of *Brucella abortus* S19. *Mol. Med. Rep.*, v.9, p.2521-2527, 2014.

- WANKE, M.M. Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.195–207, 2004.
- WARETH, G.; BÖTTCHER, D.; MELZER, F.; SHEHATA, A.A.; ROESLER, U.; NEUBAUER, H.; SCHOON, H.A. Experimental infection of chicken embryos with recently described *Brucella microti*: Pathogenicity and pathological findings. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.41, p.28-34, 2015.
- WATT, D.A. Testicular abnormalities and spermatogenesis of the ovine and other species. *Vet. Bull.*, v. 42, p. 181-190, 1972.
- WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, v.9, n.6, p.1168-1184, 2009.
- WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; DAHOUK, S.A.; ZYGMUNT, M.S.; BREW, S.D.; PERRETT, L.L.; KOYLASS, M.S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H.C.; DICK, E.J.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E. *Brucella papionis* spp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, v.64, n.12 p.4120-4128, 2014.
- XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Cienc. Rural*, v.39, n.7, p.2252-2260, 2009a.
- XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.*, v.140, n.2-3, p.149-157, 2009b.
- XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; MOUSTACAS, V.S.; GOUVEIA, A.M.G.; LAGE, A.P.; TSOLIS, R.M.; SANTOS, R.L. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.145, n.1-2, p.158-164, 2010.
- YANG, X.; HE, Z.; ZHANG, G.; LU, J.; ZHANG, H.; REN, H.; TIAN, Y.; YANG, H.; CHEN, C.; LI, L.; FU, Y.; ALLAIN, J.P.; LI, C.; WANG, W. Evaluation of Reactivity of Monoclonal Antibodies Against Omp25 of *Brucella* spp. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, v.10, p.145, 2020.
- ZHAO, Y.; HANNIFFY, S.; ARCE-GORVEL, V.; CONDE-ALVAREZ, R.; OH, S.; MORIYÓN, I.; MÉMET, S.; GORVEL, J.P. Immunomodulatory properties of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide determinants on mouse dendritic cells in vitro and in vivo. *Virulence*, v.9, n.1, p.465-479, 2018.

ANEXO 1:

Reatividade no Teste de ELISAI dos soros hiperimunes na diluição 1:100 expostos ao extrato bruto do antígeno específico em quatro concentrações diferentes.

Soro hiperimune	Antígeno	µg	Tempo de Imunização	Média OD	Resultado
BP26r	BP26r	2,00	T3	0,365950	Positivo
		1,00	T3	0,392150	Positivo
		0,50	T3	0,442500	Positivo
		0,25	T3	0,414300	Positivo
		2,00	T0	0,019550	Negativo
		1,00	T0	0,034150	Negativo
		0,50	T0	0,067500	Negativo
		0,25	T0	0,025500	Negativo
<i>B. canis</i>	<i>B. canis</i>	2,00	T3	0,042034	Positivo
		1,00	T3	0,048634	Positivo
		0,50	T3	0,082084	Positivo
		0,25	T3	0,091284	Positivo
		2,00	T0	0,018184	Negativo
		1,00	T0	0,012284	Negativo
		0,50	T0	0,025034	Negativo
		0,25	T0	0,025484	Negativo
<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>	2,00	T3	0,211634	Positivo
		1,00	T3	0,176434	Positivo
		0,50	T3	0,181284	Positivo
		0,25	T3	0,127934	Positivo
		2,00	T0	0,012084	Negativo
		1,00	T0	0,015684	Negativo
		0,50	T0	0,015884	Negativo
		0,25	T0	0,005034	Negativo
<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	2,00	T2	0,363434	Positivo
		1,00	T2	0,411684	Positivo
		0,50	T2	0,301084	Positivo
		0,25	T2	0,288484	Positivo
		2,00	T0	0,019034	Negativo
		1,00	T0	0,005384	Negativo
		0,50	T0	0,018684	Negativo
		0,25	T0	0,009934	Negativo