

TATIANE FURTADO DE CARVALHO

**Desenvolvimento vacinal para prevenção e controle da  
brucelose**

Belo Horizonte/ MG  
Escola de Veterinária – UFMG  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA

**Desenvolvimento vacinal para prevenção e controle da  
brucelose**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos  
Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniella  
Castanheira Bartholomeu  
e Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatiane Alves da Paixão  
Área de concentração: Patologia Animal

Belo Horizonte/ MG  
Escola de Veterinária – UFMG  
2018

C331d Carvalho, Tatiane Furtado de, 1986-  
Desenvolvimento vacinal para prevenção e controle da brucelose / Tatiane Furtado de Carvalho. – 2018.  
142 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos  
Co-orientadores: Daniella Castanheira Bartholomeu, Tatiane Alves da Paixão  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias  
Inclui bibliografia

I. Brucelose em animais – Prevenção – Teses. 2. Brucelose em animais – Controle – Teses. 3. Brucelose em animais – Vacina – Teses. 4. Brucella – Teses. 5. Vacina veterinária – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Bartholomeu, Daniella Castanheira. III. Paixão, Tatiane Alves da. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. V. Título.

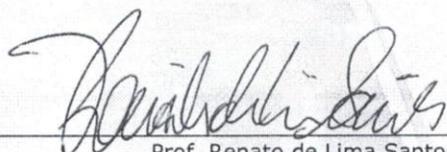
CDD – 636.089 695 7

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**TATIANE FURTADO DE CARVALHO**

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

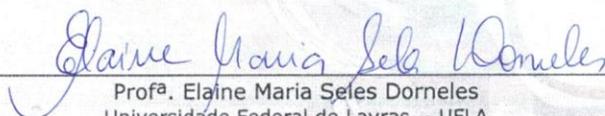
Aprovada em 25 de Maio de 2018, pela banca constituída pelos membros:



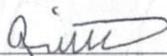
Prof. Renato de Lima Santos  
Presidente - Orientador



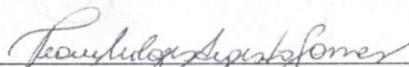
Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis  
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Elaine Maria Seles Dorneles  
Universidade Federal de Lavras - UFLA



Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG



Profª. Teane Milagres Augusto Gomes  
Instituto Federal Catarinense - IFC

## **Agradecimentos**

A Deus por me guiar, dar força e tranquilidade para seguir em frente com meu sonho e não desanimar com as dificuldades.

A minha mãe por todo amor, apoio e por sempre me mostrar o quanto era importante estudar. À senhora dedico este trabalho com muito amor.

A minha família, em especial a minha avó, meu irmão e sobrinha, por entenderem minha ausência por todos esses anos e por serem presentes de Deus.

Ao meu orientador prof<sup>o</sup> Renato, o qual aprendi a respeitar e admirar, pelo incentivo, confiança, por acreditar na minha capacidade e por tudo que me ensinou.

A minha co-orientadora prof<sup>a</sup> Tatiane Paixão, por ter me recebido com carinho, por ter me conduzido nos primeiros passos deste doutorado, sou grata a toda orientação e palavras que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

A minha co-orientadora prof<sup>a</sup> Daniella Bartholomeu, por ter sido luz e sabedoria nos momentos difíceis.

A meu amigo Diogo, que se tornou mais que amigo, um verdadeiro irmão, e por ter me acolhido com tanto amor na sua família. A meu amigo Sato, por ter sido minha família em vários momentos especiais. A meu amigo Vitor por todos os momentos divididos e por ser minha companhia mesmo a distância.

Aos velhos amigos que foram importantíssimos para eu chegar onde estou, Prof<sup>o</sup> Humberto, Sr Hélio, Cláudio, Thays, Karen, Rodrigo, Joyce, Geane, Merúli, Giovanna e Juliano.

Aos amigos que fiz e que guardarei com carinho no coração, em especial a Katy, Tayse, Ayisa, Thaynara, Guilherme, Alexandre, Diego Felipe, Amanda Quintal, Amanda Gabrielle, Larissa, Cláudia, Noelly, Monique, Valéria, Gabriela, Nayara Belo, Nayara, Amanda Maria, Matheus, Carlos e Frank.

Aos amigos e colegas de laboratório, que contribuíram e compartilharam conhecimentos, Juliana, Camila, Luciana, Andressa, Marianna, Daniella, Daniel, Fabíola, Pamela e Bia.

Agradeço a todos os colegas da Patologia, que dividimos momentos de estudo, de tensão e alegria. Meu reconhecimento aos professores e funcionários do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, em especial a Leimar, Natália, Valéria, Dona Beth, Vitálima e Luiz, obrigada pela ajuda, paciência e momentos compartilhados.

À todos do laboratório Genômica de Parasitos - ICB, em especial a Mariana e João, por todos ensinamentos e imensa ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

## SUMARIO

Agradecimentos .....	2
SUMARIO.....	5
Lista de tabelas .....	8
Lista de figuras .....	9
Abreviaturas .....	9
Resumo .....	16
Abstract.....	17
CAPÍTULO I .....	18
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1 INTRODUÇÃO GERAL .....	18
1.2 O GÊNERO <i>BRUCELLA</i> .....	18
1.3 BRUCELOSE .....	19
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA CONTRA <i>BRUCELLA</i> spp. E FATORES DE VIRULÊNCIA .....	21
1.5 RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA <i>BRUCELLA</i> SSP.....	23
1.6 VACINA CONTRA BRUCELOSE .....	25
1.7 MODELO MURINO PARA AVALIAÇÃO DE VACINAS EXPERIMENTAIS .....	26
1.8 <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ COMO VETOR .....	27
CAPÍTULO II - Meta-análise e o avanço no desenvolvimento vacinal contra a brucelose.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.1 FONTE DE DADOS .....	30
2.2 OBTENÇÃO DE DADOS.....	30
2.3 TRANSFORMAÇÃO DE DADOS E ANÁLISE DE META-REGRESSÃO .....	31
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
3. RESULTADOS .....	31
3.1 PESQUISA DE LITERATURA E CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO .....	31
3.2 PROTEÇÃO CONTRA <i>BRUCELLA</i> spp. INDUZIDA POR DIFERENTES CATEGORIAS DE VACINAS EM CAMUNDONGOS - ESTATÍSTICA DESCRITIVA .....	32
3.3 PROTEÇÃO OBTIDA POR VACINAS EXPERIMENTAIS DE BRUCELOSE AO LONGO DOS ÚLTIMOS 30 ANOS .....	34
3.4 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PROTEÇÃO NO MODELO DE CAMUNDONGO – ESTATÍSTICA DESCRITIVA .....	35
3.5 META-ANÁLISES.....	42
3.6 ANÁLISES BIVARIADAS .....	43
3.7 META-REGRESSÃO MULTIVARIADA .....	44
3.8 FONTES DE PUBLICAÇÕES EM VACINOLOGIA DE BRUCELOSE .....	45
4. DISCUSSÃO.....	49
CAPÍTULO III - Meta-análise em vacinologia de brucelose em hospedeiros naturais.....	50
1. INTRODUÇÃO .....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	50

2.1 EXTRAÇÃO DE DADOS DA LITERATURA.....	50
2.2 TRANSFORMAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE DE META-REGRESSÃO.....	51
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
3. RESULTADOS.....	51
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO .....	51
3.2 PROTEÇÃO VACINAL NOS HOSPEDEIROS NATURAIS NAS ÚLTIMAS DÉCADAS...	52
3.3 ESTUDO DE META-ANÁLISE .....	53
3.4 META-REGRESSÃO MULTIVARIADA .....	56
4. DISCUSSÃO .....	57
5. CONCLUSÃO .....	58
<b>CAPÍTULO IV - Eficácia de cepa vacinal de <i>BRUCELLA OVIS</i> mutante <math>\Delta abcBA</math> expressando proteína quimérica recombinante na proteção polivalente contra brucelose no modelo murino.....</b>	
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	59
2.1 CAMUNDONGOS .....	59
2.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	59
2.3 EPITOPOS DE CÉLULAS T: PREDIÇÃO DE EPITOPOS <i>IN SILICO</i> .....	60
2.4 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA.....	60
2.5 CONSTRUÇÃO DA CEPA MUTANTE <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 .....	61
2.6 ELETROTRANSFORMAÇÃO, SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE CEPA MUTANTE .....	62
2.7 CONFIRMAÇÃO DE CEPA MUTANTE POR PCR E SEQUENCIAMENTO .....	62
2.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS/PAGE) .....	64
2.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA EM <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 POR WESTERN BLOT .....	65
2.10 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA INFECÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 EM MACRÓFAGOS MURINOS .....	65
2.11 AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DE CEPA MUTANTE <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 EM CAMUNDONGO BALB/c.....	65
2.12 PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 E <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ .....	66
2.13 VACINAÇÃO .....	67
2.14 EXPERIMENTO DE PROTEÇÃO EM BALB/c.....	67
2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
3. RESULTADOS.....	67
3.1 PREDIÇÃO DE EPITOPOS .....	67
3.2 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE PRB14.....	68
3.3 MUTAGÊNESE.....	68
3.4 A CEPA MUTANTE <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 É CAPAZ DE EXPRESSAR A PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA .....	69
3.5 <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 É ATENUADA EM MACRÓFAGOS .....	70
3.6 A CEPA MUTANTE <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 É ATENUADA EM CAMUNDONGOS BALB/c .....	71
3.7 PADRÕES DE ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM DIFERENTES CEPAS DE <i>BRUCELLA</i> E DESAFIADOS COM <i>B. ABORTUS</i> , <i>B. OVIS</i> E <i>B. SUIIS</i> .....	73
3.8 PADRÕES DE LESÕES HISTOPATOLÓGICAS EM FÍGADO E BAÇO DE CAMUNDONGOS BALB/C IMUNIZADOS COM DIFERENTES CEPAS DE <i>BRUCELLA</i> E DESAFIADOS COM <i>B. ABORTUS</i> , <i>B. OVIS</i> E <i>B. SUIIS</i> .....	74

<b>3.9 PROTEÇÃO CONFERIDA POR VACINAÇÃO COM <i>B. ovis</i> <math>\Delta abcBA</math> PRB14 EM CAMUNDONGOS BALB/c</b> .....	<b>74</b>
<b>3.10 LESÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DO LOCAL DA VACINAÇÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO V - Expressão <i>in vitro</i> de proteína quimérica recombinante de <i>Brucella</i> e seu papel protetivo na imunização de camundongos BALB/c</b> .....	<b>77</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>77</b>
2.1 CEPAS BACTERIANAS, PLASMÍDEO E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	77
2.2 PREDIÇÃO DE EPITOPOS DE CÉLULAS T.....	78
2.3 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA.....	78
2.4 CLONAGEM DO GENE CODIFICADOR DE PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE CONSTRUÍDA NO VETOR pPTQ (pET28a).....	78
2.5 ELETROTRANSFORMAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	79
2.6 CONFIRMAÇÃO POR PCR, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CLONADAS NO VETOR PET-28a.....	79
2.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA.....	80
2.8 TESTE DE SOLUBILIDADE.....	80
2.9 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	80
2.10 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	81
2.11 MÉTODO DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	81
2.12 WESTERN BLOT DE PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA.....	81
2.13 RETIRADA DE SAIS DE PROTEÍNA PURIFICADA.....	82
2.14 CAMUNDONGOS.....	82
2.15 VACINAÇÃO.....	82
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>82</b>
3.1 PREDIÇÃO DE EPITOPOS.....	82
3.2 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE PRB14.....	83
3.3 CONFIRMAÇÃO DO INSERTO DA SEQUENCIA CODIFICADOR DE PROTEÍNA QUIMÉRICA EM PTQ.....	83
3.4 EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E WESTERN BLOT DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	84
3.5 PROTEÇÃO DE CAMUNDONGOS APÓS DESAFIO.....	85
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>87</b>
<b>Anexo I</b> .....	<b>101</b>
<b>Anexo II</b> .....	<b>129</b>
<b>Anexo III</b> .....	<b>136</b>
<b>Anexo IV</b> .....	<b>140</b>

## Lista de tabelas

	<b>Capítulo II - Meta-análise e o avanço no desenvolvimento vacinal contra a brucelose</b>	
<b>Tabela 2.1</b>	Resultados de meta-análise de efeitos aleatórios.....	42
<b>Tabela 2.2</b>	Análise de meta-regressão bivariada de variáveis que influenciam os índices de proteção das vacinas experimentais de brucelose.....	43
<b>Tabela 2.3</b>	Análise multivariada de meta-regressão de variáveis que influenciam os índices de proteção de vacinas experimentais de brucelose.....	45
<b>Tabela 2.4</b>	Distribuição dos 117 artigos incluídos neste estudo de acordo com as revistas em que foram publicados.....	46
	<b>Capítulo III - Meta-análise em vacinologia de brucelose em hospedeiros naturais</b>	
<b>Tabela 3.1</b>	Análise de meta-regressão bivariada de variáveis que influenciam a diferença de risco das vacinas experimentais de brucelose, nos anos de 1990 a 2000.....	54
<b>Tabela 3.2</b>	Análise de meta-regressão bivariada de variáveis que influenciam os índices de proteção das vacinas experimentais de brucelose, nos anos de 2000 a 2016.....	55
<b>Tabela 3.3</b>	Análise multivariada de meta-regressão de variáveis que influenciam o valor de diferença de risco de vacinas experimentais de brucelose em hospedeiros naturais, no período de 2000 a 2016.....	56
	<b>Capítulo IV - Eficácia de cepa vacinal de <i>BRUCELLA OVIS</i> mutante <math>\Delta abcBA</math> expressando proteína quimérica recombinante na proteção polivalente contra brucelose no modelo murino</b>	
<b>Tabela 4.1</b>	Descrição e referência dos plasmídeos e cepas bacterianas utilizados neste estudo....	60
<b>Tabela 4.2</b>	Sequência de iniciadores utilizados em PCR convencional para a confirmação mutagênese em <i>Brucella ovis</i> .....	64
<b>Tabela 4.3</b>	Epitopos/peptídeos preditos por análise <i>in silico</i> .....	68
<b>Tabela 4.4</b>	Proteção contra <i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella ovis</i> e <i>Brucella suis</i> em camundongos imunizados com as cepas <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 ou <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ ou <i>Brucella abortus</i> S19.....	74
	<b>Capítulo V - Expressão <i>in vitro</i> de proteína quimérica recombinante de <i>Brucella</i> e seu papel protetivo na imunização de camundongos BALB/c</b>	
<b>Tabela 5.1</b>	Epitopos/peptídeos de células T preditos por análise <i>in silico</i> .....	83

## Lista de figuras

<b>Capítulo II - Meta-análise e o avanço no desenvolvimento vacinal contra a brucelose</b>	
<b>Figura 2.1</b>	Fluxograma que descreve a seleção de artigos para inclusão na meta-análise..... 32
<b>Figura 2.2</b>	Número e porcentagem de experimentos para o desenvolvimento de vacina contra a brucelose de acordo com o tipo de vacina ao longo do tempo. Os intervalos de tempo e o número correspondente de experimentos foram: 1986-1990 (n = 73), 1991-1995 (n = 50), 1996-2000 (n = 13), 2001-2005 (n = 169), 2006-2010 (n = 208) e 2011-2016 (n = 269). Os números de experimentos para cada ponto de dados são indicados no gráfico..... 33
<b>Figura 2.3</b>	Índice de proteção obtidos por diferentes categorias de candidatas vacinas experimentais contra infecção por <i>Brucella</i> spp. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Outliers são indicados por pontos. Os índices médios de proteção foram baseados em 782 experimentos independentes. Os números de grupos experimentais por categoria são indicados entre parênteses..... 33
<b>Figura 2.4</b>	Regressão linear do índice de proteção ao longo do tempo para vacinas experimentais contra <i>Brucella</i> spp. no modelo de camundongo. Todas as categorias de vacinas experimentais (cepas atenuadas, n = 221; cepas mutantes atenuadas, n = 102; vacinas inativadas, n = 66; vacinas de subunidades, n = 287; vacinas de DNA, n = 68; e vacinas vetorizadas, n = 38) foram incluídas nesta análise, correspondendo a 782 experimentos individuais ( $r = -0.0038$ ; $r^2 = 0,09\%$ ; $p = 0,4052$ )..... 34
<b>Figura 2.5</b>	Regressão linear do índice de proteção ao longo do tempo de diferentes categorias de vacinas experimentais contra <i>Brucella</i> spp. no modelo de camundongo. (A) cepas atenuadas (n = 221); (B) vacinas de DNA (n = 68); (C) vacinas inativadas (n = 66); (D) cepas mutantes atenuadas (n = 102); (E) vacinas de subunidades (n = 287); e (F) vacinas de vetores (n = 38). Os pontos indicam cada experimento individual, com linhas de tendência sólida e linhas pontilhadas indicando o intervalo de confiança. Os coeficientes lineares e os valores p são indicados em cada gráfico..... 35
<b>Figura 2.6</b>	Índices de proteção de acordo com diferentes parâmetros. Todas as categorias de vacinas experimentais foram analisadas em conjunto e agrupadas de acordo com: (A) as linhagens de camundongo usadas em cada experimento individual; (B) via de vacinação; (C) número de vacinações; (D) as espécies de <i>Brucella</i> spp. usadas para desafio experimental; (E) via de desafio; e (F) uso de adjuvante. Os números dos grupos experimentais para cada parâmetro são indicados entre parênteses. Valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos..... 36
<b>Figura 2.7</b>	Índice de proteção de acordo com a linhagem de camundongo experimentalmente utilizada para diferentes categorias de vacinas experimentais contra infecção de <i>Brucella</i> spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas atenuadas de mutantes, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas foram reagrupadas de acordo com a linhagem de camundongo experimentalmente utilizada (BALB/c, C57BL/6, Swiss e outros). Vacinas atenuadas: BALB/c, n= 166; C57BL/6, n= 9; Swiss, n= 34, outras, n= 12. Vacinas de DNA: BALB/c, n= 67; C57BL/6, n= 1. Vacinas inativadas: BALB/c, n= 60; Swiss, n= 6. Vacinas mutantes: BALB/c, n= 89; C57BL/6, n= 6; Swiss, n= 4, outras, n= 3. Vacinas de subunidade: BALB/c, n= 274; C57BL/6, n= 3; Swiss, n= 9, outras, n= 1. Vacinas vetorizadas: BALB/c, n= 38. Os valores indicam a

- mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos..... 37
- Figura 2.8** Índice de proteção de acordo com a via de vacinação para diferentes categorias de vacinas experimentais de *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas mutantes atenuadas, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com a via de vacinação (intragástrica e oral, n = 81, intramuscular, n = 90, intraperitoneal, n = 355, subcutânea, n = 199, outras, n = 9). Vacinas atenuadas: intragástrica e oral, n = 12; intraperitoneal, n = 119; subcutânea, n = 48. Vacinas de DNA: intramuscular, n = 62; outras, n = 4. Vacinas inativadas: oral, n = 20; intraperitoneal, n = 19; subcutânea, n = 26; outras, n = 1. Vacinas mutantes: oral, n = 5; intraperitoneal, n = 79; subcutânea, n = 14. Vacinas de subunidades: oral, n = 25; intramuscular, n = 28; intraperitoneal, n = 119, outros, n = 4. Vacinas vetorizadas: oral, n = 19; intraperitoneal, n = 19. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos..... 38
- Figura 2.9** Índice de proteção de acordo com o número de vacinações para diferentes categorias de vacinas experimentais contra *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas atenuadas de mutantes, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com o número de vacinações (1x, n = 394; 2x, n = 196; 3x, n = 111; 4x, n = 36; 9x, n = 2). Vacinas atenuadas: 1x, n = 211; 2x, n = 6; 4x, n = 1). Vacinas de DNA: 1x, n = 6; 2x, n = 2; 3x, n = 34; 4x, n = 26). Vacinas inativadas: 1x, n = 4; 2x, n = 13; 3x, n = 6; 4x, n = 3. Vacinas mutantes: 1x, n = 97; 3x, n = 1. Vacinas de subunidades: 1x, n = 32; 2x, n = 148; 3x, n = 68; 4x, n = 3. Vacinas vetorizadas: 1x, n = 4; 2x, n = 27; 3x, n = 2; 4x, n = 3; 9x, n = 2. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos..... 39
- Figura 2.10** Índice de proteção de acordo com a espécie de desafio de *Brucella* spp. para diferentes categorias de vacinas experimentais. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas mutantes atenuadas, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com a espécie de *Brucella* spp. utilizadas para o desafio experimental (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*). Vacinas atenuadas: *B. abortus*, n = 140; *B. melitensis*, n = 60; *B. ovis*, n = 12; *B. suis*, n = 9. Vacinas de DNA: *B. abortus*, n = 33; *B. canis*, n = 2; *B. melitensis*, n = 27; *B. ovis*, n = 6. Vacinas inativadas: *B. abortus*, n = 28; *B. canis*, n = 2; *B. melitensis*, n = 26; *B. ovis*, n = 7; *B. suis*, n = 3. Vacinas mutantes: *B. abortus*, n = 40; *B. canis*, n = 4; *B. melitensis*, n = 47; *B. ovis*, n = 11. Vacinas de subunidades: *B. abortus*, n = 194; *B. canis*, n = 8; *B. melitensis*, n = 54; *B. ovis*, n = 31. Vacinas vetorizadas: *B. abortus*, n = 29; *B. melitensis*, n = 9. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos..... 40
- Figura 2.11** Índice de proteção de acordo com a via de desafio para diferentes categorias de vacinas experimentais contra *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas atenuadas de mutantes, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com a via de desafio (oral e intragástrica, n = 25; intraperitoneal, n = 587; outras, n = 26; intravenosa, n = 131). Vacinas atenuadas: oral e intragástrica, n = 5; intraperitoneal, n = 185; outras, n = 4; intravenosa, n = 23. Vacinas de DNA: oral e intragástrica, n = 1; intraperitoneal, n = 48; intravenosa, n = 15. Vacinas inativadas: intraperitoneal, n = 35; outras, n = 14; intravenosa, n = 17. Vacinas

	mutantes: oral e intragástrica, n = 1; intraperitoneal, n = 93; outras, n = 4. Vacinas de subunidade: oral e intragástrica, n = 16; intraperitoneal, n = 191; outras n = 4; intravenosa, n = 75. Vacinas vetorizadas: oral e intragástrica, n = 2; intraperitoneal, n = 35; intravenosa, n = 1. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.....	41
<b>Figura 2.12</b>	Índice de proteção de acordo com o uso de adjuvante para diferentes categorias de vacinas experimentais contra <i>Brucella</i> spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas mutantes atenuadas, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com o uso ou não de adjuvante (não, n = 528; sim, n = 253). Vacinas atenuadas: não, n = 213; sim, n = 7. Vacinas de DNA: não, n = 61; sim, n = 7. Vacinas inativadas: não, n = 44; sim, n = 22. Vacinas mutantes: não, n = 96; sim, n = 6. Vacinas da subunidade: não, n = 84; sim, n = 203. Vacinas vetorizadas: não, n = 30; sim, n = 8. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.....	42
<b>Capítulo III - Meta-análise em vacinologia de brucelose em hospedeiros naturais</b>		
<b>Figura 3.1</b>	Fluxograma que descreve a seleção de artigos das plataformas PubMed e Scopus para inclusão neste estudo de meta-análise.....	52
<b>Figura 3.2</b>	Análise de regressão linear correlacionando os tipos de vacinas experimentais (atenuada, mutante, subunidade, vetor e inativada) com o ano de publicação de cada experimento, em diferentes hospedeiros animais. O estudo com 116 experimentos individuais, constituído de vacinas atenuadas (62), com cepas mutantes (23), subunidades (17), vetorizadas (9) e cepas inativadas (5) (r = 34,31; r <sup>2</sup> = 11,77; p = 0,159).....	53
<b>Capítulo IV - Eficácia de cepa vacinal de <i>BRUCELLA OVIS</i> mutante <math>\Delta abcBA</math> expressando proteína quimérica recombinante na proteção polivalente contra brucelose no modelo murino</b>		
<b>Figura 4.1</b>	Plasmídeo pPRB14: área de deleção e representação do gene clonado contendo promotor SecE, proteína quimérica e gene que confere resistência a Cloranfenicol para esta cepa, e adicionalmente os fragmentos <i>upstream</i> e <i>downstream</i> . CmR= cassete de resistência à Cloranfenicol. F= fragmentos de genes truncados na mutagênese.....	61
<b>Figura 4.2</b>	Representação dos iniciadores para confirmação de <i>Brucella ovis</i> WT e da mutação de <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 por PCR. Para <i>B. ovis</i> WT utilizamos iniciadores na região AO500 e na região <i>downstream</i> , enquanto que em <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 os iniciadores utilizados amplificavam a região da proteína quimérica e sequência da região <i>downstream</i> .....	63
<b>Figura 4.3</b>	Representação dos iniciadores para sequenciamento da cepa mutante <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14. Para a cepa $\Delta abcBA$ PRB14 os iniciadores utilizados amplificavam a região do cloranfenicol e sequência da região BOVA503.....	64
<b>Figura 4.4</b>	Design final da proteína quimérica recombinante PRB14 de <i>Brucella</i> com 28 epitopos (vermelho), sequência linker de GGG (preto) e seis histidinas no C-terminal (verde).....	68

<b>Figura 4.5</b>	(A) Confirmação da cepa <i>ΔabcBA</i> PRB14 pertencente a espécie <i>Brucella ovis</i> pela PCR. Amplificação de fragmento de 228 pb do fragmento do gene de <i>B. ovis</i> BOVAO503 presente em uma ilha genômica específica dessa espécie. Amostra 1: <i>B. ovis</i> WT (controle positivo); Amostra 2: <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14; Amostra 3: controle negativo. (B) Confirmação da mutagênese de <i>Brucella ovis ΔabcBA</i> PRB14 pela PCR. Amplificação de fragmento de 857 pb na amostra mutante resultante do gene sintético de PRB14. Amostra 1: <i>B. ovis</i> WT; Amostra 2: <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14; Amostra 3: controle negativo. (C) Confirmação de mutagênese de <i>Brucella ovis ΔabcBA</i> PRB14 por PCR para sequenciamento. Amplificação de fragmento de 1511 pb presente na amostra virulenta de referência <i>B. ovis</i> WT (ATCC 25840). Na cepa mutante <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14 a inserção do gene sintético resultou na amplificação de um produto maior (1749 pb). Amostra 1: <i>B. ovis</i> WT (ATCC 25840); Amostra 2: <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14; Amostra 3: controle negativo.....	69
<b>Figura 4.6</b>	<i>Western blot</i> de diferentes cepas de <i>Brucella ovis</i> . Lisado de células de <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14 foi submetida a eletroforese e transferida, e a cauda de histidina foi detectada com o uso de anticorpo anti-his. ....	70
<b>Figura 4.7</b>	Replicação intracelular de diferentes cepas de <i>Brucella ovis</i> . Macrófagos RAW 264.7 em placas de 96 poços foram infectados com $5 \times 10^7$ UFC/mL de <i>B. ovis ΔabcBA</i> ou <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14 ou <i>B. ovis</i> WT. O tempo 0 representa o número de UFC intracelular uma hora após incubação com gentamicina. Números de UFC foram determinados nos tempos de 0, 4, 24 e 48 horas pós infecção. Diferença significativa entre a amostra de referência e as cepas mutantes está indicada por asteriscos (** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ). Dados são de um experimento individual que é representativo de dois experimentos independentes.....	70
<b>Figura 4.8</b>	Persistência de <i>Brucella ovis ΔabcBA</i> , <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14 e <i>B. ovis</i> WT em baço e fígado de camundongos infectados com diferentes cepas de <i>Brucella ovis</i> . Camundongos foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com $10^6$ UFC/camundongo de <i>B. ovis ΔabcBA</i> , <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14 e <i>B. ovis</i> WT e eutanasiados 7 dias pós infecção. (A) Baço. (B) Fígado.....	71
<b>Figura 4.9</b>	Alterações macroscópicas de baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>Brucella ovis ΔabcBA</i> (A), <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14 (B) e <i>B. ovis</i> WT (C), mostrando esplenomegalia e hepatomegalia em camundongos infectados com cepa selvagem.....	71
<b>Figura 4.10</b>	Fígado de camundongo BALB/c infectado com <i>Brucella ovis ΔabcBA</i> PRB14 (A) e <i>B. ovis</i> WT (B). Microgranuloma focal discreto em fígado de camundongo infectado com <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14 (A) comparado a multifocais microgranulomas em fígado de camundongo infectado com <i>B. ovis</i> WT. Coloração de hematoxilina e eosina (HE). Barra: 20 $\mu$ m.....	72
<b>Figura 4.11</b>	Histologia e imuno-histoquímica de baço de camundongos BALB/c infectados com <i>Brucella ovis ΔabcBA</i> PRB14 (A e C) e <i>B. ovis</i> WT (B e D). (A). Discreto infiltrado inflamatório histiocitário, com alguns neutrófilos na polpa vermelha no baço de camundongos infectados com <i>B. ovis ΔabcBA</i> PRB14. Barra: 100 $\mu$ m. (B). Microgranulomas multifocais intensos no baço de camundongos infectados com cepa <i>B. ovis</i> WT. Barra: 100 $\mu$ m. (C). Imunomarcações discretas de bactérias intracitoplasmáticas em macrófagos. Barra: 20 $\mu$ m. (D). Imunomarcações intensas de bactérias intralésionais em macrófagos em microgranulomas. Barra: 20 $\mu$ m.....	72

<b>Figura 4.12</b>	Alterações macroscópicas no fígado e baço de camundongos BALB/c não imunizados (PBS) (A), imunizados com <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 encapsulada (B) ou com <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ encapsulada (C) ou <i>Brucella abortus</i> S19 (D) e desafiados com <i>B. abortus</i> 2308. Esplenomegalia acentuada e hepatomegalia discreta (A, B e C), exceto nos camundongos imunizados com S19 (D).....	73
<b>Figura 4.13</b>	Alterações macroscópicas no fígado e baço de camundongos BALB/c não imunizados (PBS) (A) ou imunizados com <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 encapsulada (B) ou <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ encapsulada (C) ou <i>Brucella abortus</i> S19 (D) e desafiados com <i>B. ovis</i> WT (ATCC 25840). Esplenomegalia e hepatomegalia discreta (B e C) e ausente em camundongos imunizados com S19 (D). Esplenomegalia acentuada e hepatomegalia discreta em camundongos do grupo controle PBS (A).....	73
<b>Figura 4.14</b>	Alterações macroscópicas representativas de fígado e baço de camundongos BALB/c não imunizados (PBS) (A) ou imunizados com <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 encapsulada (B) ou <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ encapsulada (C) ou <i>B. abortus</i> S19 (D) e desafiados com <i>B. suis</i> 1330. Esplenomegalia acentuada e hepatomegalia discreta (A, B e C), exceto nos camundongos imunizados com S19 (D).....	73
<b>Figura 4.15</b>	Histopatológico e imuno-histoquímica do local de vacinação de camundongos BALB/c imunizados com a cepa <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14 encapsulada, apresentando granulomas. (A): Pele com ulceração extensa associada a infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico focalmente extenso e intenso. Barra: 500 $\mu\text{m}$ (B): Pele, infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico intenso, com numerosos macrófagos espumosos. Barra: 50 $\mu\text{m}$ (C) Degeneração, necrose e perda de fibras musculares esqueléticas, substituídas por infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico intenso, com numerosas bactérias intralésionais imunomarcadas (D). Barra: 50 $\mu\text{m}$ .....	75

#### **Capítulo V - Expressão *in vitro* de proteína quimérica recombinante de *Brucella* e seu papel protetivo na imunização de camundongos BALB/c**

<b>Figura 5.1</b>	Plasmídeo de expressão pPTQ usado para expressão de proteína quimérica recombinante PRB14. KanR: cassete de resistência à Canamicina. 6xHis: sequência para expressão de seis histidinas.....	79
<b>Figura 5.2</b>	<i>Design</i> final da proteína quimérica recombinante PRB14 com 28 epitopos (vermelho), sequência linker de GGG (preto) e seis histidinas no C-terminal (verde).....	83
<b>Figura 5.3</b>	Análise do produto de PCR gerado a partir da reação de PCR utilizando os iniciadores T7 no vetor pPTQ (pET28a) em gel de agarose a 1,5%. Na canaleta 1 encontra-se o padrão de peso molecular e na canaleta 2 o gene da proteína PRB14 inserido no pET28a.....	84
<b>Figura 5.4</b>	Expressão, análise de solubilidade e purificação da proteína recombinante quimérica PRB14. Proteína quimérica PRB14 foi clonada em plasmídeo de expressão pET28a, transformada em <i>E. coli</i> BL21 e induzida com IPTG. Os lisados bacterianos foram analisados por SDS-PAGE 12%, corado com <i>Coomassie brilliant blue</i> . (1) Padrão de peso molecular; (2) lisado de <i>Escherichia coli</i> BL21 vazia não induzida (V-NI) (3) e induzida (V-I); (4) lisado de <i>E. coli</i> contendo o plasmídeo pET28a com inserto não induzida (I-NI) e (5) contendo o plasmídeo pET28a com inserto induzida (I-I), coletados 4 horas após indução; (6) sedimento bacteriano lisado; (7) sobrenadante de cultura lisado; (8) proteína PRB14r purificada.....	84

**Figura 5.5** Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina (6X). (1) Padrão de peso molecular; (2) lisado de *Escherichia coli* BL21 vazia não induzida (V-NI) (3) e induzida (V-I); (4) lisado de *E. coli* contendo o plasmídeo pET28a com inserto não induzida (I-NI) e (5) contendo o plasmídeo pET28a com inserto induzida (I-I), 4 horas após indução; (6) proteína PRB14r purificada..... 85

## Abreviaturas

AAM = macrófagos ativados alternativamente  
ABC = ATP binding cassette  
AEC = 3-amino-9-etilcarbazol  
BCV = vacúolo contendo *Brucella*  
CAM = macrófagos ativados classicamente  
DAB = 3, 3'-diaminobenzidina  
DC = células dendríticas  
d.p.i = dias pós infecção  
h.p.i. = horas pós infecção  
HE = hematoxilina e eosina  
ID = intradérmica  
IFN = interferon  
Ig = imunoglobulina  
IL = interleucina  
IM = intramuscular  
IP = intraperitoneal  
IV = intravenosa  
LPS = lipopolissacarídeo  
MAL = adaptador MyD88  
MOI = multiplicidade de infecção  
NCBI = *National Center for Biotechnology Information*  
NLRs = *Nod-like receptors*  
OIE = Organização Mundial de Saúde Animal  
Omp = proteínas de membrana externa  
PAMPs = padrões moleculares associados à patógenos  
PBS = tampão fosfato-salino  
PCR = reação da polimerase em cadeia  
PPAR $\gamma$  = *intracellular receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*   
PRB14 = proteína recombinante de *Brucella*  
PRISMA = *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses criteria*  
PVDF = membranas de polyvinylidene difluoride  
RER = retículo endoplasmático rugoso  
RPMI = meio *Roswell Park Memorial Institute*  
SC = subcutânea  
SDS-PAGE = gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio  
SFB = soro fetal bovino  
T4SS = sistema de secreção tipo IV  
TIR = *Toll/interleukin-1 receptor*  
TLRs = *Toll-like receptors*  
TNF = fator de necrose tumoral alfa  
TSA = ágar tripton de soja  
UFC = unidades formadoras de colônias  
UPR = *unfold protein response*  
WT = *wild type*

## Resumo

Brucelose é uma das principais doenças infecciosas de caráter zoonótico que resulta em significativas perdas econômicas para animais de produção. O controle e a prevenção da brucelose animal são em grande parte baseados na vacinação com cepas vivas atenuadas. Inicialmente, foram realizados estudos de meta-análise do campo de vacinologia de *Brucella* no camundongo e hospedeiros naturais preferenciais, com objetivo de avaliar de forma temporal o índice de proteção de diferentes categorias vacinais e a influência de diversas variáveis na proteção vacinal. A meta-análise no modelo murino estudou 117 publicações de vacinas experimentais indexadas no PubMed, totalizando 782 experimentos analisados, que demonstraram na análise temporal que não houve melhoria dos índices de proteção ao longo das últimas três décadas. O modelo de meta-regressão desenvolvido, incluiu as categorias de vacinas (atenuada, DNA, inativada, mutante, subunidade e vetorizada) considerando o índice de proteção como a variável dependente e os outros parâmetros (linhagem de camundongo, via de vacinação, número de vacinações, uso de adjuvante, desafio com espécies de *Brucella*) como variáveis independentes. As vacinas de subunidades e vetorizadas proporcionaram índices de proteção significativamente menores quando comparados com vacinas atenuadas. Outras variáveis influenciaram positivamente o índice de proteção, tais como duas imunizações e desafio com *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*, por outro lado, o uso de adjuvante não teve efeito significativo no índice de proteção. O estudo de meta-análise em hospedeiros naturais, avaliou 45 publicações indexadas no PubMed e Scopus, representando 116 experimentos individuais. Adotou-se como medida de proteção, o valor de diferença de risco, calculado baseado na prevenção de abortos e infecção em órgãos de animais imunizados e não imunizados. A análise temporal neste estudo demonstrou que não houve melhorias na proteção vacinal nas últimas décadas. O modelo de meta-regressão desenvolvido para os hospedeiros naturais, incluiu as categorias de vacinas (atenuada, inativada, mutante, subunidade e vetorizadas), considerando o valor de diferença de risco como a variável dependente. Algumas variáveis demonstraram influenciar a proteção vacinal, sendo a via de vacinação subcutânea significativamente mais protetiva do que a via intramuscular e oral, além da via subcutânea ter proporcionado maior valor de diferença de risco que a via conjuntival, quando utilizada no desafio. As vacinas de subunidades proporcionaram significativamente menor proteção, enquanto que as vacinas inativadas foram mais protetivas que as vacinas atenuadas. Foi desenvolvido um estudo avaliando a cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  como potencial vetor de múltiplos epítomos de *Brucella* preditos de células T. Este estudo avaliou a expressão *in vitro* da expressão de uma proteína quimérica recombinante na cepa vetorial, analisando o perfil de atenuação em macrófagos e camundongos, e sua eficácia protetiva contra diferentes espécies virulentas de *Brucella*. A cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  demonstrou ser um promissor vetor vacinal, sendo capaz de expressar a proteína quimérica recombinante PRB14 e manter o perfil de atenuação. Sendo assim, a cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 induziu proteção contra o desafio com patógeno *B. ovis*, entretanto, não demonstrou proteção contra desafio experimental com *B. abortus* e *B. suis*. Com o objetivo de avaliar o papel isolado da PRB14 de induzir resposta imune protetiva contra a infecção por *Brucella* em camundongos BALB/c, finalmente produzimos essa proteína quimérica em *E. coli* e a utilizamos como antígeno vacinal associado a adjuvante de Freud. No entanto, esta proteína não se mostrou protetiva contra a infecção por *B. abortus*, *B. ovis* e *B. suis* em camundongos.

**PALAVRAS-CHAVE:** vacina, *Brucella*, camundongo, hospedeiros naturais, proteína quimérica, vetor, mutante.

## Abstract

Brucellosis is one of the major zoonotic infectious diseases that results in significant economic losses for animal's production. The control and prevention of animal brucellosis are largely based on vaccination with live attenuated strains. Initially, meta-analysis studies were conducted addressing the subject of *Brucella* vaccinology in mice and preferred natural hosts, aiming to evaluate the protection index of different vaccine categories and the influence of several variables on vaccine protection. The meta-analysis in the murine model studied 117 publications of experimental vaccines indexed in PubMed, in total 782 experiments analyzed, which demonstrated in the temporal analysis that there was no improvement in protection indexes over the last three decades. The meta-regression model developed included the categories of vaccines (attenuated, DNA, inactivated, mutant, subunit and vector) considering the protection index as the dependent variable and the other parameters (mouse lineage, vaccination route, number of vaccinations, use of adjuvant, challenge with *Brucella* species) as independent variables. Subunit and vectorized vaccines provided significantly lower protection rates when compared to attenuated vaccines, and other variables positively influenced the protection index, such as two immunizations and challenge with *B. melitensis*, *B. ovis* and *B. suis*, on the other hand, the use of adjuvant had no significant effect on the protection index. The meta-analysis study in natural hosts evaluated 45 publications indexed in PubMed and Scopus, representing 116 individual experiments. The value of risk difference, calculated based on the prevention of abortions and infection in organs of immunized and non-immunized animals, was adopted as a protection measure. The temporal analysis in this study demonstrated that there were no improvements in vaccine protection in the last decades. The meta-regression model developed for the natural hosts included the vaccine categories (attenuated, inactivated, mutant, subunit and vectorized) considering the value of risk difference as the dependent variable, and some variables demonstrated to influence vaccine protection, such as the subcutaneous route of vaccination was significantly more protective than the intramuscular and oral route, and the subcutaneous route provided a higher risk difference value than the conjunctival route when used in the challenge. Subunit vaccines provided significantly less protection, while inactivated vaccines were more protective than attenuated vaccines. A study was carried out evaluating the mutant strain *B. ovis*  $\Delta abcBA$  as a potential vector of multiple predicted T cell epitopes. This study evaluated the expression *in vitro* of the expression of a recombinant chimeric protein in the vector strain by analyzing the attenuation profile in macrophages and mice, and their protective efficacy against different virulent *Brucella* species. *B. ovis*  $\Delta abcBA$  strain was shown to be a promising vaccine vector, capable of expressing the recombinant chimeric protein and maintaining the attenuation profile. Therefore, the *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 strain induced protection against the challenge with *B. ovis*, however, did not demonstrate protection against experimental challenge with *B. abortus* and *B. suis*. In order to evaluate the role of PRB14 in inducing a protective immune response against *Brucella* infection in BALB/c mice, we finally produced this chimeric protein in *E. coli* and used it as a vaccine antigen associated with Freud's adjuvant. However, this protein was not shown to be protective against *B. abortus*, *B. ovis* and *B. suis* infection in mice.

**KEY-WORDS:** vaccine, *Brucella*, mouse, natural hosts, chimeric protein, vector, mutant.

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A brucelose é uma doença infecciosa e zoonótica, de distribuição mundial (Pappas et al., 2006), caracterizada por abortos em animais de produção e importantes perdas econômicas (Santos et al., 2013), assim, a vacinação de animais susceptíveis é importante para o controle dessa infecção.

O controle de brucelose em animais é usualmente feito realizando a administração de cepas vivas atenuadas, para bovinos tem se adotado o uso de *Brucella abortus* S19 e *B. abortus* RB51, enquanto que para pequenos ruminantes a vacina *B. melitensis* Rev. 1. A vacina Rev. 1 não tem o uso permitido em países livres de *B. melitensis*, incluindo o Brasil (Cheville et al., 1992; Schurig et al., 2002; Corbel, 2006). Essas vacinas possuem muitas desvantagens, sendo patogênicas para o homem e promovem aborto em animais gestantes (Corbel, 2006), desta forma, alternativas mais seguras estão sendo estudadas e avaliadas no modelo experimental murino e hospedeiros naturais.

Com o objetivo de estudar o campo da vacinologia de *Brucella*, dois amplos estudos foram realizados, inicialmente com vacinas experimentais testadas em camundongos (Capítulo II), avaliando de forma temporal o índice de proteção de diferentes categorias vacinais, que demonstrou índices de proteção estáveis ao longo dos últimos 30 anos. Além disso, este estudo possibilitou avaliar a influência de variáveis independentes, como linhagem de camundongo, via de vacinação e desafio, espécies de *Brucella* utilizada no desafio, na eficácia da proteção vacinal. Apesar do camundongo ser amplamente utilizado como modelo para estudo de infecção e resposta protetiva contra *Brucella* (Silva et al., 2011a), os resultados desta meta-análise demonstraram que a correlação entre o índice de proteção no modelo murino e proteção na espécie hospedeira natural não está clara para a maioria das vacinas experimentais.

Assim, buscando estudar o desenvolvimento de vacinas contra *Brucella* spp. em hospedeiros naturais (Capítulo III), foi realizado um novo estudo de meta-análise, avaliando vacinas experimentais testadas principalmente em bovinos, ovinos, caprinos, nos últimos quarenta anos. Este estudo demonstrou que estas vacinas têm proporcionado níveis de proteção estáveis, e que as vacinas de cepas inativadas proporcionam melhor proteção.

Finalmente, a aquisição de conhecimentos em vacinologia contra *Brucella*, possibilitou o desenvolvimento de uma abordagem inovadora baseada na utilização de múltiplos epítomos de células T expressos em uma cepa mutante atenuada *B. ovis*  $\Delta abcBA$  (Capítulo IV) e também a produção de uma proteína quimérica recombinante em *Escherichia coli* (Capítulo V). Este estudo demonstrou que *B. ovis*  $\Delta abcBA$  é um potencial vetor vacinal, sendo capaz de expressar a proteína quimérica recombinante, porém a mesma proteína recombinante não demonstrou proteção contra a infecção por *B. abortus*, *B. ovis* e *B. suis* em camundongos.

#### 1.2 O GÊNERO *Brucella*

*Brucella* spp., são bactérias intracelulares facultativas, Gram-negativas, pertencentes à classe das  $\alpha$ -2-Proteobacterias (Acha e Szyfres, 2001; Corbel, 2006; Nene e Kole, 2009). O gênero *Brucella* é constituído por seis principais espécies: *B. abortus* (hospedeiro natural: bovino); *B. melitensis* (caprinos); *B. ovis* (ovinos); *B. suis* (suínos); *B. canis* (cães) e *B. neotomae* (ratos do deserto) (Corbel, 1997). Ainda, espécies como *B. pinnipedialis* e *B. ceti* foram isoladas de mamíferos marinhos (Foster et al., 2007), *B. microti* isolada de ratazana *Microtus arvalis* (Verger et al., 1987; Scholz et al., 2008), *B. inopinata* de implante mamário (Scholz et al., 2010), *B. papionis* em babuínos (Whatmore et al., 2014) e *B. vulpis* de raposas (red foxer) (Scholz et al., 2016). Uma nova espécie foi isolada de reservatórios anfíbios

(*Pyxicephalus edulis*) (Soler-Lloréns et al., 2016) (*Litoria caerulea*) (Whatmore et al., 2015). Há grande similaridade genética interespecies, com aproximadamente, 94% de similaridade entre elas. Entretanto, algumas variações em seu genoma são associadas às diferenças fenotípicas e de predileção por hospedeiros naturais (Perkins et al., 2010).

Espécies de *Brucella* têm potencial zoonótico variável, dentre elas *B. melitensis* é a mais patogênica para o homem, sendo necessários apenas de 1 a 10 organismos para infecção. *B. abortus* e *B. suis* têm potencial zoonótico intermediário e *B. canis* menor capacidade de infectar o homem. Por outro lado, *B. ovis* não é considerada patogênica para o homem (Young, 1983; Godfroid et al., 2005; Xavier et al., 2009 e 2010). *B. neotomae* tem sido tradicionalmente considerada apatogênica para o homem. Contudo, tal conceito tem sido modificado devido ao relato de isolamento de *B. neotomae* no fluido cérebro-espinhal de dois pacientes com neurobrucelose (Suárez-Esquível et al., 2017).

Ainda, as cinco espécies clássicas de *Brucella* podem ser divididas de acordo com a composição do lipopolissacarídeo (LPS), sendo que as espécies lisas (*B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis*) possuem o lipídio A hidrofóbico ligado a uma camada de oligossacarídeo e associado a cadeia de polissacarídeo O de seu LPS, enquanto nas espécies rugosas (*B. canis* e *B. ovis*) na ausência da cadeia de polissacarídeo O (Lapaque et al., 2006).

### 1.3 BRUCELOSE

A brucelose bovina resulta em perdas econômicas muito significativas (Santos et al., 2013), associadas a aborto e infertilidade (Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010; Poester et al., 2013). Dados epidemiológicos demonstram que a doença atinge aproximadamente 90% do rebanho brasileiro, com perdas econômicas estimadas em aproximadamente R\$ 892 milhões (Santos et al., 2013).

A principal via de infecção para o hospedeiro natural referente à *B. abortus* e *B. melitensis* é oral, podendo infectar também por via respiratória e venérea (Mense et al., 2001; Paixão et al., 2009). Dada a facilidade de dispersão por aerossol e alto potencial patogênico, *Brucella* spp. é considerado um potencial agente de bioterrorismo (Santos et al., 2005). A infecção ocorre pelo contato com *Brucella* spp. por meio de inalação ou ingestão das bactérias presentes em fômites contaminados por exsudatos infectados, provenientes de placenta, glândula mamária e epidídimo de animais infectados. Em seres humanos, a infecção está relacionada ao consumo de produtos lácteos não pasteurizados (Corbel, 2006; Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010), e infecção acidental por meio de manipulação de cepas vacinais vivas atenuadas ou cepas virulentas em laboratório (Young, 1983; Corbel, 1997). As principais complicações da infecção no ser humano são osteomielites, artrites, espondilites, neurobrucelose e endocardite (Rajapakse, 1995; Pendela et al., 2017), além de existir também um tropismo de *Brucella* por órgãos genitais no homem, causando epididimite e orquite e em mulheres pode infectar a placenta, entretanto, o aborto é raro (Anderson et al., 1986; Queipo-Ortuño et al., 2006).

A transmissão venérea é importante na infecção por *B. ovis*, tendo as fêmeas ovinas um papel relevante na infecção de machos (Brown et al., 1973; Xavier et al., 2010). Embora, a via venérea para *B. abortus* não seja a via mais importante em bovinos, a infecção pode ocorrer quando sêmen infectado é utilizada na inseminação artificial (Rankin, 1965).

A manifestação clínica da brucelose é fortemente dependente da espécie de *Brucella* e do hospedeiro (Xavier et al., 2009 e 2010). *B. ovis* causa epididimite crônica em carneiros (Carvalho Junior et al., 2012), e ocasionais abortos em fêmeas com aumento da mortalidade perinatal (Ficapal et al., 1998). Na infecção por *B. abortus*, os sinais clínicos mais frequentes nas vacas são o abortamento no último trimestre de gestação, natimortos, nascimento de bezerros fracos, placentite necrotizante e retenção placentária que podem ocasionar infertilidade temporária ou permanente das vacas infectadas (Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010). Em touros *B. abortus* causa usualmente epididimite, orquite e artrites (Corbel et al., 2006). A infecção por *B. canis* em fêmeas caninas está relacionada com altas taxas de mortalidade

perinatal (Tønnessen et al., 2012). *B. melitensis* causa aborto no terço final de gestação em cabras, enquanto em suínos *B. suis* promove infecção sistêmica, resultando em falhas reprodutivas (Poester et al., 2013).

No período gestacional o sistema imune adaptativo é suprimido, diminuindo a resposta imune celular, principalmente redução da resposta Th1 (Weinberg, 1987; Wegmann et al., 1993; Raghupathy, 1997). O estágio de imunossupressão gestacional previne a fetal rejeição pela mãe, porém torna o organismo materno mais suscetível a infecções (Sano et al., 1986; Krishnan et al., 1996). As células trofoblásticas são alvo da infecção por *B. abortus* em vacas, e é conhecido que *B. abortus* suprime mediadores pró-inflamatórios em células trofoblásticas durante o início da infecção. Sendo que, posteriormente, há expressão desses mediadores, tanto *in vitro* como *in vivo* (Poester et al., 2013; Carvalho Neta et al., 2008). Samartino e Enright (1992), estudando explantes de membrana corion-alantoide, observaram uma maior taxa de replicação bacteriana em tecido placentário gestacional tardio comparado a tecido placentário de início de gestação. Não se sabem os mecanismos envolvidos no aumento da susceptibilidade da infecção em vacas no final de gestação, entretanto, hipotetiza-se que as altas concentrações de eritról no útero possam determinar o tropismo da bactéria e, subsequentemente, sua intensa multiplicação (Keppie et al., 1965). Embora essa hipótese carece de comprovação experimental (Poester et al., 2013), alguns estudos sugerem peculiaridades no metabolismo dos órgãos reprodutores que são importantes para o fornecimento de nutrientes com papel proeminente no metabolismo de *Brucella*, incluindo eritról, lactato, glicerol e glutamato (Jacques et al., 2007; Wu et al., 2015; Letesson et al., 2017).

Nas infecções em vacas gestantes, a lesão é primariamente em placentomas, sendo que a bactéria se multiplica preferencialmente em trofoblastos, promovendo placentite, morte fetal e aborto (Enright, 1990; Corbel et al., 2006). Microscopicamente, no quadro agudo tem-se uma placentite necrótica ou fibrinonecrótica, caracterizada por infiltrado neutrofílico associado a grande quantidade de bactérias no interior de macrófagos e células trofoblásticas e extracelular (Xavier et al., 2009).

Avaliando o papel da placenta na infecção por *B. abortus* em camundongos, Kim et al. (2005) observaram altas taxas de carga bacteriana em placentas de fetos abortados. A bactéria foi identificada em células trofoblásticas gigantes e neutrófilos, além disso, maior carga bacteriana foi observada na placenta, comparada a baço, fígado, pulmão e rim. Este estudo demonstrou ainda que o sistema de secreção tipo IV (T4SS) não está envolvido no processo de aborto.

Alterações reprodutivas em fêmeas com brucelose, principalmente o aborto, podem estar relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático (RER) nas células do hospedeiro, correlacionado com alterações na placenta, incluindo seu desenvolvimento, restrição do crescimento fetal e diminuição na secreção de progesterona. O aumento na expressão de enzimas esteroideogênicas (Park et al., 2014; Yang et al., 2015; Wang et al., 2016), está relacionado ao estresse e morte fetal (Sutherland e Searson, 1990). O aumento da expressão de genes codificadores de enzimas esteroideogênicas (CYP19A1 e HSD4B) foi demonstrado na infecção *in vitro* com cepa vacinal *B. suis* S2 em células trofoblásticas de cabras após 48 horas da infecção, comprovando o aumento de síntese de estrogênio durante a infecção (Wang et al., 2016).

A brucelose crônica tende a causar maiores danos aos tecidos, devido a maior persistência da bactéria, promovendo uma resposta inflamatória que danifica o tecido inflamado incessantemente (Baldi e Giambartolomei, 2013). Granulomas resultam de uma resposta crônica a antígenos de *Brucella*, sendo *B. abortus* a espécie que causa com maior frequência granulomas hepáticos (Williams e Crossley, 1982; Aygen et al., 1998). Além do fígado, *B. abortus* causa granulomas multifocais no baço e linfonodos de humanos e roedores, 2 a 3 semanas pós-infecção (Enright, 1990), porém a infecção em camundongos com cepa *B. abortus* mutante com perda funcional de T4SS não causa formação de microgranulomas no baço, atribuindo ao T4SS fator importante na formação de lesões granulomatosas (Rolán et al., 2009).

#### 1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA CONTRA *BRUCELLA* spp. E FATORES DE VIRULÊNCIA

Durante a infecção, a bactéria passa pelo ambiente extracelular, no qual *Brucella* tem contato com componentes bactericidas, incluindo anticorpos, complemento, grânulos de leucócitos e antibióticos. Por outro lado, a bactéria precisa infectar células e para isso, é necessário sobreviver aos mecanismos celulares de destruição de microrganismos. Assim, alguns mecanismos genéticos são ativados e desativados, em resposta ao ambiente em que *Brucella* se encontra, para promover a sobrevivência e evasão do sistema imune (Sola-Landa et al., 1998).

*Brucella* spp. internaliza-se nas células epiteliais das mucosas, por mecanismos dependentes de receptores de superfície que desencadeiam reorganização do citoesqueleto celular do hospedeiro (Rossetti et al., 2012). *Brucella* spp. consegue inibir os mecanismos bactericidas de neutrófilos, incluindo a inibição da degranulação, por meio da liberação de purinas (Canning et al., 1986; Smith e Ficht, 1990). A bactéria é endocitada por macrófagos e células dendríticas, onde se localiza em um vacúolo especial, vacúolo contendo *Brucella* (BCV), que interage inicialmente com endossomos. Posteriormente este escapa da interação dos compartimentos endocíticos e lisossômicos, o que permite que o BCV interaja com o retículo endoplasmático rugoso, local onde ocorre sua multiplicação (Pizarro-Cerda et al., 1998; Méresse et al., 1999; Delrue et al., 2001).

A bactéria tem como aspecto chave de virulência a capacidade de sobreviver dentro de células fagocíticas e não fagocíticas do hospedeiro (Pizarro-Cerda et al., 1998; Delrue et al., 2001). Sabe-se que *B. abortus* expressa alguns fatores de virulência que permitem sua sobrevivência intracelular em macrófagos e células dendríticas, escapando do reconhecimento do sistema imunológico inato e adaptativo e alcançando seu nicho replicativo (Haag et al., 2010).

*Brucella* estimula uma resposta imune inata, sendo uma resposta não específica (Ko e Splitter, 2003). Esta interação inicial de *Brucella* com a resposta imune inata do hospedeiro promove a eliminação de grande quantidade de bactérias, devido a atuação de neutrófilos, principalmente por meio da atividade de mieloperoxidases e sistema complemento (Ficht e Rice-Ficht, 2012). A resposta imune inata é essencial na fase inicial da infecção, promovendo reconhecimento, eliminação do patógeno e controle da doença. Os mecanismos de reconhecimento de bactérias presentes no hospedeiro envolvendo o sistema imune inato incluem os receptores de reconhecimento de padrões moleculares de patógenos, presentes em membrana de células, denominados TLRs (do inglês *Toll-like receptors*) ou NLRs (do inglês *Nod-like receptors*) localizados no citosol. Esses receptores são capazes de distinguir os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que incluem LPS, lipoproteínas, flagelina, entre outros, promovendo resposta inflamatória inicial (Hoebe et al., 2004). Para *Brucella*, a atividade agonista dos PAMPs é baixa e não resulta em resposta inflamatória de elevada intensidade (Roux et al., 2007).

Após a infecção, ocorre um período de incubação até a manifestação dos sintomas ou sinais clínicos, sendo descrito entre duas a quatro semanas no homem. Tal característica pode ser explicada pelo fato de que *Brucella* spp. utiliza mecanismos ativos e passivos que impedem o reconhecimento pelo sistema imune inato por receptores Toll-like (TLRs) e receptores do tipo Nod (NLRs), promovendo a persistência da bactéria no organismo e infecção crônica (Iwasaki e Medzhitov, 2004; Byndloss e Tsolis, 2016).

A flagelina de *Brucella* tem a característica de ser desprovida de um domínio essencial para o reconhecimento de TLR5 (Andersen-Nissen et al., 2005), porém, foi demonstrado que o receptor citosólico (NLRC4) é capaz de detectar a flagelina e contribuir para o controle da infecção em camundongos (Terwagne et al., 2013). Assim, apesar de *Brucella* spp. ser uma bactéria Gram-negativa, o seu não reconhecimento por TLR4 e TLR5 impede que o sistema imune do hospedeiro monte uma adequada resposta imune inata contra a infecção (Tsolis et al., 2008).

Outra estratégia que permite que *Brucella* não seja reconhecida pelo sistema imune inato, é a síntese de Btp1/BtpA por *B. abortus* e TcpB por *B. melintensis*, que são proteínas que contém um domínio de TIR

(do inglês *Toll/interleukin-1 receptor*), conhecidos por degradarem o adaptador MyD88, que é necessário para sinalização de TLR2 e TLR4, além de outros TLRs, com exceção do TLR3. Consequentemente, não ocorre maturação de células dendríticas e produção de citocinas próinflamatórias (Salcedo et al., 2008; Cirl et al., 2008; Sengupta et al., 2010).

O estabelecimento da infecção crônica depende da sobrevivência e replicação intracelular bacteriana. Sabe-se que cepas rugosas de *Brucella* induzem apoptose em macrófagos infectados, entretanto cepas lisas são capazes de inibir a morte celular via apoptose e se replicam dentro de macrófagos (Tolomeo et al., 2003; He et al., 2006). Cepas lisas de *B. abortus* e *B. suis* inibem a apoptose controlando a permeabilidade mitocondrial, a liberação do citocromo c e não induzem assim a ativação de caspase 2 (Chen e He, 2009). No entanto, cepas rugosas resultam na ativação de apoptose ocorrem por liberação de citocromo c e ativação de caspase 2 (Pei et al., 2014).

Além disso, o LPS de *Brucella* é conhecido como não clássico, por ser fraco agonista de TLR4 e, por isso, baixa endotoxidade comparada ao LPS de *E. coli* (Goldstein et al., 1992; Moriyon, 2003). Este LPS tem papel conhecido em induzir a liberação de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio, potentes bactericidas e secreção de citocinas, principalmente interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e fator de necrose tumoral (TNF) (Jiang e Baldwin, 1993; Jiang et al., 1993; Baldwin et al., 1993). Entretanto, sabe-se que o LPS de *B. abortus* induz pouca liberação de intermediários de nitrogênio, secreção de lisozimas e explosão respiratória (Riley e Robertson, 1984; Rasool et al., 1992).

É atribuído ao LPS de cepas lisas de *Brucella* o importante papel como fator de virulência, o que é comprovado baseando-se em observação de mutantes rugosos derivados de cepas lisas, com perfil fortemente atenuado em macrófagos em cultivo celular e *in vivo* (Fernandez-Prata et al., 2001; Rittig et al., 2003). A atenuação é explicada principalmente pela cadeia O de LPS ser importante para invasão e proteção contra diversos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo apoptose, metabólitos de radicais livres de oxigênio e lise celular mediada por complemento (Joiner, 1985; Stinavage et al., 1989; Porte et al., 2003; Fernandez-Prada et al., 2003; Carvalho Neta et al., 2010). Jiménez de Bagués et al. (2004) estudaram a capacidade de invasão de cepas rugosas e lisas em macrófagos, e observaram maior entrada de cepas mutantes rugosas, comparada a cepas selvagens lisas (WT, do inglês *wild type*), fato atribuído possivelmente, à exposição de ligantes em cepas rugosas e que estariam escondidos pela cadeia O em cepas lisas, o que pode proporcionar maior adesão de cepas rugosas de *Brucella* aos macrófagos (Detilleux et al., 1990; Rittig et al., 2003). Entretanto, as cepas mutantes com ausência de polissacarídeo O são rapidamente eliminadas em camundongos experimentalmente infectados (Gonzalez et al., 2008). O papel de invasão celular e potencial imunogênico é também atribuído as proteínas de membrana externa (Omp) de *Brucella* spp., intimamente associadas a peptidoglicanos da parede celular (Vizcaíno et al., 1996; Rossetti et al., 2009). Nas cepas lisas de *Brucella* spp., as Omp estão menos expostas aos anticorpos, devido a cadeia longa O de LPS, comparadas as cepas rugosas (Bowden et al., 1995).

Microrganismos patogênicos como *Brucella*, têm mecanismos que evitam o reconhecimento pelo sistema complemento, tais como o antígeno O em seu LPS possuir a característica de ser mais resistente à deposição de componentes do complemento (C3) (Hoffmann e Houle, 1983; Lapaqueet al., 2006). A deposição de C3 promove a clivagem de C3a e C5a e ativação de TLRs com produção de citocinas próinflamatórias (Zhang et al., 2007; Wilson et al., 2011). Assim, a morte extracelular de cepas de *Brucella* rugosas é atribuída a maior ocorrência de lise celular mediada por sistema complemento (Fernandez-Prada et al., 2001). Após ativação do sistema complemento, iniciam-se os mecanismos de defesa contra o microrganismo, compostos por deposição de proteínas na superfície microbiana, com características de opsoninas (C1q, C3b ou iC3b e C4b), que permitem o reconhecimento do patógeno por células fagocíticas e consequentemente, a formação de complexo de ataque a membrana (MAC ou C5b-9) que levam à lise microbiana (Tomlinson, 1993; Jack et al., 1998; Fernandez-Prada et al., 2001).

O sistema de secreção tipo IV (T4SS) é um fator de virulência, codificado pelos genes *virB1* – *virB12*, que permite à bactéria a secreção de complexos nucleoproteicos ou proteínas, sendo importante para a sobrevivência intracelular de *Brucella*, tráfego bacteriano para o vacúolo de replicação intracelular e

essencial para o estabelecimento de infecção crônica (O'Callaghan et al., 1999; Delrue et al., 2001; den Hartigh et al., 2004; Myeni et al., 2013). Roux et al. (2007) avaliaram *B. melitensis* e *B. abortus* em infecção no baço, e mostraram que T4SS é o fator chave de sinalização para o sistema imunológico do hospedeiro.

Durante a infecção em macrófagos ocorre a indução do promotor de *virB* (Boschiroli et al., 2002; Sieira et al., 2004). Mutantes de *B. melitensis* com deleção de genes do operon *virB* são incapazes de excluir marcadores lisossomais (LAMP-1) em macrófagos. Desta forma, não alcançam o vacúolo de replicação intracelular, conseqüentemente não permitindo a multiplicação bacteriana. Entretanto, sabe-se que os mutantes do operon *virB* são capazes de evitar a fusão com lisossomos em até 48 horas após a infecção, o que permite sua sobrevivência até esse período (Delrue et al., 2001).

Tais *Brucella* mutantes de *virB* são atenuados em modelo murino (Lestrade et al., 2000). A expressão intracelular de *virB* tem sido demonstrada como importante para a evasão da fusão de lisossomos com o vacúolo contendo *Brucella* e a ocorrência da associação ao retículo endoplasmático (Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001; Celli et al., 2003; Celli et al., 2005). Além disso, o T4SS codificado pelo operon *virB* atua no controle de maturação do BCV, tornando-o uma organela permissiva para replicação (Delrue et al., 2001; Comerci et al., 2001).

O T4SS codificado por *virB* atua na indução de genes do hospedeiro envolvidos na resposta inflamatória e imunidade. Cepas de mutantes com perda funcional de T4SS não induzem a expressão de tais genes (Roux et al., 2007). Assim, camundongos infectados intraperitonealmente com *B. melitensis*, respondem em 2-3 dias com produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> e NK (Copin et al., 2007; Rolan e Tsolis, 2008). Mutantes de *virB* não são capazes de estimular a produção de IFN- $\gamma$ , com a mesma carga bacteriana, quando comparado a *B. melitensis* WT (Rolan e Tsolis, 2008). A redução da persistência bacteriana de mutantes, associada à redução do nível de produção de IFN- $\gamma$ , estão envolvidas na mudança de isotipos de IgG observado nos dois grupos de camundongos após a infecção por *B. abortus*. O grupo infectado com *B. abortus* produziu mais IgG2 que o grupo infectado com mutantes de *virB*, indicando a importância do T4SS na indução de produção de IFN- $\gamma$  e polarização de Th1 no hospedeiro (Tsolis e O'Callaghan, 2012).

O sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS controla a expressão de genes em resposta ao ambiente, atuando na regulação da expressão de Omps. É constituído por BvrR, uma proteína citoplasmática e BvrS, uma proteína hemodimérica ligada a membrana celular (Guzmán-Verri et al., 2002). Assim, BvrR/BvrS é outro importante fator de virulência de *Brucella*, sendo que as cepas mutantes BvrR/BvrS são atenuadas e não replicam em macrófagos ou células epiteliais (Sola-Landa et al., 1998; López-Goñi et al., 2002). Estudo com microscopia confocal mostrou que mutantes de BvrS são incapazes de invadir a célula do hospedeiro, por não estimular o recrutamento de GTPase, necessário para que ocorra a polimerização de actina (Guzmán-Verri et al., 2002). Tais cepas mutantes são incapazes de inibir a fusão com os lisossomos, levando a sua rápida destruição, o que permite sua rápida eliminação do organismo em camundongos, em menos de 12 horas (Sola-Landa et al., 1998).

## 1.5 RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA *BRUCELLA* spp.

A proteção imunológica contra a infecção por *Brucella* envolve a produção de citocinas pró-inflamatória, que incluem IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e ativação de macrófagos, linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células dendríticas (Brandão et al., 2012). A proteção contra *Brucella* é mediada principalmente por resposta imune Th1, tendo o IFN- $\gamma$  a capacidade de estimular os macrófagos para eliminar as bactérias (Zhan e Cheers, 1993). Porém, o IFN- $\gamma$  tem importante papel na indução de aborto na infecção por *B. abortus* em camundongos gestantes (Kim et al., 2005). Kim et al. (2005) demonstraram a ocorrência de aborto em camundongos gestantes quando a produção de IFN- $\gamma$  foi induzida na infecção por *B. abortus*, entretanto, o aborto foi prevenido quando se neutralizou o IFN- $\gamma$  com uso de anticorpo anti-IFN- $\gamma$  administrado antes da infecção. Sabe-se que o IFN- $\gamma$  é capaz de inibir o desenvolvimento de células trofoblásticas, provando

falhas das funções celulares e conseqüentemente, falhas na implantação, desenvolvimento da placenta e aborto (Ain et al., 2003).

Em camundongos, IFN- $\gamma$  é importante para o controle da replicação de *Brucella* (Fernandes e Baldwin, 1995; Sathiyaseelan et al., 2006). Camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  desenvolvem uma infecção exacerbada por *B. abortus* (Murphy et al., 2001). Desta forma, camundongos BALB/c recebendo IFN- $\gamma$  recombinante adicional antes e durante a infecção por *B. abortus*, apresentaram redução do número de bactérias recuperadas do baço e peso do órgão, comparado ao grupo controle, após sete dias de infecção (Stevens et al., 1992). Macrófagos cultivados *in vitro* e tratados com IFN- $\gamma$  foram capazes de inibir o crescimento de *B. abortus* (Jones e Winter, 1992; Jiang e Baldwin, 1993). Além disso, estudo com camundongos recebendo tratamento com anticorpo monoclonal neutralizante para IFN- $\gamma$  mostrou aumento na contagem bacteriana no fígado e baço, em comparação aos controles, uma semana após a infecção (Zhan e Cheers, 1993). Zhan e Cheers (1993) também demonstraram que os camundongos BALB/c são mais susceptíveis à infecção, quando comparados a C57BL/6, sendo estes últimos mais resistentes e capazes de produzir uma resposta com IFN- $\gamma$  constante durante as seis primeiras semanas após a infecção. Entretanto, o perfil em BALB/c foi uma resposta inicial elevada de produção de IFN- $\gamma$  na primeira semana após infecção, mas essa produção foi ausente na terceira semana, e retorna a produção na sexta semana. Camundongos C57BL/6 deficientes de IFN- $\gamma$  não resistem a infecção por *Brucella* e morrem, comprovando o papel do IFN- $\gamma$  na resistência a infecção (Murphy et al., 2001).

As citocinas são mediadores solúveis que induzem a ativação de resposta celular, incluindo a IL-12 e o TNF- $\alpha$ . São produzidas principalmente por macrófagos e conhecidas por promover resistência à infecção bacteriana intracelular, sendo que a depleção dessas duas citocinas resulta em exacerbação da infecção e aumento da carga bacteriana após a infecção (Zhan e Cheers, 1995; Zhan et al., 1996). A infecção por *B. abortus* induz as células apresentadoras de antígeno a produzir interleucina 12 (IL-12) que é responsável pela diferenciação de linfócitos Th0 em Th1, o que produz IFN- $\gamma$  e resulta na ativação de macrófagos (Zhan e Cheers, 1993; Murphy et al., 2001).

Zhan et al. (1996) observaram que camundongos com depleção de TNF- $\alpha$  não apresentaram alteração significativa na produção de IFN- $\gamma$ , enquanto que a depleção de IL-12 refletiu em menor produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T esplênicos, demonstrando que IL-12 é um potente indutor de resposta Th1. Estudos *in vitro* demonstraram que essa ativação seja capaz de intensificar a produção de intermediários reativos de oxigênio (Jiang et al., 1993) e produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos infectados (Zhan e Cheers, 1995; Zhan et al., 1996; Copin et al., 2007; Rolán e Tsolis, 2008).

*Brucella* spp. utiliza estratégias que permitem modular a resposta pró-inflamatória do hospedeiro e assim, se manter-se no hospedeiro por longos períodos, como pré-requisito para estabelecer uma infecção crônica (Byndloss e Tsolis, 2016). Resistência a patógenos intracelulares facultativos, incluindo *Brucella* spp., envolve ativação de linfócitos T e ativação de macrófagos do hospedeiro, com o objetivo de eliminar o microrganismo (Zhan et al., 1996).

IL-10 produzida por linfócitos CD4<sup>+</sup> tipo 2 (Th2), linfócitos B, neutrófilos, macrófagos e algumas células dendríticas, tem efeito principal de inibir a síntese de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-12 e proliferação de células Th1 (Fiorentino et al., 1991; Fernandes e Baldwin, 1995; Saraiva e O'Garra, 2010). A resposta com IL-10 é atribuída como um mecanismo do hospedeiro para controlar respostas imunes intensas em infecções e conseqüentemente minimizar o dano tecidual (Saraiva e O'Garra, 2010).

Fernandes e Baldwin (1995) estudaram o bloqueio *in vivo* com anticorpo anti-IL-10 e observaram diminuição da carga bacteriana no baço de camundongos, uma semana após infecção, comprovando que IL-10 favorece a infecção por *Brucella* no período inicial. Isto é explicado devido a ausência de IL-10 causar o aumento de secreção e expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Xavier et al., 2013a).

Acredita-se que as células CD8<sup>+</sup> são fundamentais para o controle da infecção por *Brucella* (Oliveira e Splitter, 1995; Baldwin e Goenka, 2006). Hu et al. (2010) demonstraram que o bloqueio de células CD4<sup>+</sup>, com o uso de anticorpo, em camundongos, não afetou a proteção imunológica vacinal, enquanto que a ausência de células CD8<sup>+</sup> resultou em comprometimento da resposta imune.

Subpopulações de macrófagos presentes no baço de camundongos são distintamente diferentes na fase aguda e crônica da infecção. Na fase aguda, encontram-se os chamados macrófagos ativado classicamente (CAM) com o perfil de alta capacidade pró-inflamatória e bactericida, com alta produção de IFN- $\gamma$ , o que permite a diminuição da carga bacteriana no baço (Mosser e Edwards, 2008; Xavier et al., 2013b). A resposta crônica à infecção por *Brucella* tem sido também atribuída a interação de *Brucella* com subpopulações de macrófagos que favorecem a replicação bacteriana (Byndloss e Tsois, 2016). Na fase crônica, com ausência de IFN- $\gamma$  e estímulo de IL-4 e IL-13, tem-se o predomínio de macrófagos não inflamatórios ativado alternativamente (AAM) pela ativação da via de sinalização STAT6. Esta via é importante para expressão e ativação dos PPAR $\gamma$  (do inglês *intracellular receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), receptores nucleares que ativam os genes ligados a via de  $\beta$ -oxidação, que gera energia por meio de oxidação de ácidos graxos, consequentemente, tem o acúmulo de glicose intracelular, que é utilizada por *Brucella* para replicação *in vitro* e *in vivo*. Assim, os AAM são mais permissivos à sobrevivência e replicação de *Brucella*. Enquanto, nos CAM a energia é obtida pela glicólise anaeróbica, com consumo de grande quantidade de glicose intracelular (Xavier et al., 2013b).

Em infecções por *Brucella*, ocorre a produção de imunoglobulinas, fato já bem conhecido em hospedeiros naturais e seres humanos. Essa resposta humoral tem papel importante nos estágios iniciais de infecção, relacionada com a opsonização da bactéria, consequentemente promove a rápida entrada de *Brucella* em monócitos e macrófagos (Gross et al., 1998; Arenas et al., 2000). Entretanto, não existem evidências que correlacionem a resposta humoral com a resolução da infecção (Hoffman e Houle, 1995; Eze et al., 2000; Roop et al., 2004). Em camundongos, a transferência passiva de soro, contendo anticorpos anti-LPS e anti-oligopolissacarídeo específicos sugere um papel importante na imunidade humoral na infecção por *Brucella*, pois os protegeram contra a infecção por *B. abortus* (Montaraz et al., 1986; Perkins et al., 2010). Resultados têm sugerido que altas taxas de anticorpos evitam a lise mediada por complemento e promovem a entrada da bactéria em fagócitos, podendo aumentar a infecção (Bellaire et al., 2005). De fato, a sorologia realizada em seres humanos e animais apresenta níveis elevados de IgG é considerada apenas um indicador de infecção por *Brucella* (Vendrell et al., 1992), os isotipos de anticorpos predominantemente detectados em camundongos e bovinos são IgG2a e IgG3.

## 1.6 VACINAS CONTRA BRUCELOSE

Vacinação é uma forma importante de prevenção de inúmeras doenças com caráter relevante em saúde pública nos últimos dois séculos (Plotkin, 2009). Os programas oficiais de controle e erradicação de brucelose preconizam o uso de vacinas com cepas vivas atenuadas (Olsen e Stoffregen, 2005), visando reduzir o número de animais susceptíveis, e o sucesso desses programas está relacionado com a eficácia da vacina utilizada (Dorneles et al., 2015). Para o controle de *B. abortus* nos bovinos, utilizam-se as cepas vacinais *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51, enquanto que, para pequenos ruminantes, a cepa *B. melitensis* Rev.1 (Corbel, 2006). Embora promovam boa proteção, essas vacinas possuem algumas desvantagens, como ser patogênicas para o homem, causar aborto quando utilizadas em fêmeas prenhas, e as cepas lisas *B. abortus* S19 e *B. melitensis* Rev.1 interferem nos testes sorológicos (Schurig et al., 1991; Cheville et al., 1992; Vemulapalli et al., 2002; Elzer et al., 2002; Dorneles et al., 2015). *B. melitensis* Rev. 1, quando utilizada por via conjuntival, minimiza a interferência nos testes sorológicos (Olsen e Stoffregen, 2005).

*B. abortus* S19 é uma cepa lisa naturalmente atenuada, que promove 65-75% de proteção em bovinos vacinados, sendo a mais comum cepa vacinal utilizada na prevenção de brucelose bovina por várias décadas (Elzer et al., 2002; Dorneles et al., 2015). Já a cepa rugosa vacinal RB51 foi gerada por meio de múltiplas passagens em cultura contendo baixas concentrações de rifampicina (Schurig et al., 1991). A proteção promovida por vacinas de cepas rugosas (RB51) é menor que a obtida com cepas lisas (S19 e

Rev-1), porém, a cepa vacinal RB51 é segura para vacinação de fêmeas gestantes, mas pode causar brucelose sistêmica em seres humanos acidentalmente infectados e bovinos machos imunizados (Schurig et al., 1991; Tobias et al., 1992; Ashford et al., 2004). A cepa viva atenuada Rev.1 derivada da cepa 16M é utilizada para prevenir a infecção por *B. melitensis* em caprinos e ovinos em diversos países (Corbel, 2006; Avila-Calderón et al., 2013). Tem como desvantagem ser resistente a estreptomicina, principal antibiótico utilizado no tratamento de brucelose humana e seu uso não é permitido em países livres de *B. melitensis*, incluindo o Brasil (Alton et al., 1967; Schurig et al., 2002).

Na China, adota-se a vacina *B. melitensis* M5-90, derivada da cepa virulenta *B. melitensis* M28, para a proteção de caprinos e ovinos contra brucelose (Zhang et al., 2016). Na Federação Russa, a vacina amplamente utilizada é a cepa viva de *Brucella abortus* 82 para controle de brucelose bovina, com alta imunogenicidade, fraca resposta nos testes de aglutinação, garantindo menor interferência nos testes de diagnóstico, além de ter baixa patogenicidade para o ser humano (Ivanov et al., 2011).

Embora muitas doenças de grande importância para o homem tenham sido controladas e erradicadas, outras ainda necessitam de maior conhecimento de patogênese e resposta imunológica, como é o caso de brucelose, o que possibilitará desenvolver vacinas mais eficazes (Rappuoli, 2007). Atualmente, objetivando desenvolver uma vacina protetora para brucelose humana, numerosos estudos tem sido realizados para entender os mecanismos de imunidade protetora de *Brucella* no modelo murino (Perkins e Smither, 2010; Fu et al., 2012; Ghasemi et al., 2014; Carvalho et al., 2016) e também nos hospedeiros naturais (Olsen et al., 2015; Nol et al., 2016).

A vacinologia reversa tem sido utilizada com uma importante ferramenta moderna capaz de prever *in silico* antígenos de *Brucella* com propriedades imunogênicas, capazes de promover resposta humoral e celular com produção de citocinas de resposta Th1, Th2 e Th17 (Gomez et al., 2013), permitindo o estudo de novas vacinas de *Brucella* (Vishnu et al., 2015).

A aquisição de conhecimentos genômicos, proteômicos, tecnologias em vacina e técnicas de DNA recombinante tem possibilitado um número crescente de pesquisas com vacinas mais seguras (Escalona et al., 2017), entretanto, apenas alguns antígenos isolados demonstram imunidade protetora importante *in vivo* (Abkar et al., 2015; Jain et al., 2014). Sabe-se que as respostas imunológicas do tipo Th1 contra a infecção de *Brucella* são melhores estimuladas por vacinas de cepas vivas atenuadas ou cepas mutantes (Carvalho et al., 2016).

A identificação de antígenos proteicos de *Brucella* tem permitido o estudo desses antígenos como vacinas de subunidades, tendo numerosas vacinas relacionadas a proteínas de membrana externa (Omp) que induzem proteção relevante em camundongos (Pasquevich et al. 2009; Goel e Bhatnagar, 2012; Goel et al., 2013). Sabe-se que em termos de eficiência protetiva, as vacinas de subunidades e de DNA são inferiores às vacinas comerciais vivas atenuadas (Tabynov et al., 2014).

A mais nova abordagem no campo de vacinologia de *Brucella* é a utilização de múltiplos epitopos no *desing* de vacinas de DNA (Yin et al., 2016; Golshani et al., 2018), embora, a aplicação de diversos epitopos de células T tem demonstrado índice de proteção insatisfatório em camundongos (Afley et al., 2015).

## 1.7 MODELO MURINO PARA AVALIAÇÃO DE VACINAS EXPERIMENTAIS

Apesar de brucelose ser uma doença infecciosa que acomete pequenos ruminantes e grandes animais, usualmente utiliza-se como modelo animal para estudo preliminar de proteção vacinal, resposta imune e patogenicidade o camundongo (Silva et al., 2011b). O camundongo é um bom modelo animal, por ser um animal pequeno, o custo é menor e são rotineiramente criados e manipulados para tal (Perkins et al., 2010). Os camundongos não apresentam manifestações clínicas da doença, assim a avaliação de proteção é avaliada através da redução da carga bacteriana, em unidades formadoras de colônias (UFC) de *Brucella* no baço após desafio com cepa bacteriana virulenta (Organização Mundial de Saúde, OIE).

Desta forma, a medida preconizada é conhecida como Índice de Proteção, que é a subtração do UFC no baço entre os camundongos não imunizados e os imunizados (Iannino et al., 2015).

A OIE padronizou a infecção de camundongos para avaliação da vacina S19, assim, recomenda-se a utilização de seis camundongos fêmeas linhagem CD1, com idade entre cinco e sete semanas e selecionadas aleatoriamente. Camundongos vacinados subcutaneamente com a cepa *B. abortus* S19, desafiados após trinta dias com cepa *B. abortus* 544 e eutanasiados após quinze dias do desafio. A qualidade vacinal é considerada satisfatória quando existir  $\geq 2$  Log de UFC de diferença entre camundongos não vacinados e vacinados com S19 (OIE, 2016). O Índice de Proteção é uma forma de avaliar a imunogenicidade de uma vacina, através da capacidade de proteger os animais contra a infecção com cepa virulenta. Experimentos realizados com uma nova candidata a vacina devem incluir um grupo não vacinado e um grupo vacinado com cepa viva atenuada de referência (Perkins et al., 2010).

### 1.8 *B. ovis* $\Delta abcBA$ COMO VETOR

*B. ovis* é uma espécie não zoonótica, que induz infecção crônica em ovinos (Poster et al., 2013), caracterizada por epididimite, orquite e vesiculite em machos e, ocasionalmente, abortos em fêmeas e natimorto (Thoen et al., 1993; Carvalho Junior et al., 2012).

No estudo do genoma completo de *B. ovis* identificou-se uma ilha de patogenicidade no cromossomo II ausente em outras espécies clássicas de *Brucella* (Tsolis et al., 2009), posteriormente denominada *Brucella ovis pathogenicity island 1* (BOPI-1) (Silva et al., 2011a). Alguns genes pertencentes a BOPI-1 estão relacionados a patogênese, incluindo o sistema transportador ABC (BOVA0504-BOVA0500, *abcEDCBA*) (Tsolis et al., 2009; Silva et al., 2011a).

A mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  com 1 dia pós-infecção é atenuada no baço e fígado de camundongos BALB/c, e que não sobrevive por 24 horas pós-infecção em macrófagos, sugerindo que o sistema transportador ABC seja importante para sobrevivência intracelular de *B. ovis* nas fases iniciais da infecção (Silva et al., 2011a). Sabe-se que proteínas do ABC transportador são requeridas para transporte de ferro, absorção de nutrientes e excreção de toxinas e antibióticos (Ko e Splitter, 2000; Danese et al., 2004). Assim, a deleção de proteínas desse sistema resulta em redução da virulência bacteriana, o que é vantajoso para a utilização dessa cepa como potencial candidata a vacina. *B. ovis* possui grande número de pseudogenes na região codificadora do sistema ABC e conseqüentemente baixo número de transportadores ABC funcionais (Tsolis et al., 2009; Jenner et al., 2009), assim a deleção de um único gene funcional do sistema ABC permite avaliar seu papel na patogenicidade (Silva et al., 2014). Os genes deletados em *B. ovis*  $\Delta abcBA$  demonstraram ser requeridos para expressão de proteínas de virulência, incluindo superóxido dismutase Cu–Zn (SOD), Omp31 e T4SS (Silva et al., 2014).

*B. ovis*  $\Delta abcBA$  apresentou significativa atenuação *in vitro* em linhagens de células de macrófagos RAW, células HeLa (Silva et al., 2011a) e macrófagos de linhagem primária de ovinos (Macedo et al., 2015), além de atenuação em camundongos (Silva et al., 2011a; Silva et al., 2015a) e ovinos (Silva et al., 2013; Silva et al., 2015b). Ovinos imunizados com essa cepa mutante não eliminaram no sêmen e urina a cepa selvagem após desafio (Silva et al., 2013). Devido seu perfil fortemente atenuado e baixa persistência durante a infecção *in vivo*, adotou-se o processo de encapsulamento que conseguiu reverter tal característica, proporcionando maior persistência no hospedeiro. Além disso, *B. ovis*  $\Delta abcBA$  induziu proteção, com redução da carga bacteriana recuperada de lesões no baço e fígado de camundongos BALB/c e C57BL/6 desafiados com *B. ovis* WT (Silva et al., 2015a). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de proteção com ovinos, hospedeiro natural de *B. ovis*, demonstrando que a imunização com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada protegeu os animais contra a infecção, o desenvolvimento de alterações clínicas e alterações macroscópicas e microscópicas (Silva et al., 2015b).

*B. ovis*  $\Delta abcBA$ , por ser uma espécie de *Brucella* não zoonótica, permite sua utilização segura em diversos hospedeiros sem causar brucelose. Além disso, por ter demonstrado eficiência na infecção de

diferentes tipos de células, poderia ser utilizada como um potencial vetor vivo vacinal, capaz de carrear antígenos de *Brucella*. Vetores virais e bacterianos não patogênicos, geneticamente modificados e carreando antígenos bacterianos, são uma alternativa segura para o desenvolvimento de vacinas para brucelose (Tabynov et al., 2014). São utilizados como vetores de antígenos de *Brucella* alguns microrganismos, como *Escherichia coli* (Iannino et al., 2015), *Ochrobactrum anthropi* (He et al., 2002), vírus Semliki Forest (Cabrera et al., 2009), *Yersinia enterocolitica* (Al-Mariri et al., 2002) e *Salmonella* (Lalsiamthara e Lee, 2017).

## CAPÍTULO II

### Meta-análise e o avanço no desenvolvimento vacinal contra a brucelose<sup>1</sup>

#### 1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença bacteriana zoonótica que resulta em, aproximadamente, meio milhão de novos casos de infecções em seres humanos anualmente (Pappas, 2010). A doença é causada por diferentes espécies de *Brucella*, que são bactérias Gram-negativas intracelulares facultativas que pertencem à família Proteobacteriaceae  $\alpha$ -2 (Cheers, 1984; Corbel, 2006). Pacientes humanos com brucelose desenvolvem sintomas inespecíficos, incluindo febre ondulante, e a doença pode progredir para endocardite, artrite, osteomielite, entre outras manifestações clínicas menos comuns (Boschiroli et al., 2001). Em bovinos, a brucelose é caracterizada por aborto e infertilidade (Xavier et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010; Poester et al., 2013). Portanto, a brucelose bovina resulta em perdas econômicas muito significativas (Cascio et al., 2011; Santos et al., 2013).

O controle e a prevenção da brucelose animal são em grande parte baseados na vacinação. Portanto, nas décadas passadas, tem havido um intenso esforço de pesquisa para tornar mais seguras e mais eficazes as vacinas contra a brucelose (Nicoletti, 1990; Schurig et al., 2002; Corbel, 2006; Avila-Calderón et al., 2013). A vacinação animal contra a brucelose é baseada principalmente em vacinas vivas atenuadas (Avila-Calderón et al., 2013), incluindo *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e *B. melitensis* Rev.1 (Corbel, 2006; Schurig et al., 2002; Nicoletti, 1984), enquanto *Brucella abortus* S19 é muitas vezes considerada o padrão ouro para o desenvolvimento de vacinas (Iannino et al., 2015). No entanto, essas cepas de vacinas vivas atenuadas têm algumas desvantagens significativas, incluindo potencial patogênico para seres humanos, indução de aborto em animais, eliminação no leite e interferência com testes sorológicos no caso de estirpes LPS lisas (Moriyon et al., 2004; Corbel, 2006). Além disso, essas cepas de vacinas tradicionais têm seu uso restrito em ruminantes, enquanto que os suínos, os camelos ou os animais selvagens não são protegidos.

Tradicionalmente, as vacinas vivas atenuadas têm o uso e eficácia muito mais amplos do que as formulações de vacinas inativadas (Avila-Calderón et al., 2013; Todd et al., 2013). Nos últimos anos, houve um aumento do número de estudos sobre abordagens alternativas para a imunização contra brucelose, incluindo vacinas de subunidades recombinantes utilizando proteínas superficiais ou intracelulares de *Brucella* spp. (Oliveira e Splitter, 1996; Velikovskiy et al., 2003; Bhattacharjee et al., 2006; Olsen, 2013). Várias proteínas de *Brucella* foram utilizadas como imunógenos para formulações de vacinas de subunidades experimentais, incluindo proteínas de membrana externa, como: Omp16, Omp19, Omp31, Omp28 e Omp25 (Estein et al., 2003; Pasquevich et al., 2009; Kaushik et al., 2010; Goel e Bhatnagar, 2012), proteína ribossomal L7 / L12 (Oliveira e Splitter, 1996; Golshani et al., 2015), Cu-Zn superóxido dismutase (Singha et al., 2011), a proteína citoplasmática p39 (Al-Mariri et al., 2001), lumazina sintetase BLS (Cassataro et al., 2007), entre outras. Além disso, vacinas experimentais de DNA (Liljeqvist e Ståhl, 1999; Cassataro et al., 2007), bem como vacinas vetorizadas usando vetores de entrega como *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (Onate et al., 1999), *Escherichia coli* (Harms et al., 2009), *Yersinia enterocolitica* (Al-Mariri et al., 2002), *Lactococcus lactis* (Saez et al., 2012) e o vírus influenza (Tabynov et al., 2014) tem sido estudados cada vez mais. Superexpressão dos antígenos de *Brucella* em cepas de vacina atenuadas também tem sido avaliada experimentalmente (Vemulapalli et al., 2000). No entanto, essas novas abordagens ainda não resultaram na geração de vacinas comercialmente disponíveis.

Devido às limitações dos procedimentos experimentais envolvendo os hospedeiros naturais, uma vez que é caro e demorado, o camundongo tem sido amplamente utilizado como um modelo experimental para o

---

<sup>1</sup> Capítulo publicado na *Plos One* (Carvalho et al., 2016). Anexo I.

desenvolvimento de vacinas contra a brucelose (Moriyon et al., 2004). O modelo de camundongo é adequado para estudar a patogênese, resposta imune do hospedeiro e proteção vacinal (Baldwin e Parent, 2002; Silva et al., 2011b). No entanto, protocolos experimentais para avaliar a eficácia da vacina usando este modelo animal não são padronizados, o que gera resultados que muitas vezes não são reprodutíveis (Miranda et al., 2015). BALB/c é a linhagem de camundongo mais utilizada, embora outras estirpes também tenham sido utilizadas para experiências de vacinas, como CD1, C57BL/6, OF1, 129/Sv, Swiss e, "mixed/outbred" (Todd et al., 2013). A eficácia da vacina é avaliada com base em desafio experimental com uma cepa de *Brucella* de tipo selvagem patogênica após imunização, e quantificação de bactérias de tipo selvagem em órgãos alvos, particularmente o baço (OIE, 2008).

Apesar de todo o esforço de pesquisa para o desenvolvimento de novas vacinas contra a brucelose, não está claro se essas novas tecnologias de vacinas serão, de fato, ferramentas amplamente utilizadas para prevenir brucelose. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar uma meta-análise para identificar parâmetros que influenciam a eficácia da vacina, bem como uma análise descritiva sobre como o campo de vacinologia de *Brucella* está avançando em relação ao tipo de vacina, melhoria da proteção em modelos animais ao longo do tempo e fatores que podem afetar a proteção no modelo de camundongo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 FONTE DE DADOS

Os dados foram recuperados de publicações indexadas no PubMed até 15 de fevereiro de 2016, usando as seguintes combinações de termos: (i) "*Brucella*" e "vacina"; (ii) "*Brucella*" e "vacina" e "camundongos"; ou (iii) "*Brucella*" e "vacina" e "camundongos" e "desafio". A lista de publicações foi então desambiguada manualmente. Apenas artigos com o modelo de camundongos foram incluídos neste estudo. Um critério importante para a inclusão foi que o artigo indicasse o índice de proteção ou fornecesse os dados originais que nos permitissem calcular o índice. Por definição, o índice de proteção refere-se à diferença do número de log de unidades formadoras de colônias (UFC) no baço de camundongos *naïve* e vacinados. Somente os artigos publicados em inglês foram incluídos neste estudo. Além disso, artigos com dados insuficientes - ou seja, ausência de indicação de número de animais por grupo, ausência de valores de UFC com seu desvio padrão e ausência de controles não vacinados - não foram incluídos neste estudo.

### 2.2 OBTENÇÃO DE DADOS

Este estudo foi realizado de acordo com os critérios do Relatório Preferencial de Itens para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises (PRISMA). Os dados foram obtidos de cada grupo experimental individual em uma determinada publicação. Esses dados foram agrupados de acordo com a categoria de vacina experimental testada, incluindo: (i) cepas vivas atenuadas, (ii) vacinas de DNA; (iii) vacinas inativadas; (iv) cepas mutantes atenuadas; (v) vacinas de subunidades; e (vi) vacinas de vetor. Parâmetros extraídos de cada experimento individual e considerados para análise incluíam ano de publicação, espécies de vacinas (no caso de vacinas vivas), índice de proteção, linhagem de camundongo, variáveis relacionadas à vacinação (via, dose, número de injeções e adjuvante), variáveis relacionadas ao desafio (espécies de *Brucella* e cepa, via, e intervalo em dias entre desafio e amostragem), as espécies de vetores foram consideradas no caso de vacinas vetorizadas.

Análise de regressão linear foi realizada considerando o ano de publicação e o índice de proteção, para todos os experimentos ou agrupados de acordo com a categoria de vacina. Além disso, a influência de cada parâmetro (categoria de vacina, linhagem de camundongo, via de vacinação e desafio, número de imunização, adjuvantes, espécies de desafio e intervalo entre desafio e eutanásia) no índice de proteção.

## 2.3 TRANSFORMAÇÃO DE DADOS E ANÁLISE DE META-REGRESSÃO

Valores arbitrários foram atribuídos a dados qualitativos. Por exemplo, valores de 0 a 5, sendo "0" para vacinas atenuadas; "1" para vacinas de DNA; "2" para vacinas inativadas; "3" para vacina de cepas mutantes; "4" para vacinas de subunidades; e "5" para vacinas de vetores. Da mesma forma, os valores foram atribuídos às linhagens de camundongo, as vias de vacinação e desafio, o uso de adjuvante, as espécies de *Brucella* spp. usadas para desafio e números de vacinações, aplicando o valor zero à referência e valores integrais crescentes para as outras categorias. O intervalo entre desafio e a eutanásia foi analisado como dados quantitativos lineares.

O coeficiente de variação, o erro padrão e os intervalos de confiança foram calculados para cada experimento incluído neste estudo.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise foi conduzida inicialmente com uma estimativa de meta-análise de efeitos aleatórios com um teste de heterogeneidade. Se o teste de heterogeneidade fosse significativo (valor de p inferior a 0,05), provavelmente seria significativo porque existem diferentes tipos de estudo com diferentes tipos de vacinas, é necessário trabalhar usando uma meta-regressão para verificar qual fator tem efeito positivo ou negativo sobre o índice de proteção.

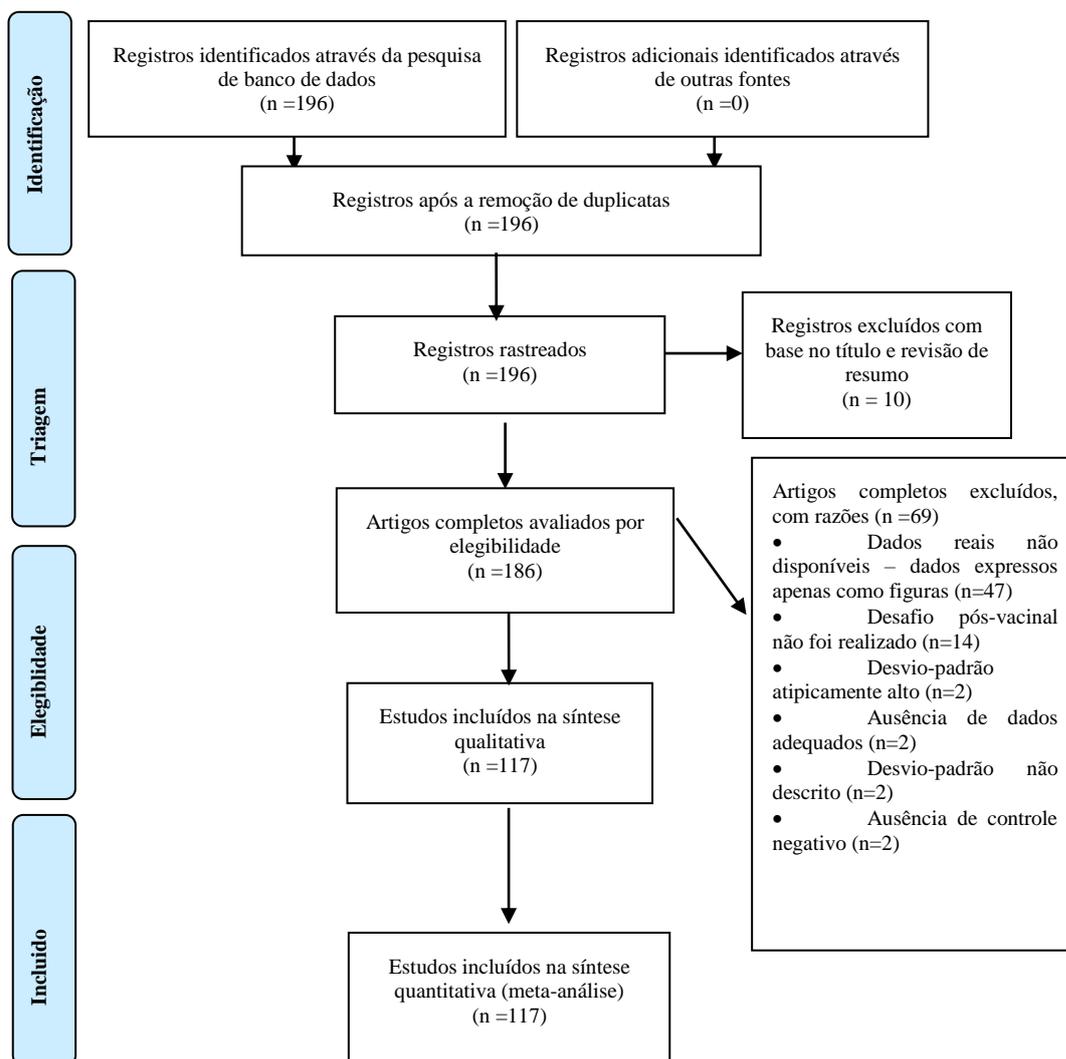
A condução da meta-regressão usou as duas primeiras variáveis independentes, uma sendo sempre o tipo de vacina com o objetivo de controlar o efeito da segunda variável independente. Nesta "meta-regressão univariada controlada" foi realizada a verificação da associação de variáveis independentes, como linhagem de camundongo, via de vacinação, número de vacinações, uso de adjuvante, espécies de *Brucella* usadas para desafio, via de desafio, intervalo entre desafio e eutanásia; e a variável dependente, Índice de Proteção. As variáveis independentes com os valores de p inferiores a 0,200 foram selecionadas para o próximo passo da análise de meta-regressão multivariada. A meta-regressão multivariada foi realizada usando o Índice de Proteção como a variável dependente, e todas as outras que foram selecionadas na univariada controlada como variável independente. O modelo multivariado foi conduzido em uma abordagem para trás, mas nesse caso a exclusão foi feita manualmente para entender como a remoção de uma variável não significativa afetaria as demais variáveis. O programa estatístico utilizado foi o Stata (Statacorp, Texas, EUA).

Esta abordagem de meta-regressão permitiu atribuir um determinado peso para cada experimento individual com base em seu erro padrão. Portanto, uma análise de meta-regressão múltipla foi realizada, incluindo todos os parâmetros juntos, gerando um modelo final de meta-regressão. Valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos e foram mantidos no modelo final.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 PESQUISA DE LITERATURA E CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

Um total de 117 artigos (Anexo II) e dados de 782 experimentos individuais foram incluídos neste estudo. Os critérios para inclusão neste estudo são detalhados na Figura 2.1 Um total de 117 publicações que atendem aos critérios foram selecionadas para a inclusão neste estudo. Assim, um total de 782 experimentos individuais foram analisados. Dados brutos extraídos de todas as 117 publicações e cada experimento individual são demonstrados na Tabela Suplementar (<https://www.dropbox.com/s/xpjd2qugs231gij/raw%20data%20Tatiane%201.xlsx?dl=0>).



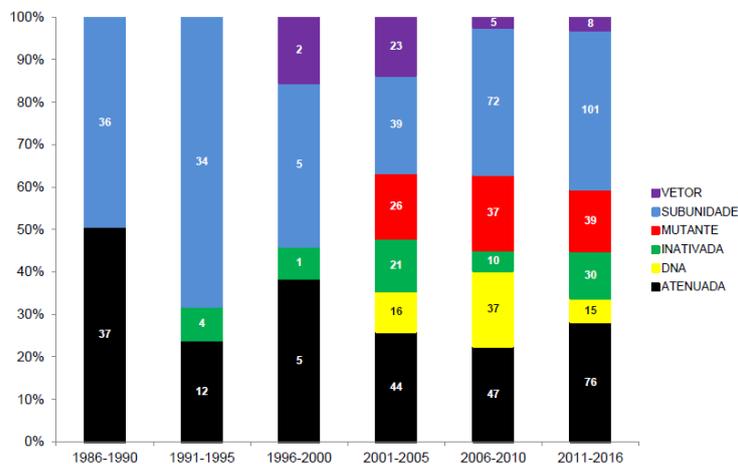
**Figura 2.1.** Fluxograma que descreve a seleção de artigos para inclusão na meta-análise.

### 3.2 PROTEÇÃO CONTRA *BRUCELLA* spp. INDUZIDA POR DIFERENTES CATEGORIAS DE VACINAS EM CAMUNDONGOS - ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Atualmente, as vacinas de subunidades experimentais concentram a maioria dos esforços de pesquisa no campo da vacinologia de *Brucella*, uma vez que esta categoria de vacina representou 36,7%, seguida de vacinas de cepas atenuadas, que correspondiam a 28,26% de todos os experimentos. As outras categorias de vacinas experimentais representam 13,04%, 8,69%, 8,43% e 4,9%, no caso de mutantes, DNA, vacinas inativadas e com vetores, respectivamente. Além disso, as proteínas que foram mais frequentemente usadas como vacinas de subunidades incluíam: frações de LPS (n = 44), L7/L12 (n = 31), HS (n = 27), Omp19 (n = 22), Omp31 (n = 20), Omp16 (n = 17), Omp25 (n = 8), BLS (n = 8), SOD (n = 6), P39 (n = 6), BRP (n = 6), Omp28 (n = 5) e urease (n = 4).

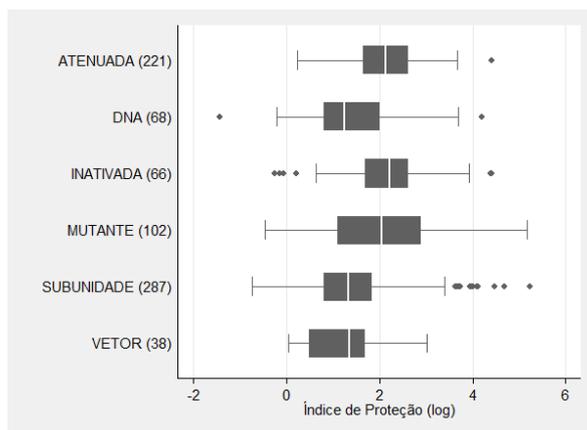
Algumas categorias de vacinas foram estabelecidas anteriormente, enquanto outros tipos de vacinas surgiram ao longo deste estudo (1986-2016) como demonstrado na Figura 2.2. No final da década de 1980 (1986-1990), houve apenas experimentos com vacinas atenuadas e subunidades. Vacinas inativadas apareceram entre 1991 e 1995, enquanto abordagens de vacinas mais diversas foram desenvolvidas e

estudadas a partir de 2001. O período entre 2011 e 2016 incluiu o maior número de experimentos (n = 269) quando comparado aos outros intervalos, o que claramente indica um aumento de investimento em tempo de pesquisa e recursos para o desenvolvimento de vacina contra a brucelose.



**Figura 2.2.** Número e porcentagem de experimentos para o desenvolvimento de vacina contra a brucelose de acordo com o tipo de vacina ao longo do tempo. Os intervalos de tempo e o número correspondente de experimentos foram: 1986-1990 (n = 73), 1991-1995 (n = 50), 1996-2000 (n = 13), 2001-2005 (n = 169), 2006-2010 (n = 208) e 2011-2016 (n = 269). Os números de experimentos para cada ponto de dados são indicados no gráfico.

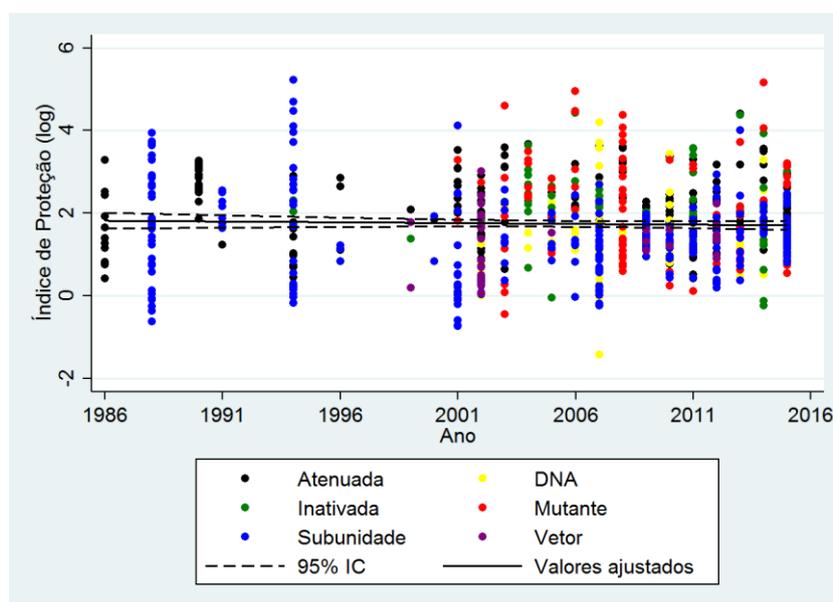
Os dados de 782 experimentos previamente publicados foram agrupados de acordo com a categoria de vacinas experimentais, nomeadas em atenuadas naturalmente, mutantes, inativadas, subunidades, DNA e vacinas vetorizadas. Vacinas atenuadas (n = 221), inativadas (n = 66) e mutantes (n = 102) resultaram em mediana de índice de proteção acima de 2, enquanto as vacinas de subunidade (n = 287), de DNA (n = 68) e vetorizada (n = 38) tiveram índices de proteção inferiores a 2 (Figura 2.3).



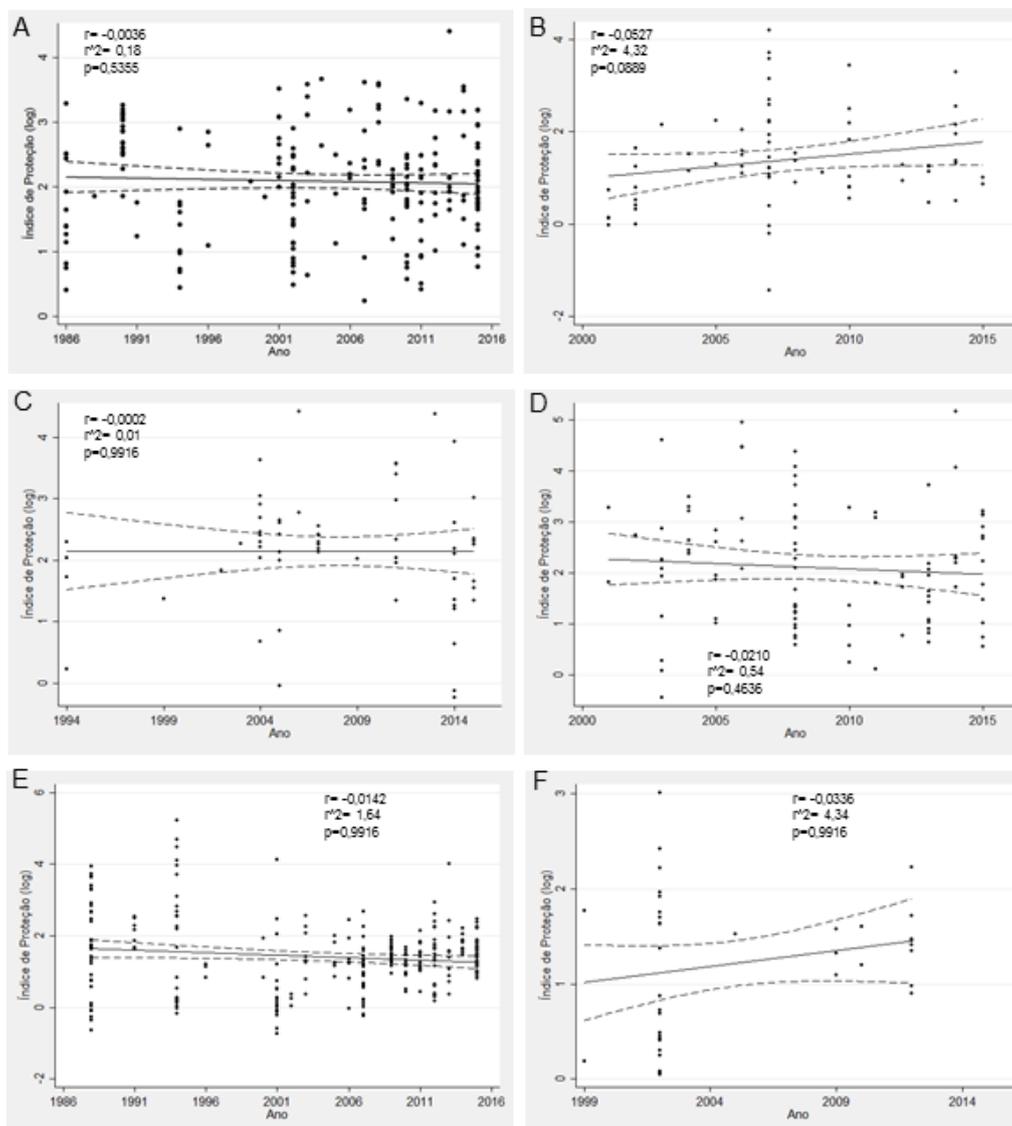
**Figura 2.3.** Índice de proteção obtido por diferentes categorias de candidatas vacinas experimentais contra infecção por *Brucella* spp. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Outliers são indicados por pontos. Os índices médios de proteção foram baseados em 782 experimentos independentes. Os números de grupos experimentais por categoria são indicados entre parênteses.

### 3.3 PROTEÇÃO OBTIDA POR VACINAS EXPERIMENTAIS DE BRUCELOSE AO LONGO DOS ÚLTIMOS 30 ANOS

Para avaliar se os índices de proteção melhoraram ao longo do tempo, uma análise de correlação foi aplicada aos índices de proteção e ao ano de publicação de cada experimento individual nos últimos 30 anos. Quando todas as categorias de vacinas experimentais são analisadas em conjunto, a linha de tendência demonstra claramente que não houve melhoria da proteção nos índices ao longo dos últimos 30 anos, com baixo coeficiente linear negativo e não significativo (Figura 2.4). Durante este período de tempo, os índices médios de proteção das vacinas experimentais permaneceram estáveis e perto de 2 Log. Observou-se uma tendência semelhante quando diferentes categorias de vacinas foram analisadas separadamente (Figura 2.5), com exceção das vacinas de DNA que apresentaram significância estatística com coeficiente de correlação positivo (Figura 2.5B). No entanto, essa tendência para melhorar o índice de proteção ao longo do tempo no caso de vacinas de DNA reflete os índices de proteção muito baixos dos estudos iniciais em vez de altos índices de proteção, uma vez que estudos mais recentes têm índice de proteção que estavam em média abaixo de 2 Log (Figura 2.5).



**Figura 2.4.** Regressão linear do índice de proteção ao longo do tempo para vacinas experimentais contra *Brucella* spp. no modelo de camundongo. Todas as categorias de vacinas experimentais (cepas atenuadas,  $n = 221$ ; cepas mutantes atenuadas,  $n = 102$ ; vacinas inativadas,  $n = 66$ ; vacinas de subunidades,  $n = 287$ ; vacinas de DNA,  $n = 68$ ; e vacinas vetorizadas,  $n = 38$ ) foram incluídas nesta análise, correspondendo a 782 experimentos individuais ( $r = -0.0038$ ;  $r^2 = 0,09\%$ ;  $p = 0,4052$ ).

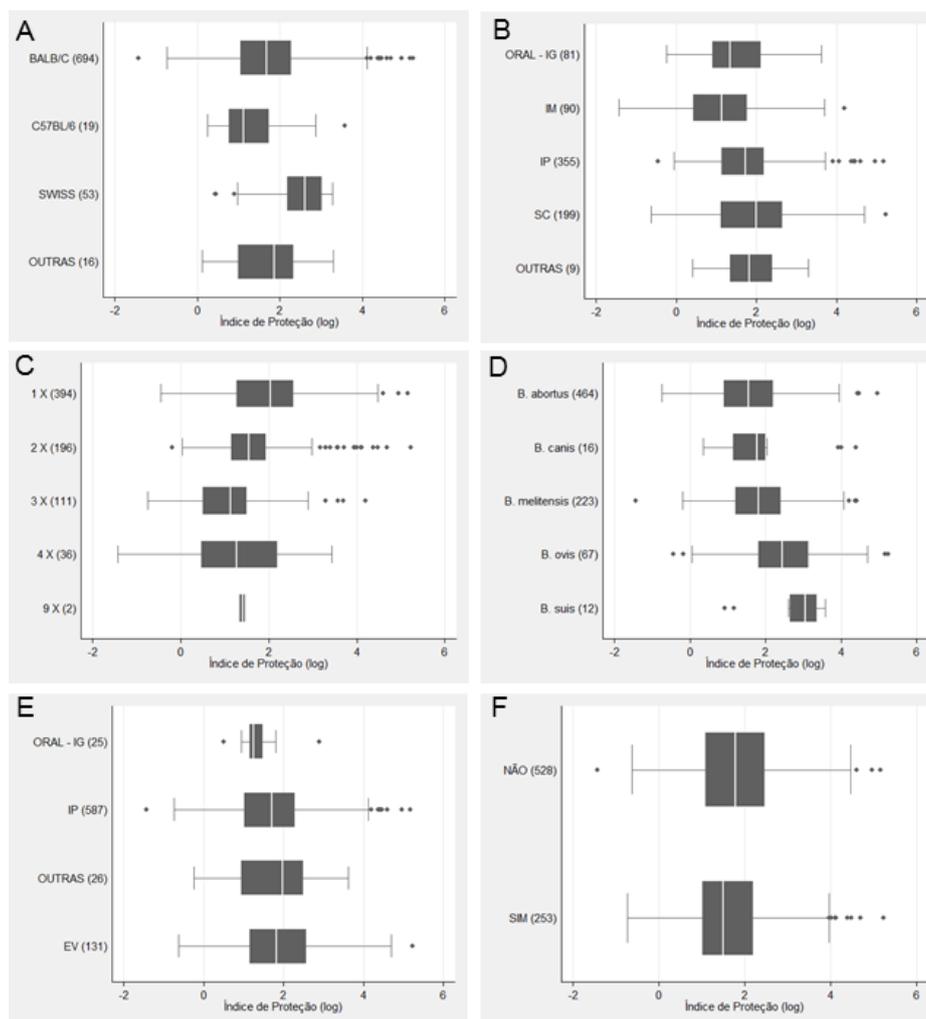


**Figura 2.5.** Regressão linear do índice de proteção ao longo do tempo de diferentes categorias de vacinas experimentais contra *Brucella* spp. no modelo de camundongo. (A) cepas atenuadas (n = 221); (B) vacinas de DNA (n = 68); (C) vacinas inativadas (n = 66); (D) cepas mutantes atenuadas (n = 102); (E) vacinas de subunidades (n = 287); e (F) vacinas de vetores (n = 38). Os pontos indicam cada experimento individual, com linhas de tendência sólida e linhas pontilhadas indicando o intervalo de confiança. Os coeficientes lineares e os valores p são indicados em cada gráfico.

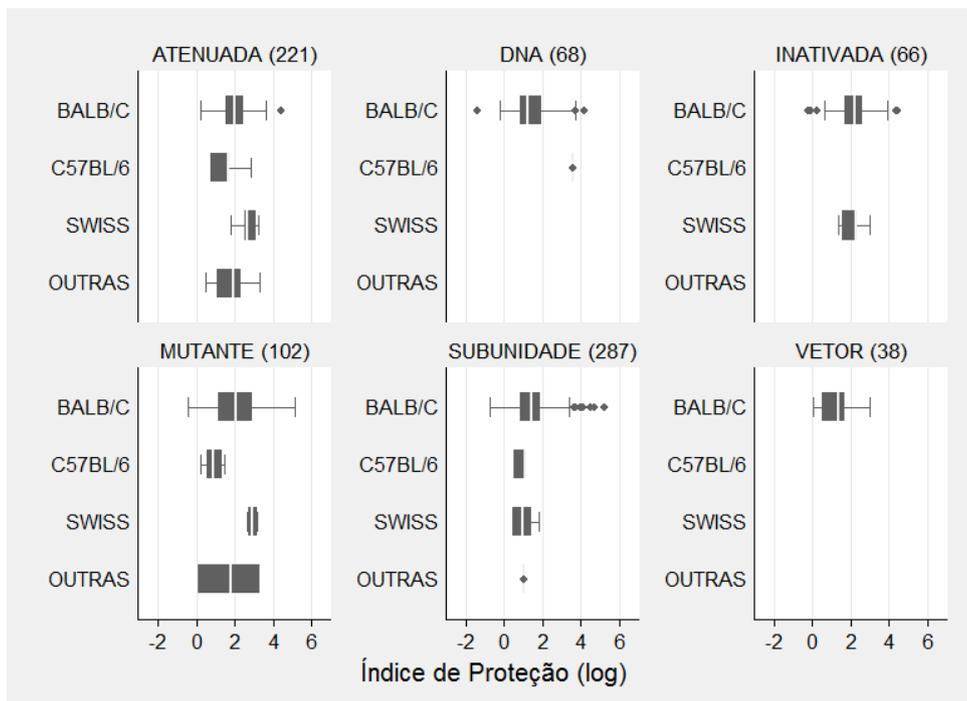
### 3.4 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PROTEÇÃO NO MODELO DE CAMUNDONGO – ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Uma análise estatística descritiva foi realizada considerando o possível efeito de vários parâmetros, incluindo a linhagem de camundongo, a via de vacinação, o número de vacinação, as espécies de *Brucella* usadas para o desafio experimental, a via de desafio e o uso de adjuvante, em índices de proteção de vacinas experimentais para *Brucella*. Observe que esta estatística descritiva não leva em consideração o peso de cada grupo experimental, com base no tamanho da amostra e erro padrão.

Os índices de proteção foram avaliados de acordo com as linhagens de camundongo, incluindo BALB/c, Swiss, C57BL/6 e outros, utilizados em cada um dos 782 experimentos. Em média, os níveis mais altos de proteção foram observados em experimentos usando camundongos Swiss e suas variações, incluindo Swiss albino e Swiss CD-1 outbreed (Figura 2.6A). BALB/c é a linhagem de camundongo mais usada para experimentos de vacina de *Brucella*, correspondentes a 88,75% (694/782) de todos os experimentos incluídos neste estudo. Em média, essa linhagem forneceu índices de proteção mais baixos (1,7076), quando comparados com camundongos Swiss (2,3791) ou outras linhagens (1,7293), mas superior a C57BL/6, que forneceu os índices de proteção mais baixos (1,296) (Figura 2.6), quando todas as categorias de vacinas foram agrupadas. Índices de proteção obtidos por cada linhagem de camundongo de acordo com a categoria de vacina (atenuada, DNA, inativada, mutante, subunidade e vetorizada) estão descritos em Figura 2.7.

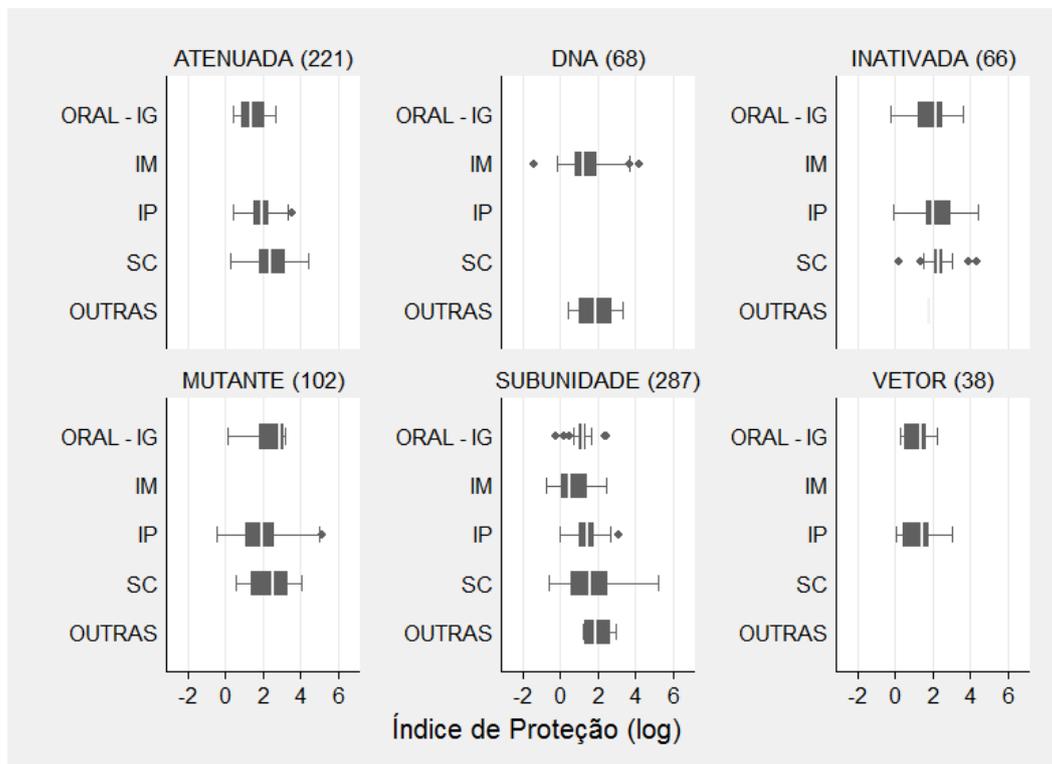


**Figura 2.6.** Índices de proteção de acordo com diferentes parâmetros. Todas as categorias de vacinas experimentais foram analisadas em conjunto e agrupadas de acordo com: (A) as linhagens de camundongo usadas em cada experimento individual; (B) via de vacinação; (C) número de vacinações; (D) as espécies de *Brucella* spp. usadas para desafio experimental; (E) via de desafio; e (F) uso de adjuvante. Os números dos grupos experimentais para cada parâmetro são indicados entre parênteses. Valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.



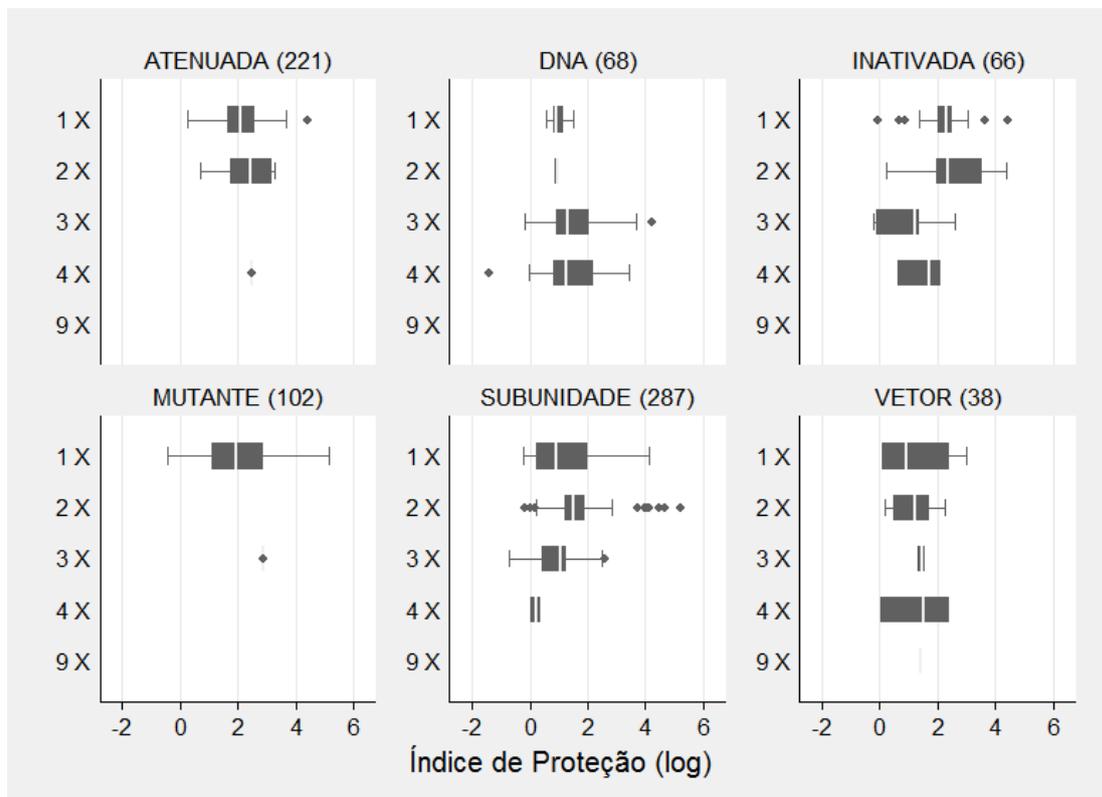
**Figura 2.7.** Índice de proteção de acordo com a linhagem de camundongo experimentalmente utilizada para diferentes categorias de vacinas experimentais contra infecção de *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas atenuadas de mutantes, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com a linhagem de camundongo experimentalmente utilizada (BALB/c, C57BL/6, Swiss e outros). Vacinas atenuadas: BALB/c, n= 166; C57BL/6, n= 9; Swiss, n= 34, outras, n= 12. Vacinas de DNA: BALB/c, n= 67; C57BL/6, n= 1. Vacinas inativadas: BALB/c, n= 60; Swiss, n= 6. Vacinas mutantes: BALB/c, n= 89; C57BL/6, n= 6; Swiss, n= 4, outros, n= 3. Vacinas de subunidade: BALB/c, n= 274; C57BL/6, n= 3; Swiss, n= 9, outras, n= 1. Vacinas vetorizadas: BALB/c, n= 38. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.

Diferentes vias de vacinação, ou seja, oral e intragástrica (ORAL/IG), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), subcutânea (SC) e outras (intranasais, intraesplênicas, etc.) tiveram índice de proteção semelhante quando todas as categorias de vacinas foram analisadas em conjunto (Figura 2.6B). Índices de proteção obtidos por diferentes vias de vacinação de acordo com a categoria de vacina são detalhados em Figura 2.8.



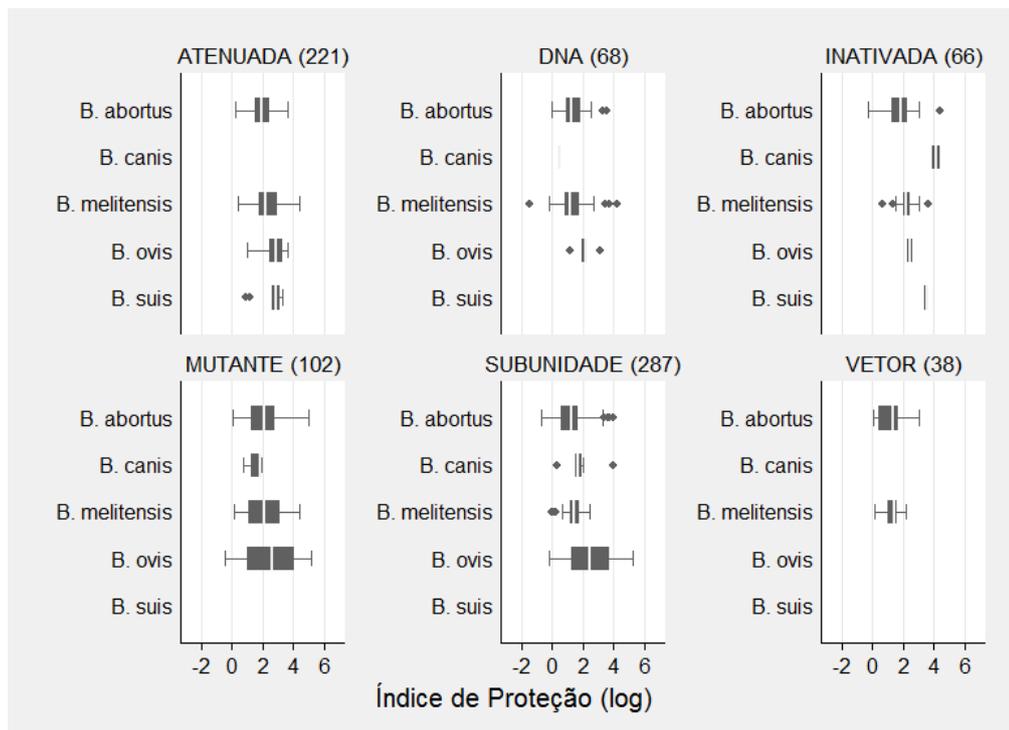
**Figura 2.8.** Índice de proteção de acordo com a via de vacinação para diferentes categorias de vacinas experimentais de *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas mutantes atenuadas, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com a via de vacinação (intragástrica e oral, n = 81, intramuscular, n = 90, intraperitoneal, n = 355, subcutânea, n = 199, outras, n = 9). Vacinas atenuadas: intragástrica e oral, n = 12; intraperitoneal, n = 119; subcutânea, n = 48. Vacinas de DNA: intramuscular, n = 62; outras, n = 4. Vacinas inativadas: oral, n = 20; intraperitoneal, n = 19; subcutânea, n = 26; outras, n = 1. Vacinas mutantes: oral, n = 5; intraperitoneal, n = 79; subcutânea, n = 14. Vacinas de subunidades: oral, n = 25; intramuscular, n = 28; intraperitoneal, n = 119, outros, n = 4. Vacinas vetorizadas: oral, n = 19; intraperitoneal, n = 19. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.

O efeito do número de vacinações, i.e. única vacinação vs múltiplas (2, 3, 4 e 9 vacinações) em índices de proteção foram comparados agrupando todas as categorias de vacinas em conjunto. Interessantemente, as vacinações únicas proporcionaram o índice de proteção mediano mais alto (Figura 2.6C). Índice de proteção obtidos por vacinações únicas ou múltiplas de acordo com cada categoria de vacina são descritos em Figura 2.9.



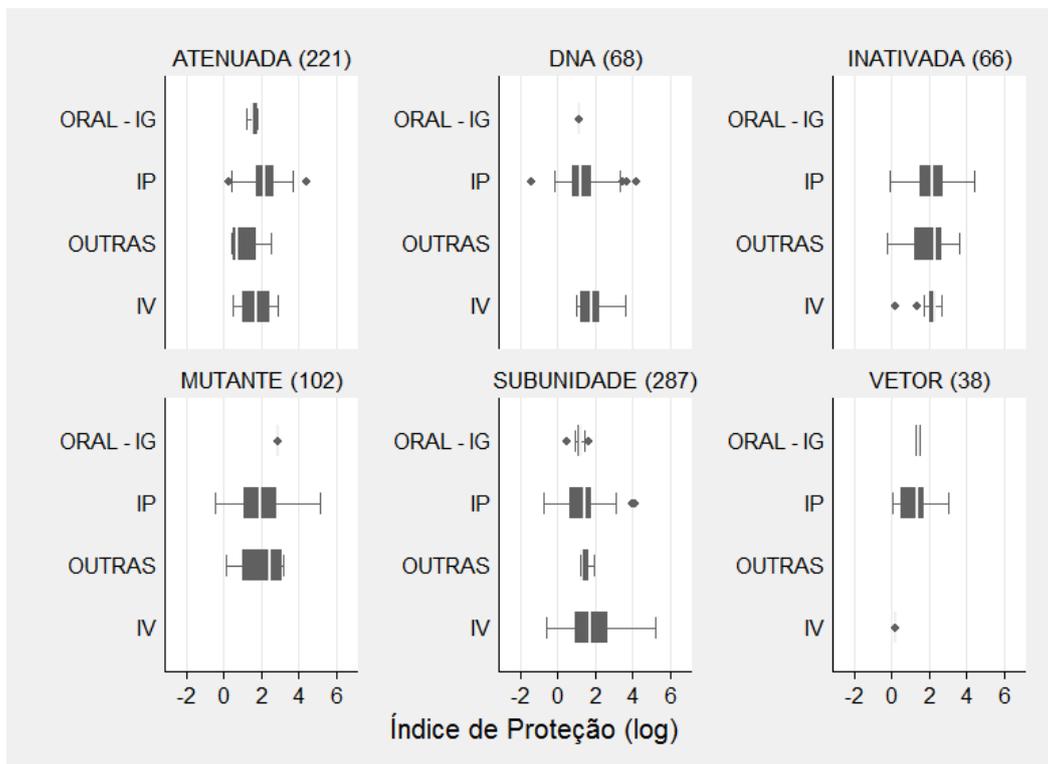
**Figura 2.9.** Índice de proteção de acordo com o número de vacinações para diferentes categorias de vacinas experimentais contra *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas atenuadas de mutantes, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com o número de vacinações (1x, n = 394; 2x, n = 196; 3x, n = 111; 4x, n = 36; 9x, n = 2). Vacinas atenuadas: 1x, n = 211; 2x, n = 6; 4x, n = 1). Vacinas de DNA: 1x, n = 6; 2x, n = 2; 3x, n = 34; 4x, n = 26). Vacinas inativadas: 1x, n = 4; 2x, n = 13; 3x, n = 6; 4x, n = 3. Vacinas mutantes: 1x, n = 97; 3x, n = 1. Vacinas de subunidades: 1x, n = 32; 2x, n = 148; 3x, n = 68; 4x, n = 3. Vacinas vetorizadas: 1x, n = 4; 2x, n = 27; 3x, n = 2; 4x, n = 3; 9x, n = 2. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.

Desafios pós-vacinação com diferentes espécies de *Brucella* spp., foram comparados como: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*. Uma variação acentuada nos índices de proteção foi observada contra essas espécies virulentas de desafio, com quase dois logs de diferença em índices de proteção entre os índices de proteção mais baixos e superiores. Desafio com *B. suis* resultou no índice de proteção mediano mais alto, quando todas as categorias de vacinas foram analisadas juntas (Figura 2.6D). Índices de proteção obtidos por diferentes categorias de vacinas contra diferentes *Brucella* spp. está descrito em Figura 2.10.



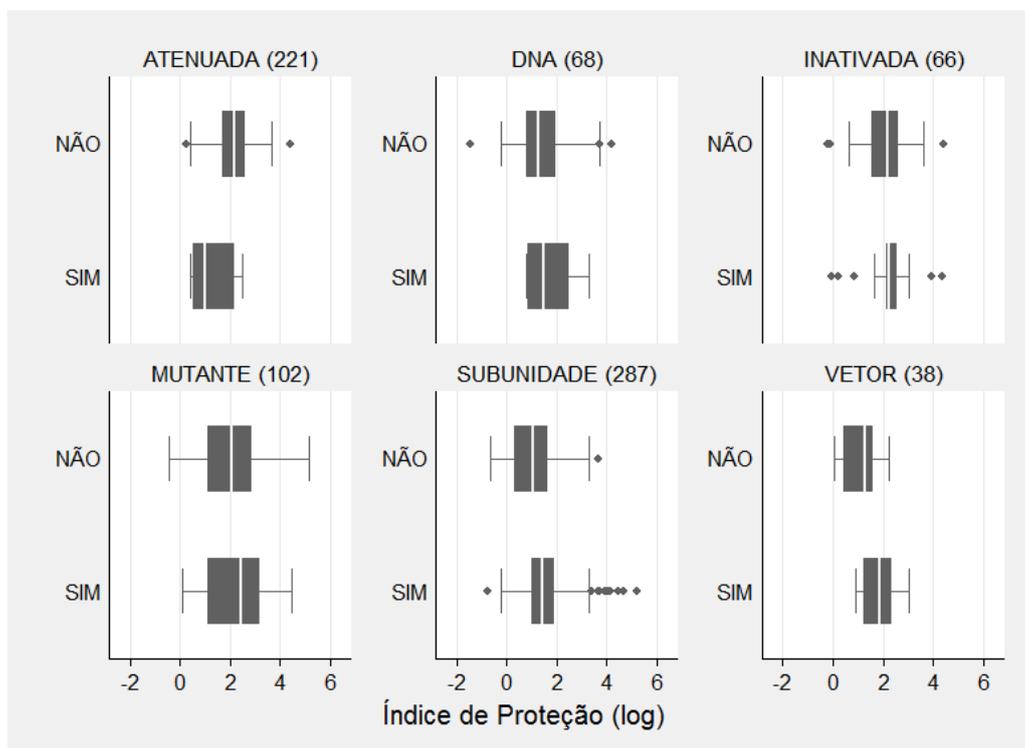
**Figura 2.10.** Índice de proteção de acordo com a espécie de desafio de *Brucella* spp. para diferentes categorias de vacinas experimentais. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas mutantes atenuadas, vacinas de subunidades e vacinas vetoriais) foram reagrupadas de acordo com a espécie de *Brucella* spp. utilizadas para o desafio experimental (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*). Vacinas atenuadas: *B. abortus*, n = 140; *B. melitensis*, n = 60; *B. ovis*, n = 12; *B. suis*, n = 9. Vacinas de DNA: *B. abortus*, n = 33; *B. canis*, n = 2; *B. melitensis*, n = 27; *B. ovis*, n = 6. Vacinas inativadas: *B. abortus*, n = 28; *B. canis*, n = 2; *B. melitensis*, n = 26; *B. ovis*, n = 7; *B. suis*, n = 3. Vacinas mutantes: *B. abortus*, n = 40; *B. canis*, n = 4; *B. melitensis*, n = 47; *B. ovis*, n = 11. Vacinas de subunidades: *B. abortus*, n = 194; *B. canis*, n = 8; *B. melitensis*, n = 54; *B. ovis*, n = 31. Vacinas vetorizadas: *B. abortus*, n = 29; *B. melitensis*, n = 9. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.

O efeito da via de desafio no índice de proteção também foi avaliado depois de analisar todas as categorias de vacinas em conjunto. As medianas dos índices de proteção obtidos com desafio através de diferentes vias, ou seja, oral e intragástrico (ORAL - IG), intraperitoneal (IP), outra (intranasal, intraesplênica, etc.) e intravenosa (IV), foram bastante semelhantes (Figura 2.6E). Índices de proteção obtidos por diferentes vias de desafio de acordo com cada categoria de vacina são descritas em Figura 2.11.



**Figura 2.11.** Índice de proteção de acordo com a via de desafio para diferentes categorias de vacinas experimentais contra *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas atenuadas de mutantes, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com a via de desafio (oral e intragástrica, n = 25; intraperitoneal, n = 587; outras, n = 26, intravenosa, n = 131). Vacinas atenuadas: oral e intragástrica, n = 5; intraperitoneal, n = 185; outras, n = 4; intravenosa, n = 23. Vacinas de DNA: oral e intragástrica, n = 1; intraperitoneal, n = 48; intravenosa, n = 15. Vacinas inativadas: intraperitoneal, n = 35; outras, n = 14; intravenosa, n = 17. Vacinas mutantes: oral e intragástrica, n = 1; intraperitoneal, n = 93; outras, n = 4. Vacinas de subunidade: oral e intragástrica, n = 16; intraperitoneal, n = 191; outras, n = 4; intravenosa, n = 75. Vacinas vetorizadas: oral e intragástrica, n = 2; intraperitoneal, n = 35; intravenosa, n = 1. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.

Ao analisar todas as categorias de vacinas em conjunto, os índices de proteção obtidos por vacinas experimentais com ou sem adjuvante foram semelhantes (Figura 2.6F). Importante que o uso de adjuvante seja em grande parte restrito a algumas categorias de vacinas experimentais, conforme detalhado em Figura 2.12.



**Figura 2.12** Índice de proteção de acordo com o uso de adjuvante para diferentes categorias de vacinas experimentais contra *Brucella* spp. As categorias de vacinas (cepas atenuadas, vacinas de DNA, vacinas inativadas, cepas mutantes atenuadas, vacinas de subunidades e vacinas vetorizadas) foram reagrupadas de acordo com o uso ou não de adjuvante (não, n = 528; sim, n = 253). Vacinas atenuadas: não, n = 213; sim, n = 7. Vacinas de DNA: não, n = 61; sim, n = 7. Vacinas inativadas: não, n = 44; sim, n = 22. Vacinas mutantes: não, n = 96; sim, n = 6. Vacinas da subunidade: não, n = 84; sim, n = 203. Vacinas vetorizadas: não, n = 30; sim, n = 8. Os valores indicam a mediana, segundo e terceiro quartis (box), primeiro e quarto quartis (barras de erro). Os outliers são indicados por pontos.

### 3.5 META-ANÁLISES

A meta-análise de efeitos aleatórios foi realizada utilizando 782 grupos experimentais dos 117 documentos selecionados, estimando o índice de proteção e testando a heterogeneidade. Este procedimento também foi feito para os grupos experimentais divididos pelo tipo de vacina. Todas as estimativas mostram alta heterogeneidade sugerindo a necessidade de usar a meta-regressão para acessar qual o fator está afetando o índice de proteção. Os resultados são apresentados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Resultados de meta-análise de efeitos aleatórios.

Tipo de vacina	N	Estimativa de IP	IC 95% da estimativa*		Teste de heterogeneidade valor de p
			Inferior	Superior	
<b>Todas</b>	787	1,711	1,650	1,773	>0,001
<b>Atenuada</b>	221	2,083	1,964	2,202	>0,001
<b>DNA</b>	68	1,408	1,163	1,654	>0,001
<b>Inativada</b>	66	2,148	1,929	2,367	>0,001
<b>Mutante</b>	102	2,052	1,831	2,274	>0,001
<b>Subunidade</b>	287	1,357	1,273	1,441	>0,001
<b>Vetor</b>	38	1,165	0,943	1,387	>0,001

\*IC: intervalo de confiança, que indica que sob as mesmas condições experimentais, os valores teriam essa variação em 95% das vezes.

### 3.6 ANÁLISES BIVARIADAS

Para selecionar as variáveis a serem incluídas no modelo de meta-regressão multivariada, uma análise de meta-regressão bivariada foi realizada considerando cada uma das variáveis controladas por categoria de vacina, ou seja, uma análise bivariada (Tabela 2.2). As variáveis estudadas incluíram: categoria de vacina; linhagem de camundongo; via de vacinação; número de vacinações; uso de adjuvante; espécies de *Brucella* usadas para o desafio; via de desafio; e intervalo entre desafio e eutanásia. As cepas de vacina naturalmente atenuadas com um índice médio de proteção de 2,079 foram significativamente mais protetoras ( $p < 0,001$ ) do que as de DNA, de subunidade e vacinas vetorizadas, que apresentaram índices médios de proteção de 1,377, 1,369 e 1,180, respectivamente. Em contraste, os índices de proteção obtidos por cepas de vacinas inativadas e mutantes (2,758 e 2,527, respectivamente) foram estatisticamente semelhantes aos de vacinas com cepas naturalmente atenuadas.

**Tabela 2.2.** Análise de meta-regressão bivariada de variáveis que influenciam os índices de proteção das vacinas experimentais de brucelose.

Variável	Coeficiente	Valor de p	Intervalo de confiança***	
			Límite inferior	Límite superior
<b>Categoria de vacina – Referência atenuada–valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>				
DNA	-0.7025	<0.001*	-0.9597	-0.4453
Inativada	0.0679	0.607	-0.1916	0.3275
Mutante	-0.04485	0.695	-0.2690	0.1793
Subunidade	-0.7107	<0.001*	-0.8751	-0.5463
Vetor	-0.8990	<0.001*	-1.2208	-0.5772
<b>Constante</b>	<b>2.0799</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.9560</b>	<b>2.2038</b>
<b>Linhagem de camundongo – Referência BALB/C-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>				
C57BL/6	-0.6272	0.003*	-1.0439	-0.2104
SWISS	0.4197	0.002*	0.1555	0.6839
Outros	-0.2984	0.203	-0.7583	0.1615
<b>Constante</b>	<b>2.0589</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.9251</b>	<b>2.1927</b>
<b>Via de vacinação – Referência oral/intragástrica-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>				
Intramuscular	-0.3571	0.081	-0.7591	0.0447
Intraperitoneal	0.2123	0.083	-0.0280	0.4526
Subcutânea	0.4790	<0.001*	0.2226	0.7354
Outras	0.4581	0.177	-0.2070	1.1233
<b>Constante</b>	<b>1.7265</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.4697</b>	<b>1.9832</b>
<b>Número de vacinações – Referência única vacinação-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>				
Duas	0.3872	0.002*	0.1453	0.6291
Três	-0.2241	0.108	-0.4974	0.0491
Quatro	-0.2645	0.197	-0.6667	0.1376
Nove	0.5179	0.437	-0.7895	1.8253
<b>Constante</b>	<b>2.0597</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.9412</b>	<b>2.1783</b>
<b>Adjuvante – Referência sem adjuvante-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>				
Uso de adjuvante	0.2937	0.002*	0.1111	0.4763
<b>Constante</b>	<b>2.0665</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.9428</b>	<b>2.1901</b>
<b>Espécies de desafio – Referência <i>B. abortus</i>-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>				
<i>B. canis</i>	0.4031	0.084	-0.054	0.8603
<i>B. melitensis</i>	0.1947	0.011*	0.0456	0.3438
<i>B. ovis</i>	0.8208	<0.001*	0.5739	1.0677
<i>B. suis</i>	0.8088	0.003*	0.2751	1.3425
<b>Constante</b>	<b>1.9541</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.8232</b>	<b>2.085</b>
<b>Via de desafio- Referência oral/intragástrica-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>				
Intraperitoneal	0.1676	0.375	-0.2034	0.5386
Outras	-0.4428	0.870	-0.5747	0.4861
Intravenosa	0.4419	0.029*	0.4438	0.8395
<b>Constante</b>	<b>1.8772</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.4957</b>	<b>2.2588</b>
<b>Intervalo (dias) entre desafio e eutanásia</b>				
	-0.004	0.165	-0.0096	0.001
<b>Constante</b>	<b>2.1665</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>1.9916</b>	<b>2.3414</b>

\* Os coeficientes de regressão positiva indicam que a variável possui índices de proteção mais altos do que a variável de referência quando estatisticamente significativa. Os coeficientes de regressão negativos indicam o oposto.

\*\* Valores de p estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

\*\*\* O intervalo de confiança indica que nas mesmas condições experimentais, os valores teriam esse intervalo em 95% das vezes.

A avaliação de linhagem de camundongos considerando BALB/c como a linhagem de referência, com índice de proteção de 2,058, apresentou índices de proteção significativamente maiores quando comparado a C57BL/6 ( $p = 0,003$ ) que tinham uma mediana do índice de proteção de 1,43. Por outro lado, os camundongos Swiss tinham índices de proteção (2,478) que foram significativamente maiores do que os camundongos BALB/c ( $p = 0,002$ ), considerando que não foram observadas diferenças significativas entre o grupo “outras” linhagens de camundongos e BALB/c (Tabela 2.2).

A análise de meta-regressão das vias de vacinação, considerando a via oral/intragástrica como referência, demonstrou que esta via, com um índice de proteção de 1,726, foi significativamente menos protetora ( $p < 0,001$ ) do que a via subcutânea (2,205). Índices de proteção obtidos por via intramuscular, intraperitoneal e outras (2,083, 1,938 e 2,184, respectivamente) foram semelhantes para a via oral/intragástrica (Tabela 2.2).

Considerando uma única vacinação como a referência com um índice de proteção de 2,059, duas vacinações com um índice de proteção de 2,446 proporcionou uma melhor proteção ( $p = 0,002$ ) do que vacinação única. Por outro lado, três, quatro ou nove vacinações, com índices de proteção de 1,835, 1,795, e 2,576, respectivamente, foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) a vacinações únicas (Tabela 2.2). O uso de adjuvante resultou em um índice de proteção significativamente melhor ( $p = 0,002$ ) (2,359), quando comparado à vacinação sem adjuvante que resultou em um índice de proteção de 2,066 (Tabela 2.2).

A análise de espécies de desafio, considerando *B. abortus* como referência com o índice de proteção de 1,954 demonstrou que os índices de proteção contra *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis* (2,148, 2,774 e 2,762, respectivamente) foram significativamente maiores quando comparados com *B. abortus* (Tabela 2.2). Por outro lado, o índice de proteção contra *B. canis* (2,357) foi semelhante ao de *B. abortus* ( $p < 0,05$ ). A análise de meta-regressão bivariada também considerou a via de desafio, com a via oral/intragástrica com um índice de proteção de 1,877 como a referência. A via intravenosa (IV), com um índice de proteção de 2,318, foi significativamente mais protetora do que a referência. Índices de proteção obtidos pelas vias intraperitoneais (IP) ou “outra” (2,044 e 1,833, respectivamente) foram estatisticamente similares à referência (Tabela 2.2).

Importante, considerando que os experimentos de vacinas não são padronizados, foram avaliados o efeito do intervalo entre desafio e a mensuração do índice de proteção, e o número de dias entre desafio e a eutanásia de animais experimentais não influenciou significativamente no índice de proteção (Tabela 2.2).

### 3.7 META-REGRESSÃO MULTIVARIADA

Um modelo de meta-regressão foi desenvolvido, incluindo todas as categorias de vacinas (atenuada, DNA, inativada, mutante, subunidade e vetorizada) considerando o índice de proteção como a variável dependente e os outros parâmetros (linhagem de camundongo, via de vacinação, número de vacinações, uso de adjuvante, desafio com espécies de *Brucella*) como variáveis independentes (Tabela 2.3).

As vacinas de subunidades e vetoriais proporcionaram índices de proteção significativamente menores quando comparados com vacinas atenuadas ( $p < 0,001$ ), que foi considerada a categoria de vacina de referência. Os índices de proteção obtidos por vacinas de DNA, inativadas ou mutantes foram estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ) à referência (Tabela 2.3).

Em relação à linhagem de camundongo usada nos experimentos, C57BL/6 e camundongos Swiss resultaram em índices de proteção que foram estatisticamente similares à linhagem de referência BALB/c (Tabela 2.3). Curiosamente, “outras” linhagens de camundongos, que incluíam linhagem de camundongo que eram knockout para genes relacionados à imunidade em 129/Sv, resultaram em um menor índice de proteção ( $p = 0,021$ ) quando comparado à referência (Tabela 2.3).

Com exceção da via intramuscular de vacinação, que proporcionou menor índice de proteção quando comparada a oral/intragástrica ( $p = 0,035$ ), as outras vias de vacinação (intraperitoneal, subcutânea e outras) resultaram proteção semelhante quando comparada à referência (Tabela 2.3). Duas vacinações foram melhores do que a referência que era uma única vacinação ( $p < 0,001$ ), enquanto que três, quatro ou nove vacinações não melhoraram o índice de proteção quando comparado à referência (Tabela 2.3).

As vacinas experimentais proporcionaram índices de proteção significativamente mais altos contra *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis* quando comparados com o desafio de referência com *B. abortus* (Tabela 2.3), enquanto o uso de adjuvante não teve efeito significativo no índice de proteção (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3.** Análise multivariada de meta-regressão de variáveis que influenciam os índices de proteção de vacinas experimentais de brucelose.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor de p***	Intervalo de confiança	
				Limite inferior	Limite superior
<b>Categoria de vacina - Referência atenuada-valor de p&lt;0,001</b>					
DNA	-0,1826	0,2291	0,426	-0,6325	0,2672
Inativada	-0,1333	0,139	0,338	-0,6325	0,1397
Mutante	-0,0145	0,1126	0,898	-0,2356	0,2066
Subunidade	-1,0207	0,1453	<0,001*	-1,3059	-0,7355
Vetor	-1,0774	0,1947	<0,001*	-1,4597	-0,695
<b>Linhagem de camundongo – Referência BALB/C-valor de p&lt;0,001</b>					
C57BL/6	-0,4214	0,2086	0,044	-0,8309	-0,0119
SWISS	0,1386	0,1912	0,469	-0,2368	0,5141
Outras	-0,5824	0,2524	0,021*	-1,0780	-0,0868
<b>Via de vacinação – Referência oral/intragástrica-valor de p&lt;0,001</b>					
Intramuscular	-0,4072	0,1929	0,035*	-0,7859	-0,0285
Intraperitoneal	-0,0454	0,1242	0,715	-0,2893	0,1985
Subcutânea	0,1466	0,1316	0,266	-0,1118	0,4051
Outras	0,3178	0,3136	0,311	-0,2979	0,9335
<b>Número de vacinações – Referência única vacinação-valor de p&lt;0,001</b>					
Duas	0,3943	0,1236	<0,001*	0,1516	0,6369
Três	-0,0459	0,1439	0,75	-0,3284	0,2366
Quatro	-0,2248	0,2096	0,284	-0,6363	0,1866
Nove	0,5015	0,644	0,436	-0,7629	1,766
<b>Adjuvante – Referência sem adjuvante</b>					
Uso de adjuvante	0,1745	0,0927	0,06	-0,0075	0,3565
<b>Espécie de desafio – Referência <i>B. abortus</i>-valor de p&lt;0,001</b>					
<i>B. canis</i>	0,157	0,2281	0,491	-0,2908	0,6048
<i>B. melitensis</i>	0,1652	0,0788	0,036	0,0106	0,3198
<i>B. ovis</i>	0,7301	0,1287	<0,001*	0,4774	0,9828
<i>B. suis</i>	0,7793	0,3802	0,041	0,0329	1,5257
<b>Constante</b>	1,8983	0,1349	<0,001*	1,6335	2,1632

\* Os coeficientes de regressão positiva indicam que a variável possui índices de proteção mais altos do que a variável de referência quando estatisticamente significativa. Coeficientes de regressão negativos indicam o contrário.

\*\* Valores de p estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

\*\*\* O intervalo de confiança indica que sob as mesmas condições experimentais os valores teriam esse intervalo em 95% das vezes.

### 3.8 FONTES DE PUBLICAÇÕES EM VACINOLOGIA DE BRUCELOSE

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos de 117 artigos científicos, que foram agrupados de acordo com o periódico em que foram publicados. Frequências de publicações em diferentes periódicos são detalhadas na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4.** Distribuição dos 117 artigos incluídos neste estudo de acordo com as revistas em que foram publicados.

<b>Revista</b>	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
<i>Vaccine</i>	35	29,91
<i>Infection and Immunity</i>	27	23,07
<i>Molecular Immunology</i>	7	5,98
<i>Clinical and Vaccine Immunology</i>	7	5,98
<i>Plos One</i>	4	3,41
<i>Veterinary Microbiology</i>	4	3,42
<i>Journal of Medical Microbiology</i>	3	2,56
<i>Veterinary Research</i>	2	1,71
<i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i>	2	1,71
<i>Biologicals</i>	2	1,71
<i>FEMS Immunology and Medical Microbiology</i>	2	1,71
<i>Immunobiology</i>	2	1,71
<i>Journal of Veterinary Science</i>	2	1,71
<i>Microbes and Infection</i>	2	1,71
<i>Veterinary Research Communications</i>	2	1,71
<i>APMIS</i>	1	0,85
<i>Archivos de Medicina Veterinária</i>	1	0,85
<i>Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology</i>	1	0,85
<i>DNA and Cell Biology</i>	1	0,85
<i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i>	1	0,85
<i>Frontiers in Microbiology</i>	1	0,85
<i>Genetic Vaccines and Therapy</i>	1	0,85
<i>The Journal of Infection in Developing Countries</i>	1	0,85
<i>Journal of Controlled Release</i>	1	0,85
<i>Journal of Microbiology</i>	1	0,85
<i>Microbiology and Immunology</i>	1	0,85
<i>Research in Veterinary Science</i>	1	0,85
<i>The Journal of Immunology</i>	1	0,85
<i>Veterinary Immunology and Immunopathology</i>	1	0,85
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>100</b>

#### 4. DISCUSSÃO

A brucelose continua sendo uma das doenças zoonóticas mais importantes do mundo, o que justifica o grande número de estudos com o objetivo de desenvolver novas e melhores vacinas (Nicoletti, 1990). Uma meta-análise com base em experimentos de desenvolvimento de vacina contra a brucelose no modelo de camundongo foi realizada neste estudo. Uma análise temporal indica que os índices de proteção permaneceram estáveis ao longo dos últimos 30 anos, o que pode indicar que o conhecimento acumulado nas últimas décadas não é necessariamente traduzido em melhor proteção quando considerado o camundongo como modelo. Outra maneira de interpretar essa descoberta inesperada e perturbadora é que o modelo de camundongo pode ter um alcance limitado de proteção quando se trata de brucelose, o que pode ter resultado em estáveis índices de proteção ao longo do tempo. Conhecimento limitado sobre as respostas imunológicas protetoras de camundongos e espécies hospedeiras naturais de *Brucella* spp. também pode ser um fator que limita o avanço deste campo. Além disso, as estratégias tradicionais de vacinas, particularmente aquelas baseadas no uso de cepas atenuadas (Jiménez et al., 1994; Hamdy et al., 2002; Pasquali et al., 2003) proporcionaram uma melhor proteção quando comparadas a novas estratégias, como subunidade, DNA e vacinas vetorizadas. No caso de vacinas de cepas vivas atenuadas, existe uma clara correlação entre os resultados obtidos no modelo de camundongo e a proteção real na espécie de hospedeiro preferida (Nicoletti, 1990; Blasco, 1997; Deqiu et al., 2002; Schurig et al., 2002). Na verdade, vacinas de cepas, como *B. abortus* S19 e *B. melitensis* Rev.1 são conhecidas por gerar uma resposta imunológica robusta (Schurig et al., 2002; Deqiu et al., 2002), e por induzir níveis significativos de proteção contra *B. abortus* em bovinos e *B. melitensis* em ovinos e caprinos (Nicoletti, 1990; Blasco, 1997; Schurig et al., 2002).

O camundongo é amplamente utilizado como modelo experimental para infecção de *Brucella* spp. (Silva et al., 2011b). Este modelo permite calcular o índice de proteção que se baseia na diferença entre o número

de UFC (em Log) nos baços de controles não vacinados e camundongos vacinados (OIE, 2008). Assim, um índice de proteção superior indica uma melhor proteção obtida por uma determinada vacina experimental. Experimentalmente, o índice de proteção é muito importante para a vacinologia de *Brucella* spp. que contrasta com outros agentes patogênicos que são letais, para os quais a proteção pode ser avaliada pela prevenção da letalidade no modelo de camundongo (Tamura et al., 2010). Importante, a correlação entre o índice de proteção no modelo de camundongo e a proteção na espécie hospedeira preferida não está clara para a maioria das vacinas experimentais recentemente desenvolvidas. Por exemplo, foi desenvolvido recentemente uma cepa candidata vacinal de mutante atenuada de *B. ovis* que não possui um transportador ABC (Silva et al., 2011a), que influencia o sistema de secreção tipo IV codificado por *virB* (Silva et al., 2014), interferindo assim com o tráfego intracelular (Macêdo et al., 2015). Esta cepa vacinal forneceu apenas proteção moderada no modelo de camundongo, produzindo um índice de proteção de aproximadamente 1,0 (Silva et al., 2015a), enquanto que surpreendentemente forneceu uma proteção muito forte contra o desafio experimental em carneiros, evitando a eliminação da cepa selvagem no sêmen e urina, acúmulo de células inflamatórias no sêmen e lesões macroscópicas ou microscópicas induzidas por *B. ovis* de tipo selvagem, resultando em imunidade estéril sob condições experimentais (Silva et al., 2015b). Esta falta de correlação direta entre proteção no camundongo e as espécies hospedeiras preferidas também podem estar relacionadas ao fato de que os índices de proteção variaram de acordo com as espécies de *Brucella* de tipo selvagem usadas no desafio, o que pode indicar que os ótimos níveis de índices de proteção podem variar entre as diferentes espécies de *Brucella*.

Este estudo demonstrou que as cepas de vacinas vivas atenuadas resultam em níveis mais altos de proteção. Considerando que *Brucella* spp. é um agente patogênico intracelular, vacinas atenuadas promovem proteção superior porque a cepa vacinal permanece com o mesmo tecido e o tropismo celular como a cepa de tipo selvagem, imitando assim uma infecção natural (Ficht et al., 2009). Na verdade, *B. abortus* S19 e *B. melitensis* Rev 1 são amplamente utilizadas como cepas de vacinas em todo o mundo. Apesar dessas cepas vacinais gerarem altos níveis de proteção contra a doença, há consideráveis desvantagens, uma vez que ambas têm virulência residual para seus hospedeiros, elas causam infecções e doença em seres humanos, e elas interferem com os ensaios sorológicos de rotina, uma vez que geram uma resposta com anticorpo contra o lipopolissacarídeo liso de *Brucella* (LPS). Além disso, a cepa vacinal Rev 1 é resistente à estreptomicina, um dos antibióticos utilizados para o tratamento da brucelose em pacientes humanos (Schurig et al., 2002; Grillo et al., 2006). Por outro lado, a cepa da vacina *B. abortus* RB51 fornece proteção contra a doença em bovinos (Poester et al., 2006), e tem a vantagem de não interferir com os testes sorológicos padrões, uma vez que esta cepa tem um LPS rugoso (Schurig et al., 1991), mas esta cepa é resistente à rifampicina, que é utilizada para o tratamento da brucelose em pacientes humanos (Schurig et al., 2002). Experimentos com camundongos demonstraram que RB51 protege contra o desafio experimental com várias espécies de *Brucella* spp., incluindo *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. abortus* e *B. suis* (Jiménez de Bagnés et al., 1994). Assim, as cepas de mutantes de *Brucella* transportando um LPS rugoso foram usadas em vários experimentos de vacina (Schurig et al., 2002; Moriyon et al., 2004). No entanto, as cepas mutantes rugosas fornecem os níveis mais baixos de proteção quando comparados às vacinas lisas e atenuadas como Rev 1 (González et al., 2008; Barrio et al., 2009).

A partir do ano 2000, um grande número de experimentos avaliou cepas mutantes atenuadas de *Brucella* como candidatas vacinais. Pelas mesmas razões discutidas sobre cepas atenuadas naturalmente, essas cepas mutantes promovem proteção no modelo de camundongo. Um fator limitante para estas vacinas é o fato de que alguns desses mutantes têm pouca persistência no hospedeiro, que pode não permitir tempo suficiente para a exposição da cepa de vacina ao sistema imunológico, impedindo assim níveis adequados de proteção (Young et al., 1979; Hong et al., 2000; Kahl-McDonagh e Ficht, 2006). No entanto, sistemas de entrega que promovem uma entrega lenta da cepa da vacina podem superar esta limitação (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b). A mutagênese nesses casos geralmente visa genes que são necessários para a virulência ou a sobrevivência no hospedeiro (Allen et al., 1998; Hong et al., 2000; Ficht, 2002; Li et al., 2015). Mutantes cujos genes excluídos são necessários durante os estágios iniciais de infecção são rapidamente eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro (Hong et al., 2000), e por isso, eles tendem a gerar imunidade protetora insuficiente (Edmonds et al., 2000; Fiorentino et al., 2008). Há um grande interesse na geração de cepas mutantes que carregam um LPS rugoso, como RB51, uma vez que

estas cepas não interferem com os métodos de diagnóstico sorológicos mais utilizados (Schurig et al., 2002; Monreal et al., 2003). No entanto, cepas rugosas tendem a ser rapidamente eliminadas do hospedeiro, o que resulta em níveis mais baixos de proteção (Monreal et al., 2003).

Este estudo demonstrou que, em geral, as vacinas de subunidades proporcionam menores níveis de proteção, o que pode ser devido às limitações para identificar os antígenos mais protetores, mas é razoável hipotetizar que um único antígeno pode não ser suficiente para desencadear uma forte resposta imunológica protetora contra *Brucella* spp. (Titball, 2008; Plotkin, 2010; Gomez et al., 2013).

Neste estudo, alguns parâmetros afetaram a proteção contra o desafio experimental no modelo de camundongo. BALB/c é a linhagem de camundongo mais utilizada para experimentos de vacina de *Brucella* (Todd et al., 2013). Importaneamente, os índices de proteção são influenciados pela linhagem de camundongo. De fato, embora C57BL/6 e camundongos Swiss forneçam índices de proteção semelhantes aos de BALB/c, outras linhagens, que incluíam cepas *knockout* para genes relacionados a resposta imune, proporcionaram menores índices de proteção. Com a exceção da via intramuscular de vacinação, todas as outras vias tiveram níveis de proteção semelhantes, incluindo a via subcutânea que é uma das vias preferenciais para fins práticos. A eficácia da via subcutânea de vacinação está de acordo com estudos anteriores (Todd et al., 2013). Outro parâmetro que pode influenciar a proteção, particularmente no caso de vacinas de subunidades ou de DNA, é o número de vacinação, sendo que duas vacinações que proporcionam melhores resultados do que a única vacinação.

Este estudo associou estatística descritiva com uma análise de meta-regressão, que é uma poderosa ferramenta para o avanço da pesquisa em saúde animal (Lean et al., 2009). Um estudo anterior de meta-análise sobre vacinação de *Brucella* identificou fatores que podem influenciar os resultados experimentais em experimentos que avaliam formulações de vacinas de organismo inteiro (Todd et al., 2013). Este estudo foi mais inclusivo, cobrindo a maior parte das pesquisas relevantes realizadas em vacina de *Brucella* usando o modelo de camundongo nas últimas três décadas. A identificação de variáveis que influenciam significativamente os índices de proteção no modelo de camundongo indica claramente que a padronização de protocolos experimentais é necessária urgentemente para gerar dados mais reprodutíveis e com maior previsão para o desempenho da vacina na espécie hospedeira preferencial. Comparando com um estudo anterior de meta-análise, que foi restrito a vacinas de organismos inteiros (Todd et al., 2013), encontramos variáveis que são igualmente significativas para outros tipos de vacinas. Por exemplo, categoria de vacina, linhagem de camundongo, via de vacinação, cepa do patógeno de desafio, via de desafio e intervalo entre desafio e eutanásia, influenciando a proteção no estudo anterior (Todd et al., 2013), bem como nessa mais abrangente meta-análise. Portanto, este estudo amplia o conhecimento anteriormente adquirido com meta-análise sobre vacinologia de *Brucella* (Todd et al., 2013).

Um aspecto crítico do modelo de camundongo para o desenvolvimento de vacina de *Brucella* é a falta de padronização das condições experimentais, que foi previamente revisada (Grilló et al., 2012). Embora o camundongo seja um modelo bem estabelecido para a infecção por *Brucella* e vacinologia (Silva et al., 2011b; Grilló et al., 2012), e apesar de recomendações muito específicas da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o uso de camundongo como modelo para prever o potencial papel protetor contra a brucelose em ruminantes (OIE, 2008), existe uma ampla variedade de parâmetros em protocolos experimentais, incluindo sexo, idade e linhagem de camundongos, via de vacinação e de desafio, tempo decorrido entre a vacinação e desafio e/ou entre desafio e avaliação de cargas bacterianas esplênicas, entre outros. Esse fato faz comparações entre estudos e laboratórios muito pouco confiáveis.

As potenciais limitações deste estudo podem estar associadas a restrições da base de dados originais, embora a PubMed cubra a grande maioria dos trabalhos relevantes sobre o campo de vacinologia experimental de *Brucella*. A ausência de publicação de resultados negativos também pode ter influenciado o resultado deste estudo, embora se espere níveis semelhantes de resultados negativos entre diferentes categorias de vacinas experimentais.

## **5. CONCLUSÕES**

A importância da brucelose como uma ameaça para a saúde humana, bem como devido a perdas econômicas para a indústria animal (Pappas, 2010; Santos et al., 2013), justifica-se o enorme esforço científico para desenvolver melhores vacinas que não possuem potencial patogênico residual para animais e seres humanos (Olsen, 2013). Contudo, apesar do grande número de publicações nos últimos 30 anos, nossos resultados indicam que não existe uma tendência clara para melhorar o potencial de proteção dessas vacinas experimentais, o que pode, pelo menos em parte, explicar por que nenhuma dessas novas formulações ou estratégias de vacinas tenha chegado ao mercado.

## CAPÍTULO III

### Meta-análise em vacinologia de brucelose em hospedeiros naturais

#### 1. INTRODUÇÃO

Estudos com vacinas experimentais contra brucelose em bovinos, caprinos e ovinos com abordagens alternativas em vacinologia tem sido realizados nos últimos anos, incluindo vacinas de subunidades (Wyckoff III et al., 2005; Estein et al., 2009), vacinas de cepas mutantes (Kahl-McDonagh et al., 2006; Jacques et al. 2007; Fiorentino et al., 2008; Silva et al., 2015b) e vacinas utilizando vetores como vírus da gripe H1N1 (Tabynov et al., 2014).

Apesar de brucelose acometer pequenos ruminantes e grandes animais, usualmente utiliza-se como modelo animal para estudo preliminar de proteção vacinal o camundongo. Realizamos um amplo estudo com vacinas de *Brucella* no modelo murino nos últimos 30 anos avaliando o índice de proteção, medida de proteção que demonstrou ser influenciada por algumas variáveis experimentais, como linhagem de camundongo, número de vacinação e via de imunização. Considerando o camundongo como modelo, as vacinas de brucelose têm alcançado índices de proteção insatisfatórios. Entretanto, a correlação entre a proteção no camundongo e espécie hospedeira natural carece de maiores estudos (Carvalho et al., 2016). Isto foi demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo com candidata de vacina mutante atenuada de *B. ovis* encapsulada, que não possui um transportador ABC (Silva et al., 2011a), esta cepa demonstrou no camundongo proteção moderada (índice de proteção de aproximadamente 1) (Silva et al., 2015a), por outro lado, no carneiro, produziu imunidade estéril, prevenindo a eliminação da cepa de *B. ovis* selvagem na urina e sêmen e desenvolvimento de alterações patológicas macro e microscópicas (Silva et al., 2015b). Nos hospedeiros naturais, o índice de proteção é comumente avaliado considerando a eficácia em prevenir abortos. Considerando as limitações com o trabalho experimental utilizando pequenos e grandes ruminantes, tornam assim nossos conhecimentos limitados em relação à proteção vacinal em diversos hospedeiros naturais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a proteção conferida por diversos tipos de vacinas de brucelose em hospedeiros naturais.

#### 2. MATERIAL E MÉTODOS

##### 2.1 EXTRAÇÃO DE DADOS DA LITERATURA

Os dados foram obtidos de publicações indexadas no Pubmed e Scopus até 25 de maio de 2017. Resumidamente, a pesquisa foi feita usando a seguinte combinação de termos: “*Brucella*” e “vaccine”. As publicações foram desambiguadas manualmente, permanecendo apenas publicações que avaliavam a proteção vacinal nos hospedeiros naturais após desafio com cepas patogênicas de *Brucella*. A inclusão de um artigo foi baseada no fornecimento do número de animais (imunizados e não imunizados) e do número de animais protegidos para cada grupo, que permitisse calcular a diferença de risco. Todos os artigos incluídos nesse estudo foram publicados em inglês.

A meta-análise foi realizada seguindo os critérios do PRISMA (do inglês *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses criteria*), conforme detalhado em <http://www.prisma-statement.org/>. Os dados foram obtidos de cada grupo experimental individual em uma determinada publicação. O agrupamento dos dados foi realizado de acordo com a categoria de vacina experimental testada, sendo: (i) cepas vivas atenuadas; (ii) cepas mutantes atenuadas; (iii) vacinas de subunidades recombinantes; (iv) vacinas vetorizadas; e (v) e inativadas. Foram considerados para nossa análise outros parâmetros obtidos de cada experimento individual que incluía: ano de publicação; espécie animal; número de animais imunizados e protegidos; número de animais não imunizados e protegidos; variáveis relacionadas à imunização (via, número de imunização e adjuvante) e variáveis relacionadas ao desafio (via e espécie de *Brucella*).

O valor de proteção de diferentes pesquisas, incluindo fêmeas e machos, foi obtido baseado na prevenção de abortos ou capacidade de prevenir infecção em órgãos em animais imunizados ou não imunizados obtidos em cada experimento individual.

## 2.2 TRANSFORMAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE DE META-REGRESSÃO

As variáveis extraídas dos artigos, incluindo categoria de vacina, hospedeiro animal, uso de adjuvante, espécie de *Brucella* de desafio e via de desafio foram selecionadas para testar qual variável influencia o valor de diferença de risco. Os dados coletados dos artigos foram transformados para dados qualitativos, que variaram de 0 a 5. Assim, foram atribuídos valores as variáveis: categoria de vacina (“0” atenuada, “1” mutante, “2” subunidade, “3” vetor e “4” inativada), hospedeiro (“0” bovinos, “1” bisões, “2” ovinos, “3” caprinos, “4” cervídeos e “5” búfalos), uso de adjuvante (“1” não, “2” sim), espécie de desafio (“0” *B. abortus*, “1” *B. melitensis* e “2” *B. ovis*) e via de desafio (“0” conjuntival, “1” conjuntival e intraprepucial, “2” subcutânea e “3” intravenosa).

Existiam diferentes arranjos das vias de vacinação, o que prejudicaria sua análise como variável categórica, assim, as variáveis relacionadas as vias de vacinação foram dicotomizadas (sim ou não) para cada tipo de via.

O índice de animais protegidos obtidos dos grupos experimentais imunizados e não imunizados, foram obtidos em cada artigo, foram denominados como “protegido vacina” e “protegido controle”, respectivamente. O valor de risco foi estimado baseado no número de protegidos dividido pelo número total de animais de cada grupo experimental. Foi calculada a diferença de risco, que resultou da subtração do valor de risco do grupo imunizado do valor de risco do grupo controle, para cada experimento incluído neste estudo. O valor de diferença de risco varia entre -1 e 1. Assim, o cálculo de diferença de risco é baseado na seguinte fórmula:

Diferença de Risco (DF) = (número de animais protegidos imunizados/total de animais imunizados) - número de animais protegidos não imunizados/total de animais não imunizados)

Foi realizada uma análise de regressão linear utilizando o ano de publicação e a variável diferença de risco. Além disso, pode-se avaliar a influência de cada parâmetro (categoria de vacina, espécie animal, variáveis relacionadas a imunização e desafio) no valor de risco.

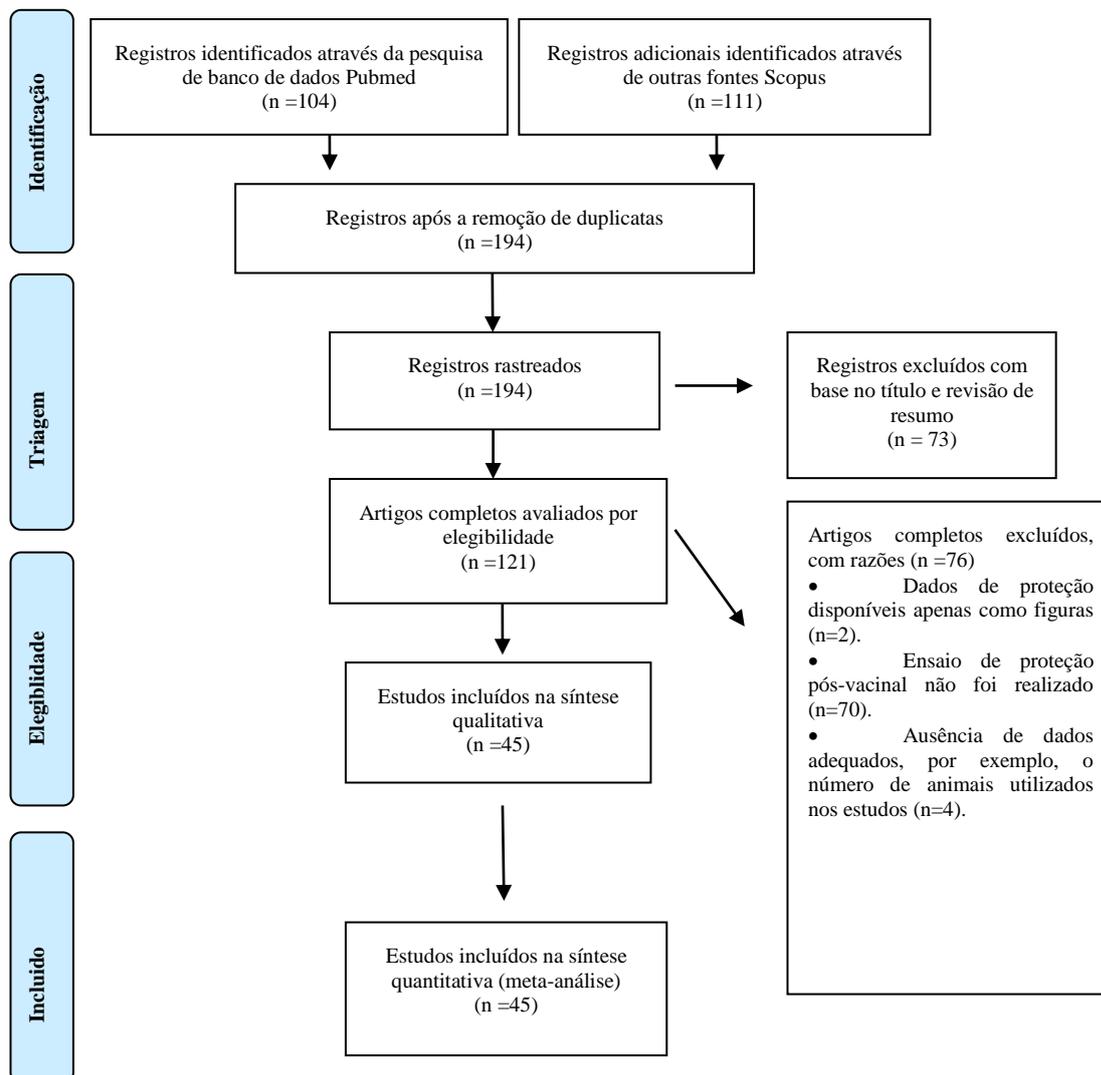
## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise de meta-regressão bivariada, utilizou-se como variável dependente a categoria de vacinas que controlava o efeito das variáveis independentes, consistindo de hospedeiros experimentais, via de vacinação, uso de adjuvante, número de vacinações, via de desafio e espécies de *Brucella* usadas para desafio. A seleção de variáveis para a análise de meta-regressão multivariada baseou-se em ter o valor de p menor que 0,05 na meta-regressão bivariada. O programa estatístico utilizado foi o Stata (Statacorp, Texas, EUA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo incluiu 45 artigos (Anexos III e IV) com 116 experimentos individuais. A pesquisa de literatura e os critérios utilizados para a inclusão estão demonstrados na Figura 3.1. Os 45 artigos oriundos das plataformas Pubmed e Scopus atenderam aos critérios estabelecidos.

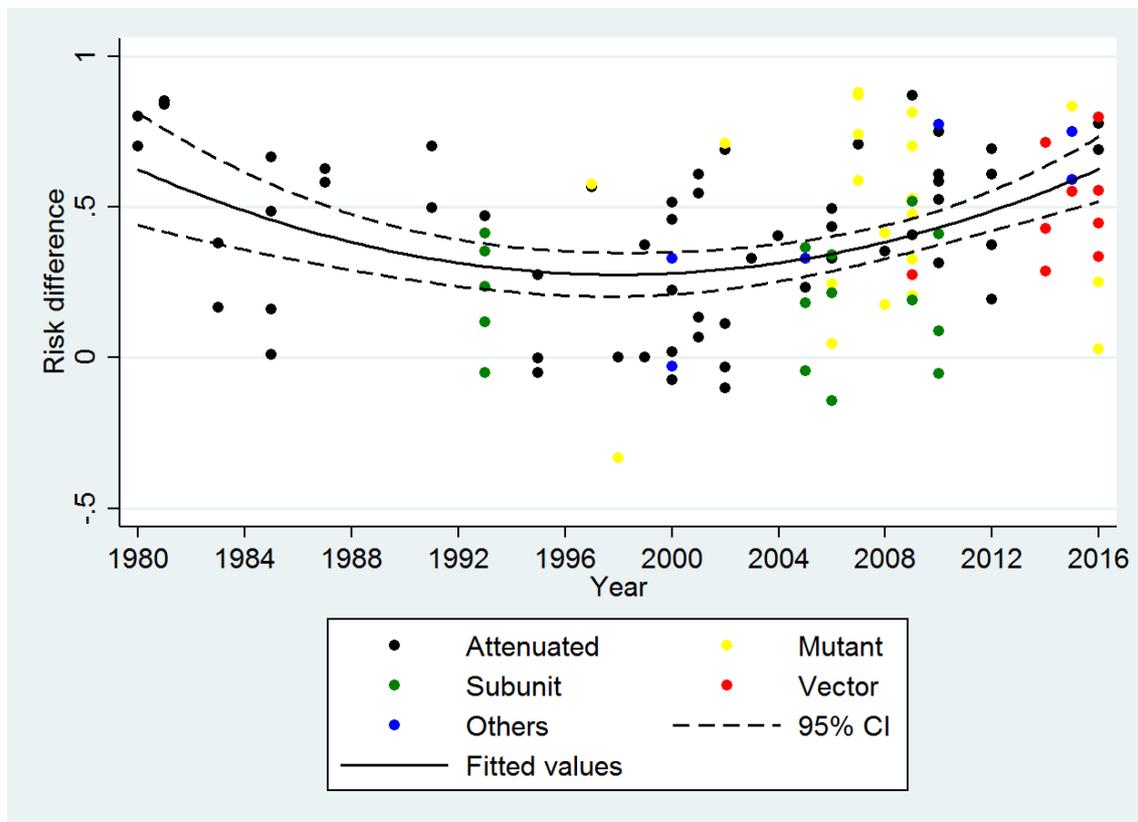


**Figura 3.1.** Fluxograma que descreve a seleção de artigos das plataformas PubMed e Scopus para inclusão neste estudo de meta-análise, seguindo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses criteria*.

### 3.2 PROTEÇÃO VACINAL NOS HOSPEDEIROS NATURAIS NAS ÚLTIMAS DÉCADAS

Foi realizada uma análise de correlação entre o ano do estudo experimental e o índice de diferença de risco. Esta análise demonstrou que não houve melhoria na proteção (diferença de risco) dos diferentes tipos de vacinas experimentais durante os trinta e seis anos estudados, com valor de p não significativo (Figura 3.2).

Além disso, foi observado na análise de regressão linear (Figura 3.2) que existia um processo mais declinante de proteção no período de 1980 a 2000, por outro lado, a diferença de risco conferida por diferentes vacinas demonstrava um perfil mais crescente no período de 2000 a 2016. Assim, devido a esses dois comportamentos diferentes no período estudado, as análises estatísticas foram fracionadas em dois períodos (1980 a 2000 e 2000 a 2016). Inicialmente avaliando os experimentos realizados no período de 1990 a 2000 e posteriormente os experimentos correspondentes ao período 2000 a 2016.



**Figura 3.2.** Análise de regressão linear correlacionando os tipos de vacinas experimentais (atenuada, mutante, subunidade, vetor e inativada) com o ano de publicação de cada experimento, em diferentes hospedeiros animais. O estudo com 116 experimentos individuais, constituído de vacinas atenuadas (n=62), com cepas mutantes (n=23), subunidades (n=17), vetorizadas (n=9) e cepas inativadas (n=5) ( $r = 34,31$ ;  $r^2 = 11,77$ ;  $p = 0,159$ ).

### 3.3 ESTUDO DE META-ANÁLISE

A análise de meta-regressão bivariada foi realizada tendo cada variável controlada pela variável categoria de vacinas. As variáveis dependentes foram hospedeiro, via de vacinação, uso de adjuvante, espécie de desafio e via de desafio. No período de 1990 a 2000, considerando as vacinas com cepas atenuadas como a referência, com diferença de risco de 0,4349, as vacinas de subunidades foram significativamente menos protetoras, com valor de diferença de risco de 0,0258 ( $p < 0,05$ ), enquanto que, os valores de diferença de risco proporcionado pelas vacinas de cepas mutantes e inativadas (0,3673 e 0,2401 respectivamente) foram estatisticamente equivalentes ao obtido por cepas naturalmente atenuadas (Tabela 3.1). A análise de meta-regressão das vias de desafio, considerando a via de desafio conjuntival como referência, com diferença de risco de 0,5770, apresentou diferença de risco significativamente maior que via subcutânea, que obteve uma diferença de risco igual a zero (Tabela 3.1).

Proteção proporcionada por duas imunizações (0,5613) foi semelhante a uma única imunização (0,4533) (Tabela 3.1). Não foram observadas diferenças significativas entre os hospedeiros bisões, ovinos, caprinos, cervídeos e bovinos (Tabela 3.1). Desafios com as espécies *B. melitensis* e *B. ovis* com diferença de risco de 0,2246 e 0,6269, respectivamente, foram semelhantes a *B. abortus*.

**Tabela 3.1.** Análise de meta-regressão bivariada de variáveis que influenciam a diferença de risco das vacinas experimentais de brucelose, nos anos de 1990 a 2000.

Variável	Coeficiente	Valor de p	Intervalo de confiança***	
			Limite inferior	Limite superior
<b>Categoria de vacina – Referência atenuada– valor de p&lt;0,001</b>				
Mutante	-0,3673	0,912	-0,7119	0,6384
Subunidade	-0,4091	0,044*	-0,8056	-0,0126
Inativada	-0,2401	0,411	-0,8273	0,3471
<b>Constante</b>	0,4349	<0,001	0,2619	0,6079
<b>Via de vacinação</b>				
Subcutânea	0,1478	0,525	-0,3204	0,6160
<b>Constante</b>	0,3311	0,139	-0,1133	0,7755
Intramuscular	-0,1846	0,636	-0,9701	0,6008
<b>Constante</b>	0,4703	<0,001	0,3278	0,6129
<b>Número de vacinações – Referência única vacinação–valor de p&lt;0,001</b>				
Duas	0,1080	0,640	-0,3571	0,5732
<b>Constante</b>	0,4533	<0,001	0,3055	0,6011
<b>Hospedeiro – Referência Bovino-valor de p&lt;0,001</b>				
Bisão	0,2309	0,405	-0,3278	0,7897
Ovino	0,1292	0,427	-0,1983	0,4569
Caprino	-0,0513	0,860	-0,6413	0,5386
Cervídeo	-0,1287	0,750	-0,9457	0,6884
<b>Constante</b>	0,4143	<0,001	0,2133	0,6154
<b>Espécies de desafio – Referência <i>Brucella abortus</i>-valor de p&lt;0,001</b>				
<i>B. melitensis</i>	-0,2103	0,346	-0,6585	0,2379
<i>B. ovis</i>	0,1920	0,221	-0,1217	0,5058
<b>Constante</b>	0,4349	<0,001	0,2619	0,6079
<b>Via de desafio – Referência conjuntiva-valor de p&lt;0,001</b>				
Conjuntiva e intraprepucial	-0,3174	0,101	-0,7007	0,0659
Subcutânea	-0,6162	0,007*	-1,053	-0,1794
Intravenosa	-0,5769	0,058	-1,1738	0,0199
<b>Constante</b>	0,5770	<0,001	0,4380	0,7158

\* Os coeficientes de regressão positiva indicam que a variável possui índices de proteção mais altos do que a variável de referência quando estatisticamente significativa. Os coeficientes de regressão negativos indicam o oposto.

\*\* Valores de p estatisticamente significativos (p<0,05).

\*\*\* O intervalo de confiança indica que nas mesmas condições experimentais, os valores teriam esse intervalo em 95% das vezes.

Já na análise bivariada no período de 2000 a 2016 (Tabela 3.2), as cepas de vacinas naturalmente atenuadas com valor de diferença de risco de 0,6320, foram significativamente melhores que as vacinas de subunidades, com valor de 0,169 (p<0,001). O valor de diferença de risco para as vacinas de cepas inativadas (1,005) foi significativamente maior do que o proporcionado por vacinas naturalmente atenuadas (p<0,05) (Tabela 3.2).

A avaliação do hospedeiro animal considerando o bovino como o hospedeiro referência, com valor de diferença de risco de 0,6320, foi semelhante aos hospedeiros bisões, ovinos, caprinos e búfalos (p<0,001). Por outro lado, os cervídeos tiveram o valor de diferença de risco menor (0,0701) comparado aos bovinos (p<0,0001) (Tabela 3.2).

As vias de vacinações avaliadas de forma dicotomizadas, demonstraram que a vias intramuscular e oral são protetivas significativamente (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2.** Análise de meta-regressão bivariada de variáveis que influenciam os índices de proteção das vacinas experimentais de brucelose, nos anos de 2000 a 2016.

Variável	Coeficiente	Valor de p	Intervalo de confiança***	
			Límite inferior	Límite superior
<b>Categoria de vacina – Referência atenuada – valor de p&lt;0,001</b>				
Mutante	0,0076	0,922	-0,1481	0,1634
Subunidade	-0,4630	<0,001**	-0,6678	-0,2583
Vetor	0,0616	0,588	-0,1645	0,2878
Inativada	0,3733	0,029*	0,0390	0,7076
<b>Constante</b>	0,6320	<0,001	0,4714	0,7927
<b>Hospedeiro – Referência Bovino – valor de p&lt;0,001</b>				
Bisão	-0,1324	0,314	-0,3927	0,1278
Ovino	0,6390	0,474	-0,1131	0,2409
Caprino	0,0017	0,989	-0,2452	0,2487
Cervídeo	-0,5619	0,001*	-0,8286	-0,2951
Búfalos	0,2909	0,148	-0,1058	0,6876
<b>Constante</b>	0,6320	<0,001	0,4714	0,7927
<b>Via de vacinação</b>				
Subcutânea	0,0995	0,224	-0,0623	0,2614
<b>Constante</b>	0,5281	<0,001	0,3699	0,6862
Conjuntival	0,2011	0,054	-0,0039	0,4060
<b>Constante</b>	0,5732	<0,001	0,4618	0,6847
Intramuscular	-0,2916	0,009*	-0,5095	-0,0737
<b>Constante</b>	0,6488	<0,001	0,5373	0,7603
Oral	-0,5136	0,025*	-0,9618	-0,0654
<b>Constante</b>	0,5994		0,4929	0,7059
Intradérmica	0,0022	0,995	-0,7494	0,7538
<b>Constante</b>	0,5978	<0,001	0,4870	0,7086
<b>Número de vacinações – Referência única vacinação – valor de p&lt;0,001</b>				
Duas	-0,1310	0,293	-0,3775	0,1155
Três	0,2132	0,410	-0,2995	0,7259
<b>Constante</b>	0,6097	<0,001	0,4980	0,7215
<b>Adjuvante – Referência sem adjuvante – valor de p&lt;0,001</b>				
Uso de adjuvante	0,0818	0,562	-0,1983	0,3618
<b>Constante</b>	0,5978	<0,001	0,4871	0,7086
<b>Espécies de desafio – Referência <i>Brucella abortus</i> – valor de p&lt;0,001</b>				
<i>B. melitensis</i>	0,1808	0,039*	0,0091	0,3527
<i>B. ovis</i>	0,2072	0,055	-0,0043	0,4188
<b>Constante</b>	0,4969	<0,001	0,3592	0,6346
<b>Via de desafio – Referência conjuntival – valor de p&lt;0,001</b>				
Conjuntival e intraperiucial	0,1274	0,199	-0,0688	0,3235
Subcutânea	0,3602	0,010*	0,0893	0,6312
<b>Constante</b>	0,5298	<0,001	0,4094	0,6501

\* Os coeficientes de regressão positiva indicam que a variável possui índices de proteção mais altos do que a variável de referência quando estatisticamente significativa. Os coeficientes de regressão negativos indicam o oposto.

\*\* Valores de p estatisticamente significativos (p<0,05).

\*\*\* O intervalo de confiança indica que nas mesmas condições experimentais, os valores teriam esse intervalo em 95% das vezes.

Duas ou três vacinações com valores de diferença de risco de 0,4787 e 0,3965 respectivamente, foram semelhantes a proteção com uma única imunização (Tabela 3.2). O uso de adjuvante não resultou em diferença significativa de proteção entre a não utilização (Tabela 3.2).

Considerando a espécie de desafio *B. abortus* como a referência com diferença de risco de 0,4969, as cepas *B. melitensis* e *B. ovis* com valores de diferença de risco de 0,6777 e 0,7041, respectivamente, proporcionaram maiores valores de diferença de risco ( $p < 0,05$ ).

A via de desafio subcutânea resultou em maior valor de diferença de risco, sendo 0,89 significativamente maior quando comparado a via conjuntival como referência com diferença de risco de 0,5298 ( $p = 0,01$ ).

### 3.4 META-REGRESSÃO MULTIVARIADA

A análise de meta-regressão bivariada foi utilizada para selecionar as variáveis que seriam incluídas neste modelo de meta-regressão multivariada. Assim, este modelo de meta-regressão multivariada correspondente o período de 2000 a 2016, período que apresentou maior número de variáveis significativas, incluiu as categorias de vacinas naturalmente atenuadas, cepas mutantes, subunidades, vetorizadas e cepas inativadas, considerando o valor de diferença de risco como a variável dependente e as demais variáveis (via de vacinação e via de desafio) como independentes (Tabela 3.3).

As vacinas de subunidades proporcionaram menor proteção do que as vacinas naturalmente atenuadas, que foi considerada a categoria de vacina referência ( $p = 0,002$ ). Por outro lado, as vacinas com cepas inativadas resultaram proteção significativamente melhor quando comparada a referência ( $p = 0,007$ ).

Em relação a via de vacinação usada nos experimentos, as vias intramuscular e oral proporcionaram menor proteção comparada a via subcutânea ( $p < 0,05$ ).

As vacinas experimentais proporcionaram maior proteção quando o desafio foi realizado pela via subcutânea ( $p = 0,016$ ) comparada a via conjuntival de referência.

**Tabela 3.3.** Análise multivariada de meta-regressão de variáveis que influenciam o valor de diferença de risco de vacinas experimentais de brucelose em hospedeiros naturais, no período de 2000 a 2016.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor de p***	Intervalo de confiança	
				Limite inferior	Limite superior
<b>Categoria de vacina - Referência atenuada-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>					
Mutante	0,0839	0,0905	0,357	-0,0968	0,2646
Subunidade	-0,3979	0,1206	0,002*	-0,6387	-0,1572
Vetor	-0,1885	0,1446	0,197	-0,4772	0,1001
Inativada	0,4742	0,1714	0,007*	0,1319	0,8164
<b>Via de vacinação – Referência subcutânea-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>					
Intramuscular	-0,2232	0,1064	0,040*	-0,4356	-0,0106
Oral	-0,4547	0,2138	0,037*	-0,8817	-0,0277
<b>Via de desafio – Referência Conjuntival-valor de <math>p &lt; 0,001</math></b>					
Conjuntival e intraprepucial	0,0666	0,093	0,477	-0,1191	0,2524
Subcutânea	0,3139	0,1274	0,016*	0,0595	0,5682
<b>Constante</b>	<b>0,5861</b>	<b>0,0607</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,4650</b>	<b>0,7073</b>

\* Os coeficientes de regressão positiva indicam que a variável possui índices de proteção mais altos do que a variável de referência quando estatisticamente significativa. Coeficientes de regressão negativos indicam o contrário.

\*\* Valores de p estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

\*\*\* O intervalo de confiança indica que sob as mesmas condições experimentais os valores teriam esse intervalo em 95% das vezes.

#### 4. DISCUSSÃO

Brucelose é uma importante doença infecciosa para o homem e animais domésticos, e sua incidência no homem está fortemente relacionada com a prevalência nos hospedeiros animais, por se tratar de uma doença essencialmente zoonótica (Gomez et al., 2013). A vacinação é uma forma de controle da brucelose em reservatórios animais, mas não é capaz de erradicar a doença (; Corbel, 2006; Grégoire et al., 2012), assim, cientistas de todo o mundo tem buscado desenvolver vacinas mais seguras e eficazes contra *Brucella* (Saez et al., 2012; Paul et al., 2018; Curina et al., 2018). Neste trabalho, avaliamos uma série de experimentos, por meio de meta-análise, objetivando comparar a eficácia de vacinas experimentais de brucelose e algumas comerciais, como *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e *B. melitensis* Rev.1, nos hospedeiros naturais. Os resultados de regressão linear desse estudo, baseada na análise de correlação entre o ano de publicação dos trabalhos e o valor de diferença de risco, indicaram que a proteção proporcionada por vacinas experimentais em diversas espécies de hospedeiros alvos contra infecção por *Brucella* tem se mantido estável por quase quatro décadas. Os dados dessa recente meta-análise demonstraram similaridade com o estudo anterior de análise temporal no modelo camundongo que evidenciou índices de proteção estáveis nos últimos trinta anos (Carvalho et al., 2016). Demonstramos assim que é necessário haver vacinas que elevem a eficácia protetora contra a infecção por *Brucella*, tanto para o camundongo, como nos diversos hospedeiros naturais, pois o sucesso de qualquer programa de vacinação depende da utilização de vacinas de alta eficácia, que seja capaz de reduzir o número de indivíduos susceptíveis a doença, e, além disso, que não cause os efeitos adversos relatados, como aborto e artropatias nos animais (Dorneles et al., 2015; Xie et al., 2018).

Para nosso melhor conhecimento, esse estudo representa a primeira meta-análise de vacinas de brucelose em diferentes espécies animais alvos da doença. Anteriormente, realizamos um estudo similar no modelo camundongo, que abrangeu um maior número de experimentos (Carvalho et al., 2016), o que se justifica devido o camundongo ser um modelo amplamente utilizado para o estudo de patogênese, resposta imune e proteção vacinal do hospedeiro (Silva et al., 2011b; Baldwin e Parent, 2002), além de ser um animal pequeno e custo menor (Perkins et al., 2010). Entretanto, apesar do amplo investimento em pesquisas avaliando o índice de proteção vacinal em camundongos, não existe uma clareza na correlação entre a proteção no camundongo e espécies animais hospedeiras naturais de *Brucella*, pois o sistema imunológico do camundongo não representa com precisão a resposta imune protetora dos hospedeiros alvos da doença (Dorneles et al., 2015). Sabe-se ainda que a resposta protetiva é mais significativa nos hospedeiros naturais, porém, as avaliações experimentais em vacas gestantes são caras e requerem instalações de nível de biossegurança 3 (Dorneles et al., 2015). Em bovinos, os testes em condições experimentais são capazes de aferir a eficácia de vacinas contra *B. abortus* (Olsen et al., 1999; Poester et al., 2006), porém, as avaliações em hospedeiros naturais podem sofrer maior influência de fatores, como nutrição, estado imunológico, idade animal da vacinação, estresse ambiental ou manejo de vacinação (Olsen et al., 2015).

Nosso estudo demonstrou que as vacinas de cepas inativadas foram significativamente mais protetivas contra infecção por *Brucella* do que as cepas vivas naturalmente atenuadas. Embora termos demonstrados que vacinas de cepas inativadas protejam mais, atualmente as vacinas comerciais utilizadas consistem de cepas vivas atenuadas, como *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e *B. melitensis* Rev.1 (Cheville et al., 1993; Olsen e Stoffregen, 2005; Corbel, 2006), sendo amplamente utilizadas por proporcionarem boa proteção e imunidade duradoura, relacionado com sua capacidade de estimular resposta imune celular (Seder e Hill, 2000; Levitz e Golenbock, 2012; Titball, 2008). A imunidade mediada por células tem papel importante na defesa e eliminação da infecção por *Brucella* do hospedeiro (Baldwin e Goenka, 2006). Entretanto, o uso de vacinas de cepas atenuadas em seres humanos é desaconselhável, por apresentarem virulência residual (Waag et al., 2002; Rockx-Brouwer et al., 2012).

Nossos dados demonstram que as vacinas inativadas têm proteção eficaz, são capazes de reduzir a incidência da infecção nos tecidos fetais e maternos, além de prevenir o aborto em fêmeas gestantes. Olsen e colaboradores (2015) demonstraram em bisões que a eficácia de vacina de cepas inativada de *Brucella* foi superior ao se realizar duas imunizações com intervalo de um ano, obtendo considerada redução do número de abortos, comparada aos animais não imunizados ou imunizados com uma única

dose. O resultado de maior proteção conferido pelas vacinas com cepas inativadas é interessante e quebra um dogma da vacinologia atual que preconiza para controle e erradicação da brucelose a utilização de vacinas com cepas atenuadas, que apesar de proporcionarem boa proteção, causam algumas desvantagens nos animais, como o aborto em fêmeas gestantes, interfere nos testes sorológicos, além disso, a vacina Rev.1 utilizada para prevenção de infecção de *B. melitensis* em caprinos e ovinos seu uso não é permitido em países livres de *B. melitensis*, incluindo o Brasil (Cheville et al., 1992; Schurig et al., 2002; Vemulapalli et al., 2002; Dorneles et al., 2015). Por outro lado, vacinas inativadas possuem características bastante desejáveis para uma vacina ideal, são incapazes de causar a doença e infecção persistente nos animais imunizados, proporcionam proteção e previnem o aborto (Schurig et al., 1995; Ko e Splitter, 2003). Uma vacina é considerada efetiva quando é capaz de prevenir a infecção e desenvolvimento da doença clínica, ou minimizar a infecção nos animais vacinados (Grilló et al., 2009). Desta forma, a medida de diferença de risco, avalia a proteção vacinal por meio da redução das taxas de abortos e nascimento de bezerros fracos, e diminuição da colonização bacteriana em órgãos de animais vacinados comparados com controles após infecção com cepas virulentas de *Brucella* (Elzer et al., 1998; Nol et al., 2016).

Neste estudo demonstramos que as vacinas de subunidades protegem menos do que as vacinas de cepas atenuadas naturalmente. É desafiador o desenvolvimento de vacinas de subunidades realmente protetoras, envolvendo a dificuldade na identificação de antígenos funcionais, imunogênicos e protetores e a improvável proteção depender de um único antígeno (Titball, 2008; Plotkin, 2010; Yang et al., 2013). Vacinas de subunidades também demonstraram proteção inferior as vacinas atenuadas e inativadas no camundongo (Carvalho et al., 2016), apesar de estudos isolados apresentarem resultados promissores neste modelo com vacinas de subunidades, podem não correlacionar com a obtida nos hospedeiros naturais (Dorneles et al., 2015).

As vias de vacinação e de desafio demonstraram influenciar na proteção em hospedeiros naturais. Nossos resultados demonstraram que a via subcutânea influencia em maior proteção quando utilizada na vacinação e desafio experimentais, concordando com estudos anteriores que haviam demonstrado que para imunização, esta via era significativamente importante nos índices de proteção (Marin et al., 1990; Todd et al., 2013; Carvalho et al., 2016). Além disso, sabe-se que a via de vacinação subcutânea é a mais comum rota de vacinação adotada para vacinas licenciadas S19, RB51 e Rev.1 (Beckett e MacDiarmid, 1985; Xie et al., 2018) e a administração dessas vacinas por essa via, proporcionam baixas taxas de aborto nos animais imunizados, por outro lado, a via conjuntival de vacinação foi relacionada com altos índices de abortos (Xie et al., 2018).

## 5. CONCLUSÃO

Como avaliado no presente estudo, apesar do surgimento de novas tecnologias empregadas na vacinologia moderna para brucelose, ainda são necessários mais estudos, pois as vacinas experimentais testadas nos hospedeiros naturais têm proporcionado níveis de proteção estáveis nas últimas décadas. Além disso, é importante considerar que, as vacinas de cepas inativadas demonstraram melhor proteção comparada as vacinas de cepas atenuadas, o que é extremamente interessante, pois os esforços atuais estão focados no desenvolvimento de vacinas de cepas de *Brucella* geneticamente modificadas, subunidades, vetores e DNA, enquanto que as vacinas inativadas são pobremente exploradas.

## CAPÍTULO IV

### Eficácia de cepa vacinal de *BRUCELLA OVIS* mutante $\Delta abcBA$ expressando proteína quimérica recombinante na proteção polivalente contra brucelose no modelo murino

#### 1. INTRODUÇÃO

*Brucella* é uma bactéria intracelular, Gram-negativa e causadora de uma doença zoonótica conhecida por brucelose (Corbel, 1997), que é caracterizada por abortos em animais de produção e importantes perdas econômicas (Santos et al., 2013). Assim, a vacinação de animais susceptíveis é importante para o controle dessa infecção. O gênero *Brucella* inclui mais de dez espécies, sendo que *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* tem potencial zoonótico (He, 2012). A fase crônica de brucelose humana pode estar associada com doença osteoarticular, meningite, hepatite, espondilites, neurobrucelose e endocardite (de Figueiredo et al., 2015; Yin et al., 2016; Pendela et al., 2017).

O controle de brucelose em animais é usualmente feito realizando a administração de cepas vivas atenuadas na vacinação. Para bovinos, tem se vacinado com *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51, enquanto que para pequenos ruminantes a vacina *B. melitensis* Rev. 1 (Schurig et al., 2002; Corbel, 2006). Entretanto, essas vacinas possuem muitas desvantagens, sendo patogênicas para o homem, promovem aborto em animais gestantes, dentre outras (Corbel, 2006). Desta forma, alternativas mais seguras estão sendo estudadas, como vacinas de subunidades proteicas, com vetores e de DNA (Cassataro et al., 2007; Jain et al., 2014; Golshani et al., 2015). Uma estratégia inovadora que surgiu recentemente está sendo o estudo de epitopos de células T em formulações vacinais, demonstrando proteção para *B. abortus* (Afley et al., 2015). O objetivo deste trabalho foi avaliar a cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  como vetor para peptídeos de proteínas de *Brucella* sp. (proteína recombinante de *Brucella* spp., contendo sequências de 14 peptídeos - RPB14) com papel imunogênico e seu potencial uso para imunização e proteção contra cepas virulentas de *Brucella* em camundongos BALB/c.

#### 2. MATERIAL E MÉTODOS

##### 2.1 CAMUNDONGOS

Camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade, obtidos no Biotério Central da UFMG, foram mantidos sob ótimas condições de higiene, umidade, luz (ciclo artificial de 12 horas escuro/claro) e controle de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Todos os procedimentos experimentais nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (CEUA-UFMG protocolo nº 107/2015). Experimentos de proteção vacinal foram realizados em laboratório de nível 3 de biossegurança. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas e aclimatizados uma semana antes da vacinação.

##### 2.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Cepas bacterianas utilizadas nesse estudo (Tabela 4.1) inclui *Escherichia coli* XL-1Blue, *B. ovis* (WT ATCC 25840) *B. ovis*  $\Delta abcBA$ , *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14, *B. abortus* cepa vacinal S19, sendo essa última obtida do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, Ames, IA, USA). Cepas virulentas utilizadas no desafio vacinal foram *B. abortus* 2308 (INTA - Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina) e *B. suis* 1330. Cepas de *Brucella* foram cultivadas em ágar tripton de soja (TSA) a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$ . A cepa *B. ovis* WT ATCC 25840 e as cepas mutantes *B. ovis*  $\Delta abcBA$  e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 foram crescidas em meio TSA com 1% de hemoglobina, e para as cepas mutantes o meio foi suplementado com 100  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina (Gibco, Invitrogen, Brasil) ou

20 µg/mL de cloranfenicol (Sigma, EUA), respectivamente. Antes dos experimentos, as cepas bacterianas congeladas foram descongeladas e semeadas em meio TSA com 1% de hemoglobina com o antibiótico apropriado, e incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Suspensão bacteriana fresca em PBS foi ajustada por espectrofotometria para 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, avaliada usando *SmartSpec spectrophotometer* (Bio-Rad, Hercules, CA) mensurando a densidade óptica em 600 nm (OD<sub>600</sub>), entretanto, a real concentração bacteriana foi checada por diluição seriada e plaqueamento em TSA.

Todas as manipulações com *B. abortus* 2308, *B. suis* 1330 e *B. abortus* cepa S19 foram realizadas em laboratório de biossegurança nível 3, Laboratório de Patologia Molecular, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária, UFMG.

Foi utilizado o plasmídeo pPRB14 (Tabela 4.1). *Escherichia coli* cepa XL-1Blue foi usada para clonagem do plasmídeo pPRB14 com proteína quimérica e cultivada a 37°C em ágar ou caldo Luria-Bertani (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) suplementado quando requerido, com ampicilina (200 µg/mL) na concentração apropriada.

**Tabela 4.1.** Descrição e referência dos plasmídeos e cepas bacterianas utilizados neste estudo.

Bactéria ou plasmídeo	Características	Referência
<b>Bactérias</b>		
<i>B. ovis</i> ATCC 25840	WT	ATCC25840
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$	<i>B. ovis</i> $\Delta BOV\_A500-501::Kan^R$	Silva et al., 2011a
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14	<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA::PRB14::Cn^R$	Este estudo
<i>E. coli</i> XL-1Blue	Para clonagem	Phoneutria
<i>B. abortus</i> cepa vacinal S19	Cepa vacinal	USDA
<i>B. abortus</i> 2308	Cepa de desafio	INTA
<i>B. suis</i> 1330	Cepa de desafio	
<b>Plasmídeos</b>		
pPRB14	Promotor constitutivo SecE, proteína quimérica PRB14 e cassette de cloranfenicol de resistência clonados em pBluescript II SK(-)	GenScript, USA Este estudo

### 2.3 EPITOPOS DE CÉLULAS T: PREDIÇÃO DE EPITOPOS *IN SILICO*

Proteínas previamente descritas como imunogênicas para camundongos, conforme estudo de meta-análise descrito no Capítulo II (Carvalho et al., 2016), foram utilizadas para predição *in silico*. Foram selecionadas 32 proteínas, sendo: Omp16, Omp19, Omp25 e Omp31; proteína ribossomal L7/L12; proteína malato desidrogenase (Mdh); proteínas da superfamília HAD; proteína CP24, proteína flagelar FliN e FlgJ; BP26, urease, proteína chaperona Dnak; chaperona SurA, superóxido dismutase Cu-Zn (Sod); lumazina sintase (BLS), cadeia alfa de riboflavina sintase (RS- $\alpha$ ), lumazina sintase 2 (LS-2), di-hidrolipoamida succiniltransferase (E2o), AdoHcyase, CobB, proteína da família do fator transcricional AsnC; fosfomanomutase; proteína predita de acil-CoA transferase; proteínas de VirB10, VirB9, VirB7; proteína de regulador transcricional GntR, proteína de superfície celular 31 kDa (BCSP 31) proteína de choque térmico GroEL, cisteína sintase (cysK), CobB e proteína acessória de uréase (UreD2). As sequências de aminoácidos dessas proteínas foram obtidas do NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information* - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Peptídeos para alelos de MHC-I (H-2-Ld e H-2-Kd) e MHC-II (H-2-IAd) de camundongos foram preditos usando o programa NetMHC 3.4 *server* e NetMHCII 2.2 *server*, respectivamente, utilizando os parâmetros default para a predição.

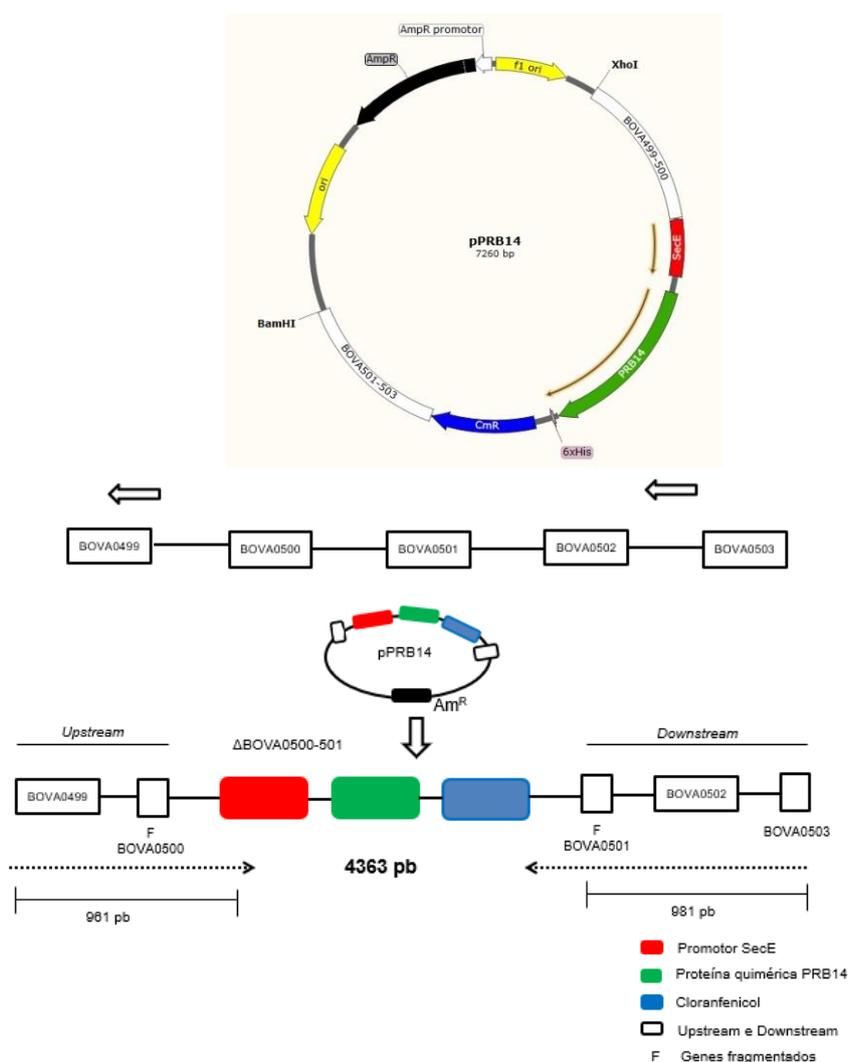
### 2.4 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA

Para a construção da proteína recombinante multi-epitopo, peptídeos selecionados (Tabela 4.3) foram adicionados e foram adicionadas as sequências linkers (GGG) entre dois epitopos. Uma sequência de seis

histidinas em tandem foi fusionada ao C-terminal para monitorar a expressão da proteína recombinante quimérica. A otimização dos códons do gene da proteína foi analisada por [http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_backtranseq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/). A sequência otimizada para *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada para delineamento da proteína recombinante expressa em *B. ovis*.

## 2.5 CONSTRUÇÃO DA CEPA MUTANTE *B. ovis* $\Delta abcBA$ PRB14

A construção do plasmídeo pPRB14 (pBluescript, Genscript, EUA) para a deleção de *abcA* (BOVA0500; GenBank número de acesso 5204038) e *abcB* (BOVA0501; GenBank número de acesso 5203285) e inserção do gene sintético que consiste do promotor constitutivo SecE de *Brucella*, proteína recombinante PRB14 e gene de resistência de antibiótico cloranfenicol, conforme ilustrado na Figura 4.1, gerando a cepa vacinal *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14. A região *upstream* e *downstream* consistem de 961 pb e 981 pb, respectivamente.



**Figura 4.1.** Plasmídeo pPRB14: área de deleção e representação do gene clonado contendo promotor SecE, proteína quimérica e gene que confere resistência a Cloranfenicol para esta cepa, e os fragmentos *upstream* e *downstream*. CmR= cassete de resistência à Cloranfenicol. F= fragmentos de genes truncados na mutagênese.

## 2.6 ELETROTRANSFORMAÇÃO, SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE CEPA MUTANTE

*B. ovis*  $\Delta abcBA$  eletrocompetentes foi transformada com o plasmídeo pPRB14 (pBluescript) como descrito anteriormente (Tatum et al., 1992). Resumidamente, para preparo de células *B. ovis*  $\Delta abcBA$  (Silva et al., 2011a) eletrocompetentes, a bactéria foi inicialmente cultivada em placas de ágar triptona de soja (TSA) com 1% de hemoglobina (Difco, EUA) e canamicina (100 µg/mL) por três dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células bacterianas foram ressuspensas em solução salina fosfato estéril (PBS), centrifugadas a 4000 g por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, e mantidas no gelo nos procedimentos seguintes. O *pellet* bacteriano foi ressuspensado em 20 mL de água destilada estéril gelada, utilizando pipeta sorológica de 25 mL estéril gelada e centrifugado novamente como descrito acima. O *pellet* de células foi lavado mais duas vezes e ressuspensado na última vez em 1 mL de água destilada estéril gelada. O plasmídeo pPRB14 foi transformado em *Escherichia coli* (XL1Blue), extraído por kit comercial (Plasmid Midi Kit, Qiagen, EUA) e utilizado na transformação de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  eletrocompetentes.

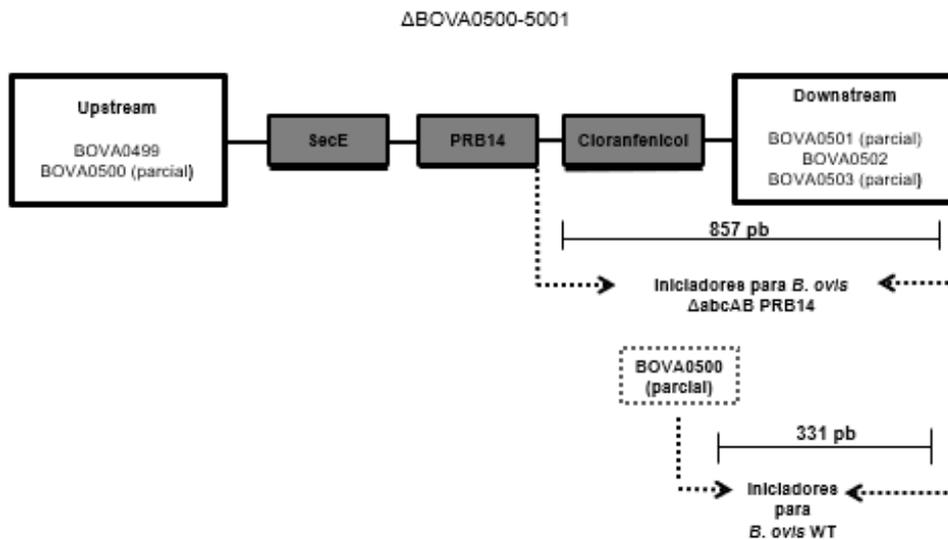
Foram adicionados 5 µL de DNA de plasmídeo pPRB14 a 50 µL de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  eletrocompetentes em cubeta estéril de eletroporação com 0,2 cm (Laboratórios Bio-Rad, Richmond, CA e um aparelho de transfecção de Gene Pulser (Laboratórios Bio-Rad, Richmond, Calif.) em 2,2 kV e 5,4 ms foi utilizado para transformar *B. ovis*  $\Delta abcBA$ . Em seguida, as células bacterianas foram imediatamente suspensas em 1 mL de meio SOCB (6% de caldo de tripase de soja, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glicose) e 100 µL da solução foram plaqueadas em meio TSA com 1% de hemoglobina sem antibiótico e incubados por 16 horas em 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A solução bacteriana restante foi incubada em shaker a 37°C, 200 rpm por 16 horas e posteriormente plaqueada em meio TSA com 1% hemoglobina e cloranfenicol (20 µL/mL). Posteriormente, as colônias que cresceram em meio TSA com 1% de hemoglobina foram recuperadas em 100 µL de PBS estéril, e finalmente cultivadas em TSA suplementado com 1% de hemoglobina com cloranfenicol. Depois de 4 a 6 dias de incubação, as colônias resistentes a cloranfenicol e sensíveis a canamicina (100 µg/mL, Gibco, EUA) e ampicilina (200 µg/mL, Phoneutria, Brasil) foram selecionadas sendo as candidatas cepas mutantes.

## 2.7 CONFIRMAÇÃO DE CEPA MUTANTE POR PCR E SEQUENCIAMENTO

A cepa mutante foi confirmada por PCR como *B. ovis* utilizando os iniciadores visando amplificar uma ilha genômica específica, como anteriormente descrito (Xavier et al., 2010) (Tabela 4.2). A extração de DNA foi realizada selecionando colônias de *B. ovis* WT e cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14, diluídas em 100 µL de água destilada estéril, inativada a 100°C por 10 minutos em termobloco e centrifugada por 12.000 x g por 2 minutos. Para PCR, 2 µL de sobrenadante com o DNA foram adicionados a solução contendo 23 µL de mix para PCR comercial (SuperMix; Invitrogen, Brasil), 0,5 µL da solução de iniciadores ORF AO503 Fv e ORF AO503 Rv (25 mM; FW: 5'-GCCTACGCTGAACTTGCTTTTG-3'/REV: 5'-ATCCCCCATCACCATAACCGAAG-3') (Xavier et al., 2010) e 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase (22 U/mL, Invitrogen, Brasil). Parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação a 94°C por 5 minutos, e 35 ciclos de desnaturação em 95°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos. A PCR foi considerada positiva quando o produto tinha 228 pb (Tabela 4.2).

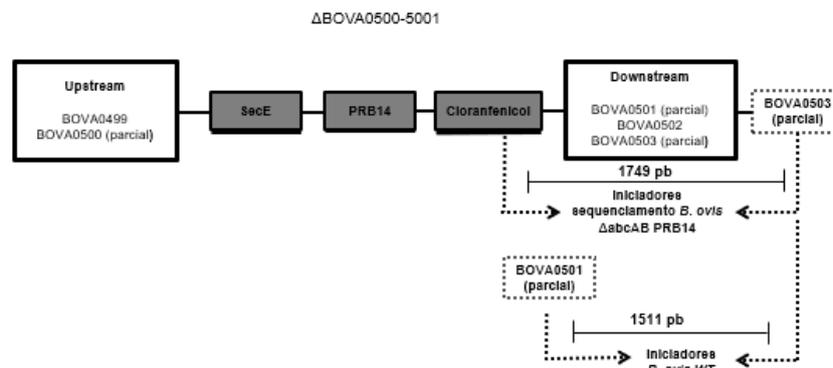
Usando a sequência genômica de *B. ovis* (GenBank número de acesso CP000709.1) dois pares de iniciadores foram desenhados para amplificar uma sequência da região *downstream* (iniciador BO REV) e sequência da região AO500 (BO WT FW), sendo iniciadores específicos para *B. ovis* WT. A deleção de fragmentos de *abcA* e *abcB*, e a construção *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 (Tabela 4.2) foram verificadas por PCR utilizando o iniciador *reverse* citado acima que amplifica uma sequência da região *downstream* (iniciador BO REV) e o iniciador *forward* que amplifica uma sequência específica do gene da proteína quimérica e cloranfenicol (iniciador BO PRB14 FW (Figura 4.2) Assim, a PCR para verificar a deleção e inserção do gene sintético foi realizada utilizando 3 µL do sobrenadante com DNA, adicionados a 20 µL de mix para PCR comercial (SuperMix; Invitrogen, Brasil), 0,5 µL de cada iniciador forward (25 mM,

BO PRB14 FW: 5'-AGTTGATCGGGCACGTAAG-3' e BO WT FW: 5'-ACGCGATGACATTGACCGTA-3') e 1  $\mu$ L de iniciador *reverse* (25 mM, BO REV: 5'-TCATCACGGTACTTGGGCTC-3'). Parâmetros utilizados foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento em 59°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto esperado na PCR foi de 331 pb para *B. ovis* e 857 pb para *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14.



**Figura 4.2.** Representação dos iniciadores para confirmação de *B. ovis* WT e da mutação de *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 por PCR. Para *B. ovis* WT foi utilizado os iniciadores na região AO500 e na região *downstream*, enquanto que em *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 os iniciadores utilizados amplificavam a região da proteína quimérica e sequência da região *downstream*.

A PCR para análise de sequenciamento de DNA da cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 foi realizada utilizando 3  $\mu$ L do sobrenadante com DNA, adicionados a 19,8  $\mu$ L de mix para PCR comercial (SuperMix; Invitrogen, Brasil), 0,5  $\mu$ L de cada iniciador *forward* (25 mM, BO RBB14 seq FW: 5'-AAGATGTGGCGTGTACGGT-3' e BO501 seq FW: 5'-TGTTTGAAGGAGCCGGAGAC-3), 1  $\mu$ L de iniciador *reverse* (25 mM, BO503 seq RV: 5'-TTTGCAGCCATGGGATTTGC-3') (Figura 4.3) e 0,2  $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). Parâmetros utilizados foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento a 57°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 2 minutos; e extensão final a 72°C por 7 minutos. A PCR foi considerada positiva quando o produto tinha 1511 pb para *B. ovis* e 1749 pb para *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14. Amplicons foram purificados pelo método de polietileno glicol (PEG) para precipitação de DNA, como descrito na literatura (Louise et al., 1983), e sequenciados por eletroforese capilar no equipamento ABI3130. Dados foram analisados pelo programa de scanner de sequência (Applied Biosystems) (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adiirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo>) e Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



**Figura 4.3.** Representação dos iniciadores para sequenciamento da cepa mutante *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14. Para a cepa  $\Delta abcBA$  PRB14 os iniciadores utilizados amplificavam a região do cloranfenicol e sequência da região BOVA503.

Os produtos amplificados foram corridos em gel de eletroforese de agarose 1,5% e corados com SYBR®Safe DNA Gel (Invitrogen, EUA). Foram utilizados 4  $\mu$ L de padrão de peso molecular (Mid Range DNA Ladder, Jena Bioscience, Alemanha ou 1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, EUA).

**Tabela 4.2.** Sequência de iniciadores utilizados em PCR convencional para a confirmação de mutagênese em *Brucella ovis*.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Produto	Referência
ORF AO503 Fw	GCCTACGCTGAAACTTGCTTTTG	228 pb ( <i>B. ovis</i> WT e <i>B. ovis</i> PRB14)	Xavier et al., 2010
ORF AO503 Rv	ATCCCCCATCACCATAACCGAAG		
BO PRB14 Fw	AGGTTGATCGGGCACGTAAG	331 pb ( <i>B. ovis</i> WT)	Silva et al., 2015a
BO Rv	TCATCACGGTACTTGGGCTC	857 pb ( <i>B. ovis</i> PRB14)	Este estudo
BO WT Fw	ACGCGATGACATTGACCGTA		
BO RBB14 seq Fw	AAGATGTGGCGTGTACGGT	WT: 1511 pb ( <i>B. ovis</i> WT)	Este estudo
B0503 seq Rv	TTTGCAGCCATGGGATTTGC	1749 pb ( <i>B. ovis</i> PRB14)	
B0501 seq Fw	TGTTTGAAGGAGCCGGAGAC		

## 2.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS/PAGE)

Foram utilizados 20  $\mu$ L de lisado bruto de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e controle de *B. ovis*  $\Delta abcBA$ , foram adicionados com 5  $\mu$ L de SDS tampão de amostra (25% de solução a 0,5 M Tris-HCl - Invitrogen, EUA, pH 6,8; 20% de glicerol; 4% de betamercaptoetanol; 0,2% de azul de bromofenol; 4% de SDS). As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e submetidas em seguida ao SDS-PAGE. Foram utilizados 20  $\mu$ L de marcador de massa molecular para proteína (SeeBlue™ Plus2, Invitrogen, EUA). Para o SDS-PAGE, inicialmente, preparou-se o gel de separação a 12% utilizando acrilamida 30% (29% de acrilamida - Invitrogen, EUA; 1% N,Nmetileno-bis-acrilamida - Invitrogen, EUA), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Invitrogen, EUA), SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED (Invitrogen, EUA). Em seguida, o gel de concentração a 4% foi preparado usando solução de acrilamida 30%, 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e de TEMED (Invitrogen, EUA) (Neuhoff et al., 1988).

A eletroforese ocorreu em tampão Tris-glicina pH 8,0 (Tris 25 mM, Glicina 0,25 mM, SDS 0,1%) com 40V por 1 hora e 100 V para o restante do tempo de corrida. O gel foi corado por solução de azul de Coomassie (25% de metanol, 5% de ácido acético e 0,1% de azul brilhante de Coomassie G-250).

## 2.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA EM *B. ovis* $\Delta abcBA$ PRB14 POR WESTERN BLOT

A expressão de proteína quimérica em *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 foi detectada por *Western blot* utilizando anticorpo anti-his. Alíquota de lisado bruto de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e controle negativo de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  foram submetidas a SDS-PAGE. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de polyvinylidene difluoride (PVDF) com microporos de 45  $\mu$ m (Immobilon®-P, Millipore, EUA), a 115 V, 350 mA em 4°C por 1 hora, utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BioRad, EUA), imersas em tampão de transferência contendo 48 mM de Tris base, 39 mM de glicina, 20% v/v de álcool metílico. Em seguida a membrana foi incubada por 1 hora, sob agitação em solução de bloqueio [5% p/v de leite em pó desnatado dissolvido em TBS-Tween 0,1% (50 mM tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) e 0,1% v/v de Tween® 20 (Sigma Life Science, EUA) (TTBS)]. Posteriormente, realizou-se três lavagens da membrana com TTBS, por 5 minutos, e em seguida a membrana foi incubada com anticorpo primário anti-his (1:3000, Thermo scientific, EUA), diluído em solução de TTBS com com 2% de leite desnatado em pó, por 18 horas a 4°C, sob agitação. A membrana foi lavada três vezes com TTBS e incubada com IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (goat anti-mouse IgG-HRP; Thermo scientific, EUA), na diluição 1:2000 por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, a membrana foi lavada três vezes com TTBS e finalmente, aplicou-se o cromógeno DAB (3, 3'-diaminobenzidina - Millipore, Brasil) sobre a membrana e incubou-se até o aparecimento de bandas, quando a membrana foi lavada com água destilada.

## 2.10 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFECÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE *B. ovis* $\Delta abcBA$ PRB14 EM MACRÓFAGOS MURINOS

Macrófagos RAW 264.7 foram usados para avaliar a sobrevivência da mutante *B. ovis* PRB14 comparada com as cepas *B. ovis* WT (ATCC 25840) e *B. ovis*  $\Delta abcBA$ . Resumidamente, os macrófagos foram cultivados em meio RPMI (1640, Gibco, Invitrogen) com suplementação de 10% de soro fetal bovino (SFB) e adicionados em placas de cultivo celular de 96 well (Sarstedt, São Paulo, Brasil) ( $5 \times 10^4$  macrófagos/well) com meio completo sem adição de antibiótico por 18 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 1:100, em seguida, as placas foram centrifugadas 1.000 x g por 5 minutos e incubadas por 30 minutos a 37°C. Depois de lavadas uma vez com PBS, as células foram incubadas com meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 1 hora a 37°C, objetivando a morte bacteriana extracelular. O meio de cultivo foi substituído por meio completo contendo 25  $\mu$ g/mL de gentamicina (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e incubado a 37°C por 0, 4, 24, 48 horas pós infecção. Em diferentes tempos pós infecção, as células foram lavadas uma vez com PBS e lisadas com água destilada estéril por 20 minutos e o sobrenadante foi submetido a diluição seriada em PBS para a contagem de UFC, em placas de TSA com 1% hemoglobina sem antibiótico (*B. ovis* WT), com canamicina (*B. ovis*  $\Delta abcBA$ ) e com cloranfenicol (*B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14). Esses ensaios foram realizados em triplicatas e repetidos duas vezes.

## 2.11 AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DE CEPA MUTANTE *B. ovis* $\Delta abcBA$ PRB14 EM CAMUNDONGO BALB/c

Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 7 semanas de idade foram mantidos em gaiolas em instalações de Biossegurança nível 2. Três grupos com cinco camundongos cada, foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com uma única dose de 100  $\mu$ l de suspensão com  $1 \times 10^6$  UFC/animal de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 ou *B. ovis*  $\Delta abcBA$  ou *B. ovis* WT (ATCC 25840) em PBS. Uma semana após a infecção, os camundongos foram eutanasiados com uma dose letal de cloridrato de xilazina 2% (0,6 mg/animal) e cloridrato de cetamina 1% (27 mg/animal) por via intraperitoneal (i.p.), seguida de deslocamento cervical. O baço e fígado foram coletados assepticamente, pesados e homogeneizados em tubos com 2 mL de PBS estéril

usando um homogenizador de tecido (Ultra Stirrer; Biotech, Brasil). Diluições seriadas foram realizadas e alíquotas de 100 µL de diferentes diluições seriadas foram plaqueadas em duplicata em TSA com 1% de hemoglobina ou TSA com 1% de hemoglobina-canamicina (100 µg/mL, Gibco, Invitrogen, Brasil) ou TSA com 1% de hemoglobina-cloranfenicol (20 µg/mL, Sigma, EUA), incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e avaliadas por 4 a 7 dias. Níveis de infecção foram expressos em média ± desvio padrão de log UFC/órgão individual.

Para histopatologia, fragmentos de baço e fígado foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas, seguidos por desidratação em álcool crescente, diafanização em xilol e incluídas em parafina. Os fragmentos foram seccionados em 4 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica.

Imuno-histoquímica foi realizada como previamente descrita (Xavier et al., 2009) para fragmentos de fígado e baço. Resumidamente, cortes histológicos de baço e fígado foram desparafinizados, hidratados e incubados em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em tampão fosfato (PBS), por 20 minutos, três trocas. Posteriormente as três lavagens em PBS, realizou-se o bloqueio das ligações inespecíficas com solução de bloqueio (5% p/v de leite em pó desnatado dissolvido em PBS) por 1 hora. As secções de tecidos foram transferidas para câmara úmida e incubadas com anticorpo primário (1:1000, coelho experimentalmente infectado com *B. ovis* 1 x 10<sup>9</sup> UFC) por 1 hora em temperatura ambiente. Então, as secções de tecidos foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado (coelho e camundongo) por 40 minutos, posteriormente foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com streptavidina-peroxidase de kit comercial (LSAB2 System-HRP kit; Dako, EUA), por 20 minutos. Utilizou-se o cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol, Dako, EUA) para revelar a reação e contra coloração com hematoxilina de Meyer.

## 2.12 PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO *B. OVIS* $\Delta abcBA$ PRB14 E *B. OVIS* $\Delta abcBA$

Cápsulas de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 com 1 x 10<sup>9</sup> UFC/mL foram preparadas por metodologia previamente descrita (Arenas-Gamboa et al., 2008) com mínimas modificações. Resumidamente, as bactérias foram cultivadas em placas de ágar triptona de soja (TSA) com 1% de hemoglobina, suplementadas com antibiótico adequado para cada cepa mutante, por três dias em 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram ressuspendidas as células bacterianas em solução salina estéril (PBS), resultando em 5 x 10<sup>10</sup> UFC/mL e centrifugadas a 4000 g por 10 minutos. O pellet bacteriano foi ressuspendido em 840 µL de solução de MOPS (10 mM MOPS, 0,85% NaCl [pH 7.4], Sigma-Aldrich, Brasil) e 4,16 mL de solução de alginato (1,5% sal de sódio de ácido algínico, Sigma-Aldrich, Brasil, 10 mM MOPS, 0,85% NaCl [pH 7.3]). Uma alíquota foi diluída e plaqueada em TSA com 1% de hemoglobina para confirmar o inóculo. A suspensão bacteriana foi passada em seringa e gotejada com agulha 0,23 x 4 mm em solução de polimerização (cloreto de cálcio 100 mM, MOPS 10 mM, NaCl 0,85%) para formar as cápsulas e em seguida, homogeneizadas por 15 minutos em homogeneizador de placas, temperatura ambiente e velocidade lenta. Cápsulas formadas foram lavadas duas vezes com solução de MOPS por 5 minutos e em seguida, foram adicionadas à solução de poly-L-lisina 0,05% (peso molecular 15.000 a 30.000, Sigma-Aldrich, Brasil) diluída em solução de polimerização, por 10 minutos. Depois de lavar uma vez com solução de MOPS, as cápsulas foram agitadas em solução de alginato (0,03%, MOPS 10 mM, NaCl 0,85%), por 5 minutos e então retirada a solução de alginato 0,03%, obtendo ao final o volume desejado de cápsulas.

Para determinar a viabilidade bacteriana e a quantidade de bactérias por mL de cápsulas de alginato (UFC/mL) pós encapsulamento, foi retirado 1 mL de cápsulas de cada cepa mutante antes da adição de poly-L-lisina 0,05%, e então foram dissolvidas em 1 mL de solução de despolimerização (citrato de sódio 50 mM, 0,45% NaCl, 10 mM MOPS [pH 7,2]) sob homogeneização por 10 minutos e plaqueadas em meio TSA com 1% de hemoglobina.

## 2.13 VACINAÇÃO

Sessenta camundongos BALB/c, fêmeas de 6 a 8 semanas, foram randomicamente divididos em 12 grupos de 5 animais cada. Três grupos foram vacinados por via subcutânea (s.c.) com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada e três grupos com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada, usando a mesma dose para cada vacina,  $1 \times 10^8$  UFC/100  $\mu$ L/camundongo. Três grupos foram inoculados subcutaneamente com 100  $\mu$ L de PBS (grupo controle não vacinado) e outros três grupos com  $1 \times 10^5$  UFC/100  $\mu$ L/camundongo com *B. abortus* cepa S19 (grupo controle positivo) de acordo com o protocolo da OIE (OIE, 2008).

## 2.14 EXPERIMENTO DE PROTEÇÃO EM BALB/c

Quatro semanas após a imunização, camundongos de cada grupo foram desafiados por via intraperitoneal (i.p.) com cepas virulentas de *B. abortus* 2308, *B. ovis* ATCC 25840, *B. suis* 1330, com  $10^5$  UFC por animal. Duas semanas após o desafio, os camundongos foram eutanasiados com cloridrato de xilazina 2% (0,1 mg/kg) e cloridrato de cetamina 1% (35 mg/kg) por via intraperitoneal, seguida de deslocamento cervical. Em seguida, o baço foi removido assepticamente, pesado em tubo falcon de 50 mL, e homogeneizado em 2 mL de solução de PBS estéril utilizando um mixer (Hamilton Beach, EUA). Cada amostra foi submetida a diluições seriadas, plaqueadas em ágar TSA com 1% de hemoglobina em duplicatas, e incubadas por 5 a 7 dias de crescimento a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> para determinar a carga bacteriana de *B. abortus* 2308, *B. ovis* ATCC 25840 e *B. suis* 1330 por grama de baço. No caso dos grupos controles imunizados com *B. abortus* S19, homogeneizado de baço foi cultivado em paralelo em meio seletivo (0,1% eritritol, inibidor seletivo do crescimento de cepa S19, Sigma, Aldrich, Brasil) e em condição não seletiva, para diferenciação de UFC de cepa utilizada na imunização e cepa desafio. Para animais de grupos vacinados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14, as diluições seriadas do baço foram cultivadas em paralelo em meio seletivo (TSA com 1% de hemoglobina com 100  $\mu$ g/mL de canamicina ou 20  $\mu$ g/mL de cloranfenicol, respectivamente) e cultivadas em meio não seletivo, para realizar a diferenciação de UFC de cepa utilizada na imunização e cepa desafio. Índice de proteção foi obtido por subtração da média log<sub>10</sub> UFC do grupo experimental da média log<sub>10</sub> UFC do grupo controle negativo.

Para histopatologia, fragmentos de baço e fígado foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas, seguidos por desidratação em álcool crescente, diafanização em xilol e incluídos em parafina. Os fragmentos foram seccionados em 4  $\mu$ m de espessura e corados por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica. Os camundongos que foram vacinados subcutaneamente com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada ou *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada, foram coletados fragmentos de tecido subcutâneo do local de vacinação, processados histologicamente como descrito acima e processados para imuno-histoquímica como citado no item 3.11.

## 2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de UFC da avaliação *in vitro* da infecção e sobrevivência de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 em macrófagos murinos, e a intensidade da infecção (eliminação bacteriana e eficácia da vacina) em cada tempo estudado foram transformados logaritmicamente, expressos em média e desvio padrão e submetidos a análise de variância (ANOVA). Índice de proteção foi calculado subtraindo a média em Log do grupo vacinal da média do grupo controle PBS. Médias foram comparadas por teste de Tukey (GraphPad Prism 5.0). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 PREDIÇÃO DE EPITOPOS

Trinta e duas proteínas foram selecionadas, tiveram as suas sequências obtidas no NCBI e submetidas a predição *in silico* de epitopos de células T. Essas sequências possibilitaram a seleção de 14 epitopos de

células T (Tabela 4.3) para MHC de classe I e II. Os 14 peptídeos selecionados, com forte afinidade a MHC, foram originados de 10 proteínas imunogênicas, que incluem Omp16, Omp19, Omp31, Mdh, Had superfamily, Predicted acyl-CoA transferase, CP24, Flin, BP26 e urease. A localização de cada epitopo com forte afinidade para alelos H-2-Ld, H-2-Kd e H-2-IAd de camundongos foi predita e identificada (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Epitopos/peptídeos preditos por análise *in silico*.

Nome da proteína	Peptídeo predito	MHC	Alelo	Score	Afinidade
BP26	SPDMAILNL	MHC I	H-2-Ld	37	forte
CP24	MPINQVANI	MHC I	H-2-Ld	29	forte
FliN	MPVSSLMKL	MHC I	H-2-Ld	35	forte
Mdh	FYAPAASAI	MHC I	H-2-Kd	7	forte
Mdh	MYVGVPTVI	MHC I	H-2-Kd	20	forte
Mdh	IPLPDLVKM	MHC I	H-2-Ld	21	forte
Omp16	SPIAIALFM	MHC I	H-2-Ld	5	forte
Omp19	LPPASAPDL	MHC I	H-2-Ld	19	forte
Omp19	FPNAPSTDM	MHC I	H-2-Ld	22	forte
Omp31	MFATSAMAADV VVSE	MHC II	H-2-IAd	45.4	forte
Predita acyl-CoA transferase	QFAGGLSYI	MHC I	H-2-Kd	28	forte
Predita acyl-CoA transferase	YSVIAIQSALIMRAR	MHC II	H-2-IAd	46.0	forte
Superfamília HAD	RPIASLHAL	MHC I	H-2-Ld	13	forte
Urease	TFLRAIQTADAMKKA	MHC II	H-2-IAd	46.4	forte

### 3.2 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE PRB14

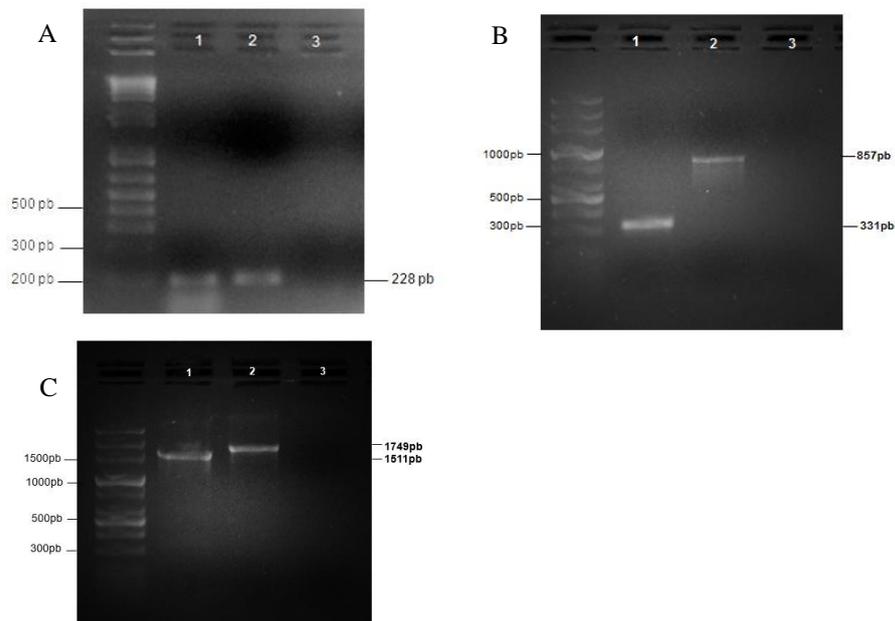
Os epitopos identificados na Tabela 4.3 foram utilizados na construção da proteína quimérica recombinante. Finalmente, 28 epitopos foram utilizados para a construção. Para conectar os epitopos utilizamos uma sequência linker de GGG, além disso, fusionamos ao C-terminal uma sequência de seis histidinas em tandem. O design final da proteína está mostrado abaixo na Figura 4.4.

MFYAPAASAI~~GGGRPIASLHALGGGLPPASAPDLGGGMYVGVPTVIGGGIPLPDLVKMGGGFPNAPSTDMGGQFAGGLSYIGGGMPINQVANIGGGMPVSSLMKLGGGSPDMAILNLGGGMFATSAMAADV VVSEGGGYSVIAIQSALIMRARGGGTFLRAIQTADAMKKA~~GGGSPIAIALFMGGGSPIAIALFMGGGFYAPAASAI~~GGGRPIASLHALGGGLPPASAPDLGGGMYVGVPTVIGGGIPLPDLVKMGGGFPNAPSTDMGGGQFAGGLSYIGGGM PINQVANIGGGMPVSSLMKLGGGSPDMAILNLGGGMFATSAMAADV VVSEGGGYSVIAIQSALIMRARGGGTFLRAIQTADAMKKA~~GGGHHHHHH

**Figura 4.4.** Design final da proteína quimérica recombinante PRB14 de *Brucella* com 28 epitopos (vermelho), sequência linker de GGG (preto) e seis histidinas no C-terminal (verde).

### 3.3 MUTAGÊNESE

A amostra mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 gerada neste estudo foi confirmada pela análise de PCR. O gene de *B. ovis* BOVAO503 presente em uma ilha genômica específica dessa espécie foi conservado nessa cepa mutante (228 bp). A cepa *B. ovis* WT (ATCC 25840) foi utilizada como controle positivo para todas as PCR (Figura 4.5A).



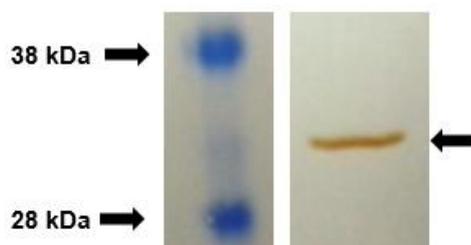
**Figura 4.5.** (A) Confirmação da cepa  $\Delta abcBA$  PRB14 pertencente a espécie *Brucella ovis* pela PCR. Amplificação de fragmento de 228 pb do fragmento do gene de *B. ovis* BOVAO503 presente em uma ilha genômica específica dessa espécie. Amostra 1: *B. ovis* WT (controle positivo); Amostra 2: *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14; Amostra 3: controle negativo. (B) Confirmação da mutagênese de *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 pela PCR. Amplificação de fragmento de 857 pb na amostra mutante resultante do gene sintético de PRB14. Amostra 1: *B. ovis* WT; Amostra 2: *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14; Amostra 3: controle negativo. (C) Confirmação de mutagênese de *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 por PCR para sequenciamento. Amplificação de fragmento de 1511 pb presente na amostra virulenta de referência *B. ovis* WT (ATCC 25840). Na cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 a inserção do gene sintético resultou na amplificação de um produto maior (1749 pb). Amostra 1: *B. ovis* WT (ATCC 25840); Amostra 2: *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14; Amostra 3: controle negativo.

O plasmídeo pPRB14 foi eletroporado com MicroPulser Eletroporador (Laboratórios Bio-Rad, Canadá) em *B. ovis*  $\Delta abcBA$  gerando a deleção dos genes *abcA* e *abcB* e inserção do gene sintético PRB14. Colônias sensíveis a ampicilina e canamicina e resistentes a cloranfenicol foram selecionadas e analisadas por PCR para confirmar a mutação. A cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 diferencia bacteriologicamente de *B. ovis* WT e *B. ovis*  $\Delta abcBA$ , por adquirir resistência ao antibiótico cloranfenicol utilizado na construção. A deleção dos genes *abcBA* e a inserção do gene sintético teve êxito (Figura 4.5B) gerando a amplificação de um fragmento maior (857 pb) que a amostra virulenta de *B. ovis* (ATCC 25840) (331 pb).

A cepa mutante foi confirmada por sequenciamento por eletroforese capilar. Os nucleotídeos da sequência flanqueada a inserção do gene sintético foram comparados com o banco de dados do genoma de *B. ovis* disponíveis no NCBI (BLAST). O sequenciamento demonstrou que o gene PRB14 foi inserido corretamente.

### 3.4 A CEPA MUTANTE *B. ovis* $\Delta abcBA$ PRB14 É CAPAZ DE EXPRESSAR A PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA

Para analisar a presença de proteína quimérica, extratos de células bacterianas foram lisados e submetidos a SDS-PAGE e *Western blot* utilizando o anticorpo anti-histidina que se ligará a cauda de histidina presente na cepa bacteriana mutante. O SDS-PAGE não foi capaz de detectar uma quantidade suficiente da proteína no extrato proteico (dados não mostrados), entretanto, o *Western blot* detectou a proteína PRB14 que migra como uma molécula de 36,45 kDa (Figura 4.6).

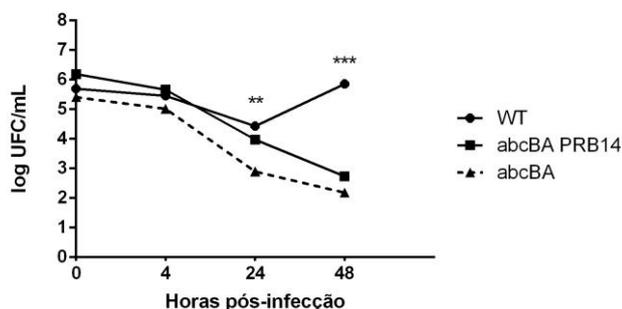


**Figura 4.6.** *Western blot* de diferentes cepas de *Brucella ovis*. Lisado de células de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 foi submetida a eletroforese e transferida, e a cauda de histidina foi detectada com o uso de anticorpo anti-his.

### 3.5 *B. ovis* $\Delta abcBA$ PRB14 É ATENUADA EM MACRÓFAGOS

*Brucella* é capaz de infectar e multiplicar em células fagocíticas profissionais. A infecção ocorre em duas fases, de invasão e replicação. Nos tempos de 0 a 8 horas pós infecção ocorre a fase de invasão, período em que a *Brucella* não replica no interior das células, entretanto, após esse período, na fase de replicação, *Brucella* alcança o retículo endoplasmático rugoso e inicia a multiplicação (Pizarro-Cerdá et al., 1998).

O número de bactérias viáveis em macrófago murino foi contado nos tempos de 0, 4, 24 e 48 horas pós infecção. Como mostra a Figura 4.7, 0 e 4 horas pós-infecção o mesmo número de bactérias intracelulares foi recuperado de macrófagos infectados com *B. ovis* WT, *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e *B. ovis*  $\Delta abcBA$ . Esse resultado indica que a presença da proteína quimérica em *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 não altera a invasão celular. Depois de 4 horas, *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  tem perfis similares de atenuação e tem menores taxas de replicação celular do que a cepa selvagem. Em 48 horas pós-infecção, existem 3,5 logs de diferença de número de bactérias que sobrevivem dentro de macrófagos das cepas mutantes comparadas a cepa selvagem ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ). Esses resultados demonstram que  $\Delta abcBA$  PRB14 tem limitada capacidade de replicar no interior de macrófagos.

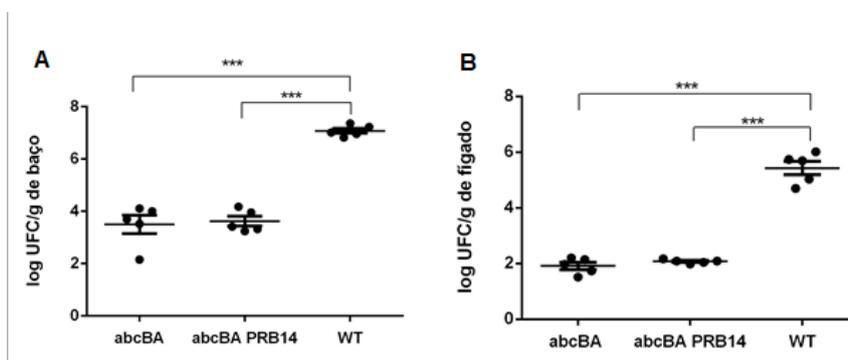


**Figura 4.7.** Replicação intracelular de diferentes cepas de *Brucella ovis*. Macrófagos RAW 264.7 em placas de 96 poços foram infectados com  $5 \times 10^7$  UFC/mL de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  ou *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 ou *B. ovis* WT. O tempo 0 representa o número de UFC intracelular uma hora após incubação com gentamicina. Números de UFC foram determinados nos tempos de 0, 4, 24 e 48 horas pós infecção. Diferença significativa entre a amostra de referência e as cepas mutantes está indicada por asteriscos

(\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Dados são de um experimento individual que é representativo de dois experimentos independentes.

### 3.6 A CEPA MUTANTE *B. ovis* $\Delta abcBA$ PRB14 É ATENUADA EM CAMUNDONGOS BALB/c

A recuperação de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14, *B. ovis*  $\Delta abcBA$  e *B. ovis* WT (ATCC 25840) de baço e fígado de camundongos foi estudada como descrito em materiais e métodos. Uma semana após a infecção, a persistência da cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  no baço de camundongos inoculados com  $10^6$  UFC por camundongo foi reduzida 3,5 logs ( $p < 0,01$ ) comparada a cepa selvagem WT (Figura 4.8A). A recuperação das cepas mutantes no fígado de camundongos foi aproximadamente 3,5 logs menor que a cepa selvagem WT (Figura 4.8B).



**Figura 4.8.** Persistência de *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$ , *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e *B. ovis* WT em baço e fígado de camundongos infectados com diferentes cepas de *Brucella ovis* sete dias após a infecção. Camundongos foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com  $10^6$  UFC/camundongo de *B. ovis*  $\Delta abcBA$ , *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e *B. ovis* WT e eutanasiados 7 dias pós infecção. (A) Baço. (B) Fígado.

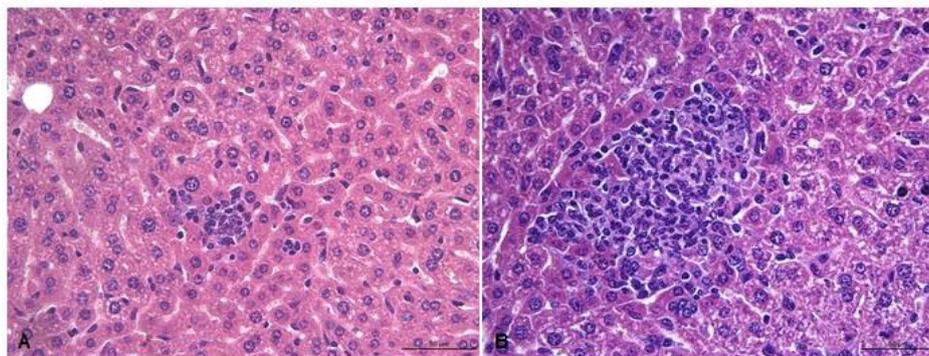
Os resultados indicam que a persistência de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 em baço e fígado de camundongos é reduzida, confirmando sua atenuação *in vivo*, semelhante a amostra mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$ .

Baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com  $\Delta abcBA$  PRB14 não desenvolveram esplenomegalia e hepatomegalia comparado a camundongos infectados com cepa *B. ovis* WT (Figura 4.9).



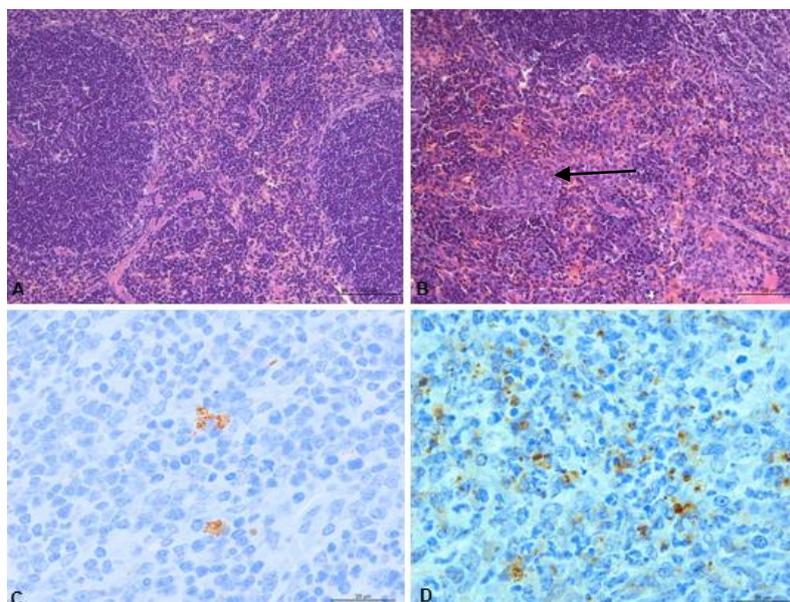
**Figura 4.9.** Alterações macroscópicas de baço e fígado de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  (A), *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 (B) e *B. ovis* WT (C), mostrando esplenomegalia e hepatomegalia em camundongos infectados com cepa selvagem.

Microscopicamente, no fígado de camundongos infectados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 apresentam infiltrado inflamatório multifocal discreto, constituído por neutrófilos, linfócitos e macrófagos, caracterizando micogranulomas hepáticos, semelhantes aos observados em camundongos infectados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  (dados não mostrados). No fígado de camundongos infectados com *B. ovis* WT havia múltiplos micogranulomas, em quantidade moderada (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Fígado de camundongo BALB/c infectado com *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 (A) e *B. ovis* WT (B) sete dias após a infecção. Microgranuloma focal discreto em fígado de camundongo infectado com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 (A) comparado a multifocais microgranulomas em fígado de camundongo infectado com *B. ovis* WT. Coloração de hematoxilina e eosina (HE). Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

Microscopicamente, o baço apresentou discreto infiltrado inflamatório histiocitário, com alguns neutrófilos na polpa vermelha de camundongos infectados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 (Figura 4.11A), enquanto animais infectados com a cepa virulenta *B. ovis* WT havia intenso infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico multifocal (Figura 4.11B). O resultado de imuno-histoquímica está de concordância com os baixos valores de colonização bacteriana descritos anteriormente na contagem de UFC de baço e fígado para a cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 (Figura 4.11C).



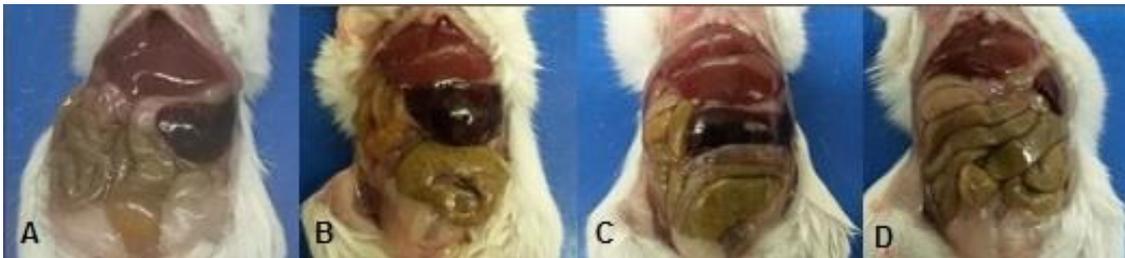
**Figura 4.11.** Histologia e imuno-histoquímica de baço de camundongos BALB/c infectados com *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 (A e C) e *B. ovis* WT (B e D). (A). Discreto infiltrado inflamatório hstiocitário, com alguns neutrófilos na polpa vermelha no baço de camundongos infectados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14. Barra: 100  $\mu\text{m}$ . (B). Microgranulomas multifocais intensos (seta) na polpa vermelha do baço de camundongos infectados com cepa *B. ovis* WT. Barra: 100  $\mu\text{m}$ . (C). Imunomarcações discretas de antígenos de *Brucella* sp. intracitoplasmáticos em macrófagos. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . (D). Imunomarcações intensas de antígenos de *Brucella* sp. intralesionais em macrófagos em microgranulomas. Barra: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.7 PADRÕES DE ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM DIFERENTES CEPAS DE *BRUCELLA* E DESAFIADOS COM *B. ABORTUS*, *B. OVIS* E *B. SUIIS*

Os camundongos não imunizados (PBS), ou imunizados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada (B) ou *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada e desafiados com *B. abortus* apresentaram esplenomegalia (Figura 4.12). Os camundongos BALB/c imunizados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada e desafiados com *B. ovis*, não apresentaram esplenomegalia (Figura 4.13B), já os camundongos imunizados com essa mesma cepa e desafiados com *B. suis* apresentaram intensa esplenomegalia (Figura 4.14B). Todos os camundongos vacinados com *B. abortus* S19 e desafiados com as diferentes cepas virulentas, não desenvolveram alterações macroscópicas (Figura 4.12D, 4.13D e 4.14D).



**Figura 4.12.** Alterações macroscópicas no fígado e baço de camundongos BALB/c não imunizados (PBS) (A), imunizados com *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada (B), ou com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada (C) ou *Brucella abortus* S19 (D) e desafiados com *B. abortus* 2308. Esplenomegalia acentuada e hepatomegalia discreta (A, B e C), exceto nos camundongos imunizados com S19 (D).



**Figura 4.13.** Alterações macroscópicas no fígado e baço de camundongos BALB/c não imunizados (PBS) (A) ou imunizados com *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada (B) ou *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada (C) ou *Brucella abortus* S19 (D) e desafiados com *B. ovis* WT (ATCC 25840). Esplenomegalia e hepatomegalia discreta (B e C) e ausente em camundongos imunizados com S19 (D). Esplenomegalia acentuada e hepatomegalia discreta em camundongos do grupo controle PBS (A).



**Figura 4.14.** Alterações macroscópicas representativas de fígado e baço de camundongos BALB/c não imunizados (PBS) (A) ou imunizados com *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada (B) ou *B. ovis*  $\Delta abcBA$  encapsulada (C) ou *B. abortus* S19 (D) e desafiados com *B. suis* 1330. Esplenomegalia acentuada e hepatomegalia discreta (A, B e C), exceto nos camundongos imunizados com S19 (D).

### 3.8 PADRÕES DE LESÕES HISTOPATOLÓGICAS EM FÍGADO E BAÇO DE CAMUNDONGOS BALB/C IMUNIZADOS COM DIFERENTES CEPAS DE *BRUCELLA* E DESAFIADOS COM *B. ABORTUS*, *B. OVIS* E *B. SUIIS*

Os exames histopatológicos de baço e fígado foram realizados para investigar os efeitos patológicos de cepas de *Brucella* em camundongos BALB/c. Os camundongos não imunizados (PBS) e desafiados com *B. abortus*, *B. ovis* e *B. suis* apresentaram intenso infiltrado de células inflamatórias histiocitárias, com numerosos neutrófilos na polpa vermelha do baço. Já a amostra mutante  $\Delta abcBA$  PRB14 protegeu os camundongos contra o desafio com a cepa virulenta *B. ovis*, fato demonstrado pelo mínimo infiltrado inflamatório nos órgãos analisados, enquanto, que a imunização com  $\Delta abcBA$  PRB14 e desafio com *B. abortus* e *B. suis* resultaram em infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico multifocal moderado no baço e fígado. O mesmo padrão de lesão histopatológica foi observado nos camundongos BALB/c imunizados com  $\Delta abcBA$  e desafiados com essas cepas de *Brucella*. Foram encontradas lesões histopatológicas mínimas nos tecidos de camundongos vacinados com S19.

### 3.9 PROTEÇÃO CONFERIDA POR VACINAÇÃO COM *B. OVIS* $\Delta abcBA$ PRB14 EM CAMUNDONGOS BALB/c

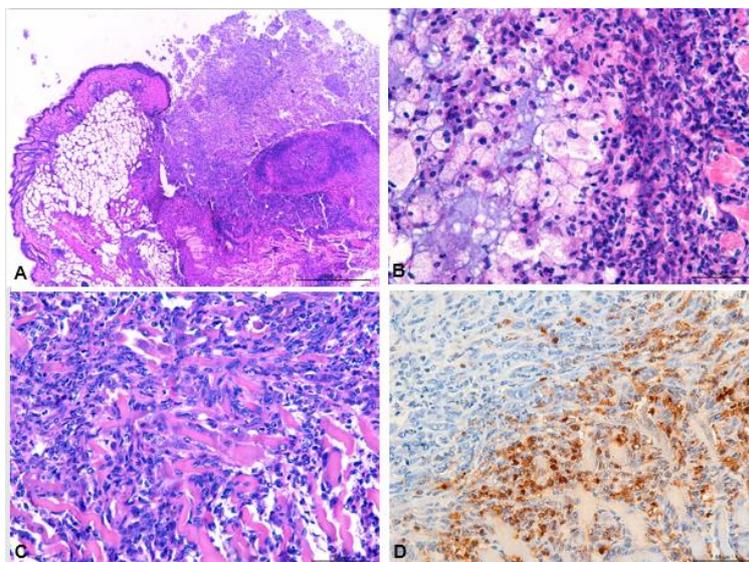
Experimentos de imunização com camundongos foram realizados com a cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 para determinar a proteção imunológica conferida contra *B. abortus*, *B. suis* e *B. ovis*. A mutante  $\Delta abcBA$  PRB14 protegeu camundongos após o desafio com a cepa virulenta *B. ovis*, conferindo redução da carga bacteriana no baço desses animais comparada a camundongos BALB/c controle não imunizados, entretanto, não conferiu proteção a camundongos desafiados com *B. abortus* e *B. suis*.

**Tabela 4.4.** Proteção contra *Brucella abortus*, *Brucella ovis* e *Brucella suis* em camundongos imunizados com as cepas *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 ou *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  ou *Brucella abortus* S19.

Vacina	Média log <sub>10</sub> UFC ± DP em baço	Log <sub>10</sub> de proteção
	<b>Desafio <i>B. abortus</i> (10<sup>5</sup>)</b>	
Controle (PBS)	7,11 ± 0,20	
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14	7,03 ± 0,18	0,08
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$	7,21 ± 0,30	-0,10
<i>B. abortus</i> S19	5,48 ± 1,93	1,63
	<b>Desafio <i>B. ovis</i> (10<sup>5</sup>)</b>	
Controle (PBS)	6,17 ± 0,15	
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14	5,69 ± 0,68	0,48
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$	5,57 ± 0,59	0,6
<i>B. abortus</i> S19	4,92 ± 0,71	1,25
	<b>Desafio <i>B. suis</i> (10<sup>5</sup>)</b>	
Controle (PBS)	6,17 ± 0,14	
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ PRB14	6,0 ± 0,34	0,17
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$	6,22 ± 0,04	-0,05
<i>B. abortus</i> S19	3,79 ± 1,26	2,37

### 3.10 LESÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DO LOCAL DA VACINAÇÃO

Macroscopicamente a cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada induziu formação de reação inflamatória granulomatosa no tecido subcutâneo no local de imunização. A reação foi observada após alguns dias após a imunização e permaneceu até o momento da eutanásia (6 semanas pós vacinação). Microscopicamente, havia um infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico difuso intenso, com numerosos macrófagos epitelioides. Esse infiltrado inflamatório se estendia a musculatura estriada esquelética, causando degeneração, necrose e perda de fibras (Figura 4.15C). Por imuno-histoquímica, foi possível observar decação de antígenos de *Brucella* intralésionais (Figura 4.15D).



**Figura 4.15.** Histopatológico e imuno-histoquímica do local de vacinação de camundongos BALB/c imunizados com a cepa *Brucella ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada, apresentando granulomas. (A): Pele com ulceração extensa associada a infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico focalmente extenso e intenso. Barra: 500  $\mu\text{m}$  (B): Pele, infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico intenso, com numerosos macrófagos espumosos. Barra: 50  $\mu\text{m}$  (C) Degeneração, necrose e perda de fibras musculares esqueléticas, substituídas por infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico intenso, com numerosas bactérias intralésionais imunomarcadas (D). Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4. DISCUSSÃO

Inicialmente, demonstramos que a cepa mutante *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 é capaz de infectar macrófagos RAW e camundongos BALB/c, apresentando o fenótipo atenuado semelhante a *B. ovis*  $\Delta abcBA$  (Silva et al., 2011a). Macrófagos RAW permitem a caracterização de infecção e tráfico intracelular de *Brucella* (Silva et al., 2011a). *B. ovis* WT, *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  demonstraram similar internalização no tempo 0 horas e cinética de infecção no tempo 4 horas pós infecção, resultados similares aos encontrados por Silva e colaboradores (2011a), entretanto, no tempo 24 horas, pós-infecção as cepas mutantes são atenuadas *in vitro*, apresentando diminuição da carga bacteriana recuperada em macrófagos infectados com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 e *B. ovis*  $\Delta abcBA$  comparados com *B. ovis* WT. Esse resultado foi similar ao descrito anteriormente em macrófagos RAW (Silva et al., 2011a), o que suporta que o transportador ABC não é necessário para internalização bacteriana, entretanto é necessário para sobreviver e multiplicar no nicho replicativo intracelular (Silva et al., 2014). Esses resultados são muito relevantes, pois provam o conceito de que *B. ovis*  $\Delta abcBA$  pode ser utilizada como vetor vacinal. O uso desta cepa como vetor vacinal proporciona diversas vantagens, por ser uma espécie não zoonótica e não causa aborto em fêmeas prenhas vacinadas (Poester et al., 2013), pode ser carreadora de antígenos para prevenção de infecções por outros agentes, particularmente, patógenos intracelulares de relevância para ruminantes domésticos. Além disso, a cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  não tem efeito residual para animais domésticos e, por ser uma cepa rugosa, não interfere com os testes sorológicos, o que é vantajoso comparado as atuais vacinas de cepas vivas atenuadas (Vemulapalli et al., 2002; Elzer et al., 2002; Dorneles et al., 2015)

Avaliamos a resposta protetiva da cepa de *B. ovis*  $\Delta abcBA$  atenuada expressando epítomos preditos de proteínas imunogênicas conservadas em todas as espécies do gênero. Os dados mostraram que a imunização subcutânea com *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 encapsulada promoveu resposta protetiva em camundongos BALB/c contra infecção com *B. ovis*, similar a obtida por Silva e colaboradores (2015a),

entretanto não demonstrou proteção contra desafio com *B. suis* e *B. abortus*. Essa proteção mínima ou até ausente pode estar relacionada com a seleção de epitopos funcionais e imunogenicidade (Yang et al., 2013) ou com a capacidade de expressão da proteína quimérica nesse vetor *in vivo*. Outro fator relevante e desvantajoso está relacionado com a capacidade da célula hospedeira de processar e apresentar múltiplos antígenos simultaneamente em vacinas com múltiplos epitopos (Babiuk, 1999; Uppalapati et al., 2014).

Como nosso estudo, muitos outros pesquisadores têm realizado esforços na tentativa de desenvolver uma vacina que gere resposta protetora, entretanto, muitas pesquisas não mostram índices de proteção significativos no camundongo (Zhao et al., 2009; Yang et al., 2013; Carvalho et al., 2016). Contudo, a correlação entre resposta protetiva no camundongo e hospedeiro natural não é bem estabelecida, fato demonstrado em estudos de proteção vacinal com a cepa mutante de *B. ovis* utilizada como vetor neste estudo (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b). Experimento com camundongos demonstrou limitada proteção contra *B. ovis* (Silva et al., 2015a), por outro lado, a imunização de ovinos proporcionou prevenção na colonização bacteriana dos órgãos, no desenvolvimento de lesões macroscópica e microscópicas, na eliminação de *B. ovis* no sêmen e urina dos animais imunizados (Silva et al., 2015b).

A seleção das proteínas utilizadas na análise de predição de epitopos *in silico* deste estudo foi baseada em estudo prévio com vacinas contra *Brucella* em camundongos (Carvalho et al., 2016). Neste estudo, identificou-se várias proteínas utilizadas como vacinas de subunidades com proteção significativa. Os numerosos estudos desenvolvidos com vacinas de subunidades estão relacionados com os avanços no sequenciamento completo das espécies de *Brucella* e identificação de regiões imunodominantes (Cassataro et al., 2005; Bhattacharjee et al., 2006; Clausse et al., 2013). Além do desenvolvimento de vacinas de subunidades, abordagens inovadoras têm surgido, abrangendo vacinas multivalentes de proteínas ou quiméricas, que possam conferir uma melhor proteção que a homóloga univalente (Golshani et al., 2015; Tadepalli et al., 2016).

Ao delinear a proteína quimérica PRB14, criamos uma proteína nova de *Brucella* entretanto, é aconselhável que proteínas quiméricas que envolvam duas ou mais subunidades proteicas formando uma única estrutura antigênica, se realize uma análise estrutural aprofundada (Uppalapati et al., 2014). Tal abordagem será realizada nos estudos futuros.

## 5. CONCLUSÃO

A cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  apresentou resultados bastante promissores como potencial vetor vacinal, uma vez que manteve a atenuação da cepa parental e foi capaz de expressar uma proteína quimérica recombinante. A cepa *B. ovis*  $\Delta abcBA$  PRB14 induziu proteção contra o desafio com patógeno *B. ovis*, entretanto, não demonstrou proteção contra desafio experimental com *B. abortus* e *B. suis*.

## CAPÍTULO V

### Expressão *in vitro* de proteína quimérica recombinante de *Brucella* e seu uso na imunização de camundongos BALB/c

#### 1. INTRODUÇÃO

As medidas de prevenção e controle para brucelose são baseadas em vacinas comerciais efetivas e testes diagnósticos, porém, a doença ainda não foi erradicada (Escalona et al., 2017). Assim, sabendo que a medida mais econômica para a prevenção da infecção animal é a vacinação, tem-se realizado numerosos esforços em pesquisas neste campo, em busca de uma vacina mais segura e eficiente (Nicoletti, 1990; Schurig et al. 2002; Corbel, 2006; Avila-Calderón et al. 2013). Abordagens inovadoras em vacinologia têm sido desenvolvidas a partir de avanços no sequenciamento genômico e proteômico de microorganismos e análise por bioinformática, possibilitando o surgimento de vacinologia reversa (Rappuoli, 2000). A vacinologia reversa tem como princípio a predição por análise *in silico* dos principais genes, proteínas ou peptídeos capazes de induzir resposta imunológica protetora após imunização (Rappuoli e Bagnoli, 2011). Essa ferramenta tem influenciado positivamente o desenvolvimento de novas vacinas de subunidades (Oliveira e Splitter, 1996; Bhattacharjee et al., 2006; Strugnelli et al., 2011; Velikovskiy et al., 2003), de DNA (Liljeqvist e Stahl, 1999; Cassataro et al., 2007), de vetores (Tabynov et al., 2014) e cepas com superexpressão de antígenos (Vemulapalli et al., 2000; Edmonds et al., 2002). Além disso, atualmente tem se investido em vacinas de múltiplos epítomos de DNA (Escalona et al., 2017) e construção de proteína recombinante multi-epitopo com capacidade de induzir resposta imunológica humoral e celular (Yin et al., 2016).

Os numerosos estudos com vacinas de subunidades têm permitido identificar muitas proteínas imunoprotetoras no modelo camundongo, particularmente associadas a proteínas de membrana externa (Omp), Omp31 (Cassataro et al., 2007); Omp19 (Pasquevich et al., 2011); Omp25 (Goel and Bhatnagar, 2012); Omp16 (Pasquevich et al., 2009); Omp28 (Kaushik et al., 2010); Mdh (Lowry et al., 2011), CP24 (Cassataro et al. 2002) e outras.

O objetivo deste trabalho foi identificar por predição *in silico* epítomos imunogênicos de *Brucella* spp., delinear, expressar e purificar uma proteína quimérica recombinante e avaliar seu papel protetor na imunização de camundongos desafiados com cepas virulentas de *Brucella* sp.

#### 2. MATERIAL E MÉTODOS

##### 2.1 CEPAS BACTERIANAS, PLASMÍDEO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Cepas bacterianas utilizadas neste estudo incluem *Escherichia coli* XL-1Blue (Phoneutria, Brasil) e *E. coli* BL21 Star [F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm rne131 (DE3)] (Phoneutria, Brasil).

O plasmídeo utilizado neste estudo foi o pET28a (Genscript, EUA) contendo um gene artificial codificador de uma proteína quimérica recombinante de *Brucella* (PRB14), denominado de pPTQ (proteína quimérica recombinante de *Brucella* PRB14 clonada em pET28a, Genscript, EUA). *E. coli* cepa XL-1Blue foi usada para clonagem do plasmídeo pPRQ e *E. coli* BL21 (DE3) utilizada para a expressão da proteína cresceram rotineiramente á 37°C em ágar ou caldo Luria-Bertani (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) suplementado quando requerido com canamicina (100 µg/mL, Gibco, EUA). As cepas bacterianas utilizadas no experimento de proteção em camundongos foram *B. abortus* 2308 (INTA - Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina), *B. suis* 1330 e *B. ovis* (ATCC25840). Cepas de *Brucella* foram cultivadas em ágar triptona de soja (TSA) a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A cepa *B. ovis* foi crescida em meio TSA com 1% de hemoglobina. O experimento com *B. abortus*

2308 e *B. suis* 1330 foi realizado em laboratório de biossegurança nível 3 (Laboratório de Patologia Molecular, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária, UFMG).

## 2.2 PREDIÇÃO DE EPITOPOS DE CÉLULAS T

O estudo de meta-análise permitiu identificar as principais proteínas imunogênicas estudadas em camundongos nos últimos anos (Carvalho et al., 2016). Assim, selecionamos 32 proteínas, sendo: Omp16, Omp19, Omp25 e Omp31; proteína ribossomal L7/L12; proteína malato desidrogenase (Mdh); proteínas da superfamília HAD; proteína CP24, proteína flagelar FliN e FlgJ; BP26, urease, proteína chaperona Dnak; chaperona SurA, superóxido dismutase Cu–Zn (Sod); lumazina sintase (BLS), cadeia alfa de riboflavina sintase (RS- $\alpha$ ), lumazina sintase 2 (LS-2), di-hidrolipoamida succiniltransferase (E2o), AdoHcyase, CobB, proteína da família do fator transcriptacional AsnC; fosfomanomutase; proteína predita de acil-CoA transferase; proteínas VirB10, VirB9, VirB7; proteína reguladora transcriptacional GntR, proteína de superfície celular 31 kDa (BCSP 31) proteína de choque térmico GroEL, cisteína sintase (cysK), CobB e proteína acessória de uréase (UreD2), que foram utilizadas na predição *in silico*. A predição foi realizada com as sequências de aminoácidos dessas proteínas obtidas do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

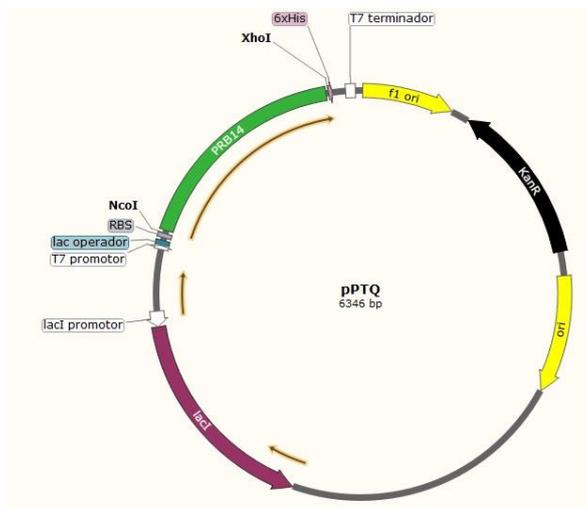
Epitopos para alelos de MHC-I (H-2-Ld e H-2-Kd) e MHC-II (H-2-IAa) de camundongos foram preditos usando o programa NetMHC 3.4 *server* e NetMHCII 2.2 *server*, respectivamente.

## 2.3 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA

Os peptídeos selecionados com forte afinidade a MHC (Tabela 1) foram alinhados e montados com uma sequência linker (GGG) entre dois epitopos. Uma sequência de seis histidinas em tandem foi fusionada ao C-terminal para monitorar a expressão da proteína recombinante quimérica. A otimização dos códons do gene da proteína quimérica foi analisada por [http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_backtranseq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/), a sequência otimizada para *E. coli* foi usada para delineamento da PRB14 expressa em *E. coli*.

## 2.4 CLONAGEM DO GENE CODIFICADOR DE PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE CONSTRUÍDA NO VETOR pPTQ (pET28a)

Este plasmídeo contém o gene de resistência à canamicina, além de sítios para enzimas de restrição. Assim, o gene sintético codificador da proteína quimérica recombinante foi inserido em NcoI e XhoI, fusionado a cauda de seis resíduos de histidina C-terminal (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Plasmídeo de expressão pPTQ usado para expressão de proteína quimérica recombinante PRB14. KanR: cassete de resistência à Canamicina. 6xHis: sequência para expressão de seis histidinas.

## 2.5 ELETROTRANSFORMAÇÃO DE *Escherichia coli* BL21 (DE3)

A proteína recombinante quimérica foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) com cauda de histidina em sua porção C-terminal. Na etapa de transformação o pET-28a (+) contendo o inserto foi inserido em células competentes *E. coli* BL21 (DE3) (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) previamente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por eletroporação usando MicroPulser Electroporation Apparatus (Bio-Rad Laboratories, USA). Para isso,  $40\ \mu\text{L}$  de *E. coli* BL21 (DE3) eletrocompetente foram adicionados a  $1\ \mu\text{L}$  de plasmídeo. Em seguida as amostras foram transferidas para MicroPulser Electroporation Cuvettes (BioRad, EUA) de  $0,1\ \text{cm}$ , e submetidas a um pulso de  $2,5\ \text{kV}$  utilizando o equipamento MicroPulser™ Electroporation Apparatus (BioRad, EUA). Após a eletroporação, foi adicionado  $1\ \text{mL}$  de SOC (2% de triptona, 0.5% de extrato de levedura,  $10\ \text{mM NaCl}$ ,  $2,5\ \text{mM KCl}$ ,  $10\ \text{mM MgCl}_2$ ,  $10\ \text{mM MgSO}_4$  e  $20\ \text{mM}$  glicose) e transferido para um microtubo, seguido por incubação  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora sob agitação em shaker a  $200\ \text{rpm}$ . Após a incubação, a amostra foi plaqueada em meio sólido LB ( $10\ \text{g/L}$  de triptona,  $5\ \text{g/L}$  de extrato de levedura,  $10\ \text{g/L}$  de NaCl,  $15\ \text{g/L}$  de ágar bacteriológico), contendo  $100\ \mu\text{g/mL}$  de canamicina (Gibco, EUA), e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Colônias crescidas em ágar LB contendo canamicina foram selecionadas e congeladas  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior teste de expressão.

## 2.6 CONFIRMAÇÃO POR PCR, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CLONADAS NO VETOR PET-28A

As colônias de *E. coli* BL21 crescidas em ágar LB com canamicina foram submetidas à reação de PCR utilizando  $1\ \mu\text{L}$  do sobrenadante com DNA, adicionado a  $22\ \mu\text{L}$  de mix para PCR comercial (SuperMix; Invitrogen, Brasil),  $1,0\ \mu\text{L}$  de cada iniciador *forward* ( $10\ \text{mM}$ , T7 promotor:  $5'$ -TAATACGACTCACTATAGGG) e iniciador *reverse* ( $10\ \text{mM}$ , RV:  $5'$ -GCTAGTTATTGCTCAGCGG). Parâmetros utilizados foram: desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, e 30 ciclos de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, anelamento a  $55^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 minutos. A PCR foi considerada positiva quando o produto tinha  $1295\ \text{pb}$ .

Um clone foi selecionado para o sequenciamento para confirmação da identidade do gene inserido e verificação da correta fase de leitura. O sequenciamento foi realizado pela empresa Mylles (Belo Horizonte, Brasil) em sequenciador automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3130, utilizando os iniciadores T7 *forward* e *reverse* para o vetor pET28a (+) contendo o inserto. As sequências

obtidas foram analisadas pelo programa de scanner de sequência (Applied Biosystems) (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo>), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e submetidas à pesquisa de similaridade usando o programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>) comparando com o banco de dados da construção da proteína predita adicionada ao inserto.

## 2.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA

Antes do ensaio de expressão, a cepa bactéria congelada foi descongelada e semeada em meio ágar LB com canamicina (100 µg/mL), e incubada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Para a expressão de proteína recombinante quimérica, uma colônia de bactéria isolada crescida em placa ágar de LB com canamicina (100 µg/mL) foi inoculada em 50 mL de meio de cultura LB contendo canamicina (100 µg/mL) e incubada a 37°C sob agitação de 180 rpm por 16 horas. Após esse período, o inóculo foi diluído na proporção de 1:20 em 1000 mL de LB com canamicina (100 µg/mL) e incubada a 37°C, 220 rpm, e cultivada até a densidade óptica (DO<sub>600</sub>) atingir 0,6-0,8, avaliada usando SmartSpec *spectrophotometer* (Bio-Rad, Hercules, CA). Após atingir a OD desejada, a expressão foi induzida com 1mM de isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen, EUA) por 4 horas a 30°C sob agitação a 220 rpm. Após as 4 horas de indução, a cultura foi centrifugada a 4000 x g por 30 minutos a 4°C na centrífuga 5810R (Eppendorf, Alemanha) e em seguida armazenada a -80°C. Alíquotas da cultura antes da adição de IPTG, e após o período de indução foram coletadas e congeladas para utilização como controle de expressão, e amostras de *E. coli* BL21 vazia não induzida e *E. coli* BL21 vazia induzida foram adicionadas como controles.

## 2.8 TESTE DE SOLUBILIDADE

Após a indução, foi coletado 1 mL da cultura para o teste de solubilidade. Foi adicionado Lisozima (Sigma, EUA) a 100 µg/mL, posteriormente submetida a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria à 37°C e passada 10 vezes em seringa de insulina (1 mL/U100, 26G ½”, 0,45x13 mm, BD, Bélgica). A amostra foi centrifugada por 10 minutos à 11.000 x g, para a separação da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) e analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS objetivando avaliar em qual fração se encontrava a proteína.

## 2.9 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A proteína recombinante contendo cauda de His foi purificada usando cromatografia de afinidade em Ni<sup>2+</sup> conjugado com quelante de Sepharose. Após a indução, observou-se que a proteína recombinante foi expressa na forma insolúvel e necessitou de solubilização em 8 M de ureia. O pellet contendo a cultura após a etapa de expressão foi ressuspensionado em 5 mL de tampão de lise [PBS contendo 30 mM de imidazol (Sigma-Aldrich, Brasil), 8 M de ureia, lisozima 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA)] para cada 50 mL de cultura, contendo inibidor de proteases (Sigma, EUA), sendo homogeneizado e deixados em repouso por 30 minutos. Em seguida, o extrato foi lisado no sonicador (Sonics Vibra-Cell VC130, ALT, EUA), realizando 10 ciclos (40% de potência) de 1 minuto intercalando com banho de gelo por 1 minuto. O lisado foi centrifugado a 4.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado (fração solúvel) e filtrado com filtro de seringa 0,45 µm. O lisado filtrado foi então purificado por cromatografia de afinidade no sistema AKTApriime (GE Healthcare, USA), utilizando coluna de afinidade His Trap HP (5 mL, GE Healthcare, UK). A coluna foi previamente lavada com tampão A (PBS contendo 30 mM de imidazol) e a eluição foi feita com tampão B (PBS contendo imidazol 500 mM). As frações obtidas em toda a extensão do pico de absorvância observada na eluição foram analisadas quanto à integridade e pureza da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

## 2.10 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

As amostras coletadas na expressão e purificação foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel de separação a 12% foi preparado utilizando a solução bis-acrilamida (29% de acrilamida - Invitrogen, EUA; 1% N,Nmetileno-bis-acrilamida - Invitrogen, EUA), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Invitrogen, EUA), SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), persulfato de amônio 10% e TEMED 0,05% v/v (Invitrogen, EUA). Em seguida, o gel de concentração a 4% foi preparado de modo semelhante ao de separação, porém utilizando o tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8. As amostras obtidas na expressão, teste de solubilidade e purificação foram adicionadas ao tampão de amostra SDS (25% de solução a 0,5 M Tris-HCl - Invitrogen, EUA, pH 6,8; 20% de glicerol; 4% de betamercaptoetanol; 0,2% de azul de bromofenol; 4% de SDS), aquecidas a 100°C por 5 minutos para desnaturação das proteínas e submetidas em seguida ao SDS-PAGE. Foram utilizados 20 µL de marcador de massa molecular para proteína (SeeBlue™ Plus2, Invitrogen, EUA).

A eletroforese ocorreu em tampão de corrida Tris-glicina pH 8,0 (Tris 25 mM, Glicina 0,25 mM, SDS 0,1%) sob à voltagem de 40V por 1 hora em uma tensão constante de 110V para o restante do tempo de corrida. Após a corrida o gel foi corado por solução de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) por 16 horas e em seguida descorado em solução de etanol 10% e ácido acético 5%, possibilitando a visualização das bandas.

## 2.11 MÉTODO DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As concentrações proteicas das amostras purificadas foram dosadas pelo método colorimétrico do ácido Bicinonínico (BCA) utilizando o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

## 2.12 WESTERN BLOT DE PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA

Foi realizado *Western blot* para confirmar a expressão da proteína recombinante utilizando anticorpo anti-his. Aliquotas de lisado bruto de *E. coli* BL21: vazia não induzida (V-NI); vazia induzida (V-I); contendo o plasmídeo pET28a com inserto não induzida (I-NI); contendo o plasmídeo pET28a com inserto induzida (I-I) e amostra de proteína recombinante purificada foram submetidas ao SDS-PAGE. Tampão de amostra descrito anteriormente foi adicionado às amostras e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida.

Após a separação eletroforética das proteínas em SDS-PAGE, as amostras foram transferidas para membranas de polyvinylidene difluoride (PVDF) com microporos de 45 µm (Immobilon®-P, Millipore, EUA), a 115 V, 350 mA por 1 hora a 4°C, utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BioRad, EUA), imersas em tampão de transferência contendo 48 mM de Tris base, 39 mM de glicina, 20% v/v de álcool metílico. A membrana foi incubada por 1 hora, sob agitação em solução TBS-T [50 mM tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 e 0,1% de Tween-20 (Sigma Life Science, EUA)] com 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, realizou-se três lavagens da membrana com TTBS, por 5 minutos, e em seguida a membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal anti-his 1:2000 (Invitrogen, EUA), diluído em solução de TBS-T contendo 2% de leite desnatado em pó, por 18 horas a 4°C, sob agitação. A membrana foi lavada três vezes com TTBS e incubada com anticorpo secundário policlonal anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (goat anti-mouse IgG-HRP; Sigma, EUA), na diluição 1:2000, diluído em solução TBS-T com 5% de leite desnatado em pó, por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente a membrana foi lavada três vezes com TBS-T e revelada por quimioluminescência com o reagente Luminata Forte (Luminata Forte Western HRP substrate, Merck Millipore, EUA) conforme instruções do fabricante. A foto documentação foi realizada utilizando o equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science, EUA).

## 2.13 RETIRADA DE SAIS DE PROTEÍNA PURIFICADA

Foi realizada a desanilização para a troca de tampões da proteína purificada. O tampão de eluição da proteína contendo 8M de ureia foi substituído por tampão fosfato (PBS 1x). As frações obtidas dessa desanilização foram avaliadas por SDS-PAGE objetivando verificar em qual delas está presente a proteína PRB14 e em seguida dosadas pelo método colorimétrico do ácido Bicinônico (BCA). Foi observada após desanilização uma perda de até 51% comparada ao rendimento inicial.

## 2.14 CAMUNDONGOS

Camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade, originalmente obtidos do Biotério Central da UFMG. Os camundongos foram mantidos sob ótimas condições de higiene, umidade, luz (ciclo artificial de 12 horas escuro/claro) e controle de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Todos os procedimentos experimentais nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (protocolo nº 107/2015). Experimentos de proteção vacinal foram realizados em laboratório de nível 3 de biossegurança. Os animais foram aclimatizados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas uma semana antes da vacinação.

## 2.15 VACINAÇÃO

Para a avaliação da imunogenicidade da proteína quimérica PRB14r, camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade, originalmente obtidos do Biotério Central da UFMG foram mantidos sob ótimas condições de higiene, umidade, luz (ciclo artificial de 12 horas escuro/claro) e controle de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Todos os procedimentos experimentais nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (protocolo nº 107/2015). Experimentos de proteção vacinal foram realizados em laboratório de nível 3 de biossegurança. Os animais foram aclimatizados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas uma semana antes da vacinação. Três grupos com cinco camundongos cada foram imunizados subcutaneamente (s.c.) com duas doses de 30  $\mu\text{g}$  de proteína quimérica PRB14r com Adjuvante de Freud (Sigma-Aldrich, Brasil). No dia 0 utilizou-se Adjuvante de Freud Completo (CFA) (Sigma-Aldrich, Brasil) e no dia 14 utilizou-se Adjuvante de Freud Incompleto (IFA). Camundongos não imunizados receberam PBS (controle negativo n=5) e CFA, no dia 0, e PBS e IFA no dia 14. Trinta dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados com  $10^4$  UFC de *B. abortus* 2308, *B. ovis* (ATCC 25840) e *B. suis* 1330 em 100  $\mu\text{L}$  de PBS intraperitonealmente (i.p.). Duas semanas após desafio, os camundongos foram eutanasiados e baço de cada camundongo foi removido, pesado e homogeneizado em PBS. Diluições seriadas diluídas em PBS e plaqueadas 100  $\mu\text{l}$  em duplicata em ágar TSA com ou sem 1% de hemoglobina, incubadas a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Contagens de UFC foram realizadas após 3 dias de incubação. Níveis de infecção foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão de log UFC/órgão individual.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 PREDIÇÃO DE EPITOPOS

As sequências obtidas no NCBI das seguintes proteínas, Omp16, Omp19, Omp25, Omp31; proteína ribossomal L7/L12; chaperona SurA, superóxido dismutase Cu-Zn (Sod); lumazina sintase (BLS) e outras foram submetidas a análise de predição *in silico* de epitopos de células T. Foram selecionados 14 epitopos de células T (Tabela 1) para MHC de classe I e II. Esses peptídeos eram de origem de 10 proteínas imunogênicas, sendo Omp16, Omp19, Omp31, Mdh, Had superfamily, Predicted acyl-CoA transferase, CP24, Flin, BP26 e Urease. Epitopos com forte afinidade para os alelos H-2-Ld, H-2-Kd e H-2-IA d de camundongos foram preditos e identificados na análise *in silico* (Tabela 5.1). Cabe ressaltar que é a mesma construção usada para expressão em *B. ovis* do capítulo anterior.

**Tabela 5.1.** Epitopos/peptídeos de células T preditos por análise *in silico*.

Nome da proteína	Peptídeo predito	MHC	Alelo	Score	Afinidade
Omp16	SPIAIALFM	MHC I	H-2-Ld	5	forte
Mdh	FYAPAASAI	MHC I	H-2-Kd	7	forte
Superfamília HAD	RPIASLHAL	MHC I	H-2-Ld	13	forte
Omp19	LPPASAPDL	MHC I	H-2-Ld	19	forte
Mdh	MYVGVPTVI	MHC I	H-2-Kd	20	forte
Mdh	IPLPDLVKM	MHC I	H-2-Ld	21	forte
Omp19	FPNAPSTD	MHC I	H-2-Ld	22	forte
Predita acyl-CoA transferase	QFAGGLSYI	MHC I	H-2-Kd	28	forte
CP24	MPINQVANI	MHC I	H-2-Ld	29	forte
FliN	MPVSSLMKL	MHC I	H-2-Ld	35	forte
BP26	SPDMAILNL	MHC I	H-2-Ld	37	forte
Omp31	MFATSAMAADVVVSE	MHC II	H-2-IAd	45.4	forte
Predita acyl-CoA transferase	YSVIAIQSALIMRAR	MHC II	H-2-IAd	46.0	forte
Urease	TFLRAIQTADAMKKA	MHC II	H-2-IAd	46.4	forte

### 3.2 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE PRB14

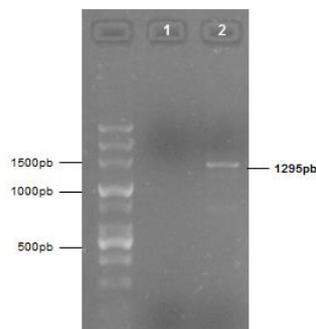
Os 14 epítomos de células T preditos (Tabela 5.1) foram utilizados na construção da proteína quimérica recombinante (PRB14), foram colocados de forma duplicada na construção, além disso, utilizamos uma sequência linker de GGG para conectar os epítomos e fusionamos ao C-terminar uma sequência de seis histidinas em tandem. O design final da proteína está mostrado abaixo (Figura 5.2).

MFYAPAASAIGGGRPIASLHALGGGLPPASAPDLGGGMYVGVPTVIGGGIPLPDLVKMGGGFPN  
 APSTDMSGGQFAGGLSYIGGGMPINQVANIGGGMPVSSLMKLGGGSPDMAILNLGGGMFATSA  
 MAADVVSSEGGGYSVIAIQSALIMRARGGGTFLRAIQTADAMKKAAGGGSPIAIALFMGGGSPIAI  
 ALFMGGGFYAPAASAIGGGRPIASLHALGGGLPPASAPDLGGGMYVGVPTVIGGGIPLPDLVKM  
 GGGFPNAPSTDMSGGQFAGGLSYIGGGMPINQVANIGGGMPVSSLMKLGGGSPDMAILNLGGG  
 MFATSAMAADVVSSEGGGYSVIAIQSALIMRARGGGTFLRAIQTADAMKKAAGGGHHHHHH

**Figura 5.2.** Design final da proteína quimérica recombinante PRB14 com 28 epítomos (vermelho), sequência linker de GGG (preto) e seis histidinas no C-terminal (verde).

### 3.3 CONFIRMAÇÃO DO INSERTO DA SEQUENCIA CODIFICADOR DE PROTEÍNA QUIMÉRICA EM pPTQ

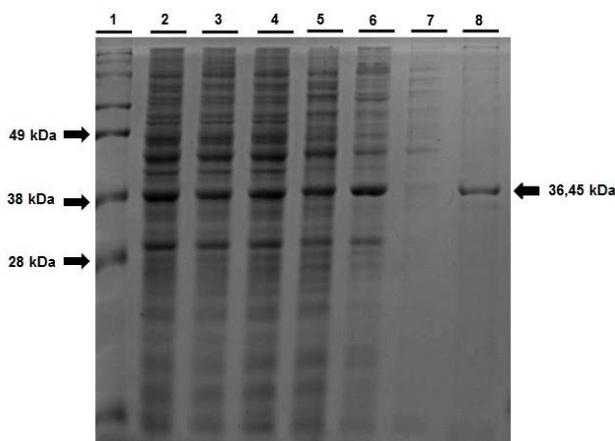
A Figura 5.3 demonstra a reação de PCR utilizando os iniciadores T7 e colônias de bactéria *E. coli* BL21 Star (DE3) obtidas a partir da transformação com o pET28a contendo o gene de interesse para a expressão da proteína recombinante quimérica em *E. coli*. A inserção do gene sintético gerou a amplificação de um fragmento de 1295 pb (Figura 5.3) com esperado. O plasmídeo foi purificado de cultura de *E. coli* BL21 utilizando o kit Qiagen (EUA) e submetido ao sequenciamento por eletroforese capilar para confirmar a clonagem do gene codificador da proteína quimérica no vetor de expressão pET28a. O sequenciamento demonstrou que a inserção estava correta, ou seja, o gene sintético codificador da proteína quimérica recombinante foi inserido em NcoI e XhoI e fusionado a cauda de seis resíduos de histidina C-terminal.



**Figura 5.3.** Análise do produto de PCR gerado a partir da reação de PCR utilizando os iniciadores T7 no vetor pPTQ (pET28a) em gel de agarose a 1,5%. Na canaleta 1 encontra-se o padrão de peso molecular e na canaleta 2 o gene da proteína PRB14 inserido no pET28a.

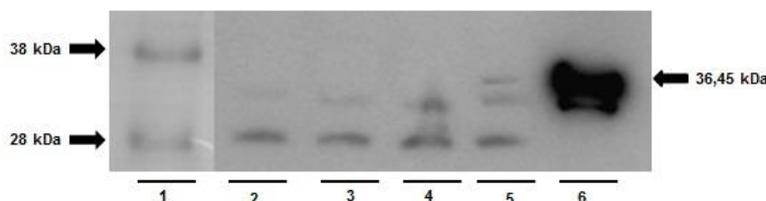
### 3.4 EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E WESTERN BLOT DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Para testar se a proteína PRB14 tinha antígenos protetores para *Brucella*, essa proteína foi clonada e expressa em *E. coli* como proteína recombinante quimérica. A expressão da proteína quimérica foi induzida por IPTG e testada por gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com *Coomassie brilliant blue* e o resultado demonstrou que a proteína PRB14r não apresenta uma banda expressiva (Figura 5.3). Entretanto, a análise por *Western blot* indicou que a proteína foi expressa e apresentava peso molecular esperado 36,45 kDa (Figura 5.5). O sedimento e sobrenadante do lisado bacteriano foi analisado por SDS-PAGE para testar a forma de expressão (Figura 5.4). Assim, após a indução, observou-se que a proteína recombinante foi expressa na forma insolúvel como corpúsculos de inclusão e necessitou de solubilização em 8 M de ureia. A fração solubilizada foi purificada por cromatografia de afinidade com pureza satisfatória conforme demonstrada na Figura 5.4.



**Figura 5.4.** Expressão, análise de solubilidade e purificação da proteína recombinante quimérica PRB14. Proteína quimérica PRB14 foi clonada em plasmídeo de expressão pET28a, transformada em *E. coli* BL21 e induzida com IPTG. Os lisados bacterianos foram analisados por SDS-PAGE 12%, corado com *Coomassie brilliant blue*. (1) Padrão de peso molecular; (2) lisado de *Escherichia coli* BL21 vazia não induzida (V-NI) (3) e induzida (V-I); (4) lisado de *E. coli* contendo o plasmídeo pET28a com inserto não induzida (I-NI) e (5) contendo o plasmídeo pET28a com inserto induzida (I-I), coletados 4 horas após indução; (6) sedimento bacteriano lisado; (7) sobrenadante de cultura lisado; (8) proteína PRB14r purificada.

A identificação do purificado PRB14r foi confirmada por Western blot (Figura 5.5), revelando a reatividade específica do anticorpo com a proteína purificada produzida em *E. coli*, confirmando a eficiência desse sistema de expressão em procaríotos. A quantidade de proteína expressa foi estimada por Kit BCA como 179,31 µg/mL.



**Figura 5.5.** Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina (6X). (1) Padrão de peso molecular; (2) lisado de *Escherichia coli* BL21 vazia não induzida (V-NI) (3) e induzida (V-I); (4) lisado de *E. coli* contendo o plasmídeo pET28a com inserto não induzida (I-NI) e (5) contendo o plasmídeo pET28a com inserto induzida (I-I), 4 horas após indução; (6) proteína PRB14r purificada.

### 3.5 PROTEÇÃO DE CAMUNDONGOS APÓS DESAFIO

Para determinar se a imunização subcutânea de camundongos BALB/c com PRB14r foi capaz de conferir proteção contra infecção *B. abortus*, *B. suis* e *B. ovis* todos camundongos foram eutanasiados duas semanas após desafio. A vacina com a proteína PRB14r não proporcionou proteção contra infecção por *B. abortus*, *B. ovis* e *B. suis* em camundongos, não demonstrou diferença significativa de proteção comparada aos animais que receberam PBS e adjuvante.

## 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, realizamos a construção de uma proteína quimérica recombinante de *Brucella* contendo epítopos de células T, por meio de ferramentas de bioinformática de predição e produção em sistema de expressão de procaríotos, objetivando a sua utilização como vacina. Para examinar o potencial vacinal de PRB14r, estudo de proteção foi realizado e avaliamos a carga bacteriana em camundongos imunizados. Grupos de camundongos imunizados com o antígeno PRB14r com adjuvante não mostraram diferença no número de bactérias recuperadas do baço, comparada aos camundongos não vacinados. Nesse trabalho nós hipotetizamos que a proteína quimérica produzida poderia ser imunogênica por conter epítopos de proteínas que protegem contra brucelose no camundongo. Porém, nossa proteína quimérica falhou como uma promissora vacina protetora contra infecção por *Brucella*, uma vez que não conseguiu reduzir a carga bacteriana esplênica nos camundongos imunizados. A razão para isso ainda precisa ser investigada, no entanto, tem grande importância a seleção dos imunógenos envolvidos na eficiente e significativa resposta imunológica, comparável as vacinas de cepas atenuadas de *Brucella* em uso (Zhan et al., 1993). As vacinas atuais de cepas atenuadas utilizadas no controle de brucelose animal têm sido eficientes, entretanto, possuem algumas desvantagens como causar aborto em fêmeas imunizadas e ser patogênica para o ser humano (Dorneles et al., 2015). As vacinas de subunidades e com proteínas recombinantes ou múltiplos epítopos tem sido estudada como uma alternativa promissora e segura (Zhan et al., 1993). Essas vacinas multivalentes ou de proteínas quiméricas podem proporcionar uma melhor proteção, comparada a vacina homóloga univalente contra a infecção com cepas virulentas (Golshani et al., 2015; Tadepalli et al., 2016), desde que realizada a correta identificação das moléculas fundamentais para a eficiente resposta imune desejada.

Sabe-se que a resposta Th1 mediada por epítopos de MHC-II é fundamental na proteção contra infecção de *Brucella* (He, 2012). Entretanto, nesse estudo, apenas três epítopos eram de MHC-II, oriundos das

proteínas Omp31, predita acyl-CoA transferase e urease, fato atribuído a ausência de demais epítomos preditos com forte ligação ao MHC *in silico*. Várias proteínas de *Brucella* têm sido investigadas como antígenos com potencial efeito protetivo contra brucelose, entre elas a proteína Omp31 mostrou boa resposta humoral e de proteção contra *Brucella* em camundongos, entretanto alguns peptídeos podem estar mais expostos em *B. ovis* e mais ocultos em *B. melitensis* (Cassataro et al., 2007). Cassataro e colaboradores (2007) em seu estudo com a proteína quimérica rBLSOmp31, obtiveram excelente índice de proteção para infecção com *B. ovis*, níveis similares aos obtidos com a cepa vacinal *B. melitensis* Rev.1, entretanto a proteína quimérica induziu níveis menores de proteção contra infecção de *B. melitensis*. Outro estudo demonstrou índice de proteção de 4,02 log contra *B. canis*, em camundongos BALB/c imunizados com rBLSOmp31 e adjuvante incompleto de Freud (IFA) (Clausse et al., 2013).

Nesse estudo, foram utilizados epítomos de diversas proteínas, que incluem Omp16, Omp19, BP26, FliN, Mdh e urease. A proteína Omp16 tem sido demonstrada ser altamente conservada entre  $\alpha$ -Proteobacteria, e sua utilização como vacina de subunidade em camundongos C57BL/6, na ausência de adjuvante, demonstrou proteção (1,15 log) na infecção de *B. abortus* (Pasquevich et al., 2010). A proteína Mdh quando utilizada na imunização de camundongos, demonstrou diminuição da colonização bacteriana no baço de camundongos (2,75 log) (Lowry et al., 2011). Resultados similares com vacinas de subunidades em camundongos tem sido demonstrado para as demais proteínas selecionadas, Omp19 (Tadepalli et al., 2016), BP26 (Yao et al., 2015), FliN (Li et al., 2012) e urease (Abkar et al., 2018).

No experimento de proteção em camundongos realizado nesse trabalho, algumas variáveis importantes e que podem influenciar o índice de proteção foram padronizadas de acordo com o nosso trabalho de meta-análise realizado no modelo murino (Carvalho et al., 2016). Incluem nessas variáveis o número de imunizações e o uso do adjuvante. Assim, ficou estabelecido duas imunizações associada ao uso de adjuvante. No entanto, mesmo seguindo os resultados da meta-análise, não foi possível ter um índice de proteção significativo com a nossa vacina, isso sugere que diferentes fatores podem estar envolvidos, como a quantidade de proteína, número e tipo de antígenos (Hop et al., 2018). Além disso, a combinação de múltiplos antígenos pode desencadear um fenômeno de interferência imunológica associada com a competição entre antígenos expressos nessas vacinas (Hunt et al., 2001).

Para a clonagem e expressão em *E. coli* da PRB14r foi utilizado o sistema pET (Novagen, 2011), assim, nosso plasmídeo construído pPTQ foi transferido para *E. coli* BL21 (DE3) contendo T7 RNA polimerase, e a expressão induzida por IPTG foi eficiente com rendimento moderado de produção proteica, se tratando de proteína quimérica recombinante.

## 5. CONCLUSÃO

Devido às características imunogênicas reportadas para as proteínas utilizadas na predição *in silico*, delineamos uma proteína quimérica recombinante, com o objetivo principal de avaliação de sua eficiência na indução de resposta protetiva na infecção de *Brucella* em camundongos BALB/c. Entretanto, esta proteína não se mostrou protetiva contra a infecção por *B. abortus*, *B. ovis* e *B. suis* em camundongos. Cabe ressaltar que a mesma proteína quimérica recombinante foi testada anteriormente no vetor *B. ovis*  $\Delta abcBA$  e não demonstrou proteção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABKAR, M.; FASIHI-RAMANDI, M.; KOOSHKI, H. et al. Intraperitoneal immunization with Urease loaded N-trimethyl Chitosan nanoparticles elicits high protection against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infections. *Immunol. Lett.*, pii: S0165-2478, (17), p.30588-30596, 2018.
2. ABKAR, M.; LOTFI, A.S.; AMANI, J. et al. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: influence of nanoparticulation versus traditional immunization. *Vet. Res. Commun.*, v.39, n.4, p.217-228, 2015.
3. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacterioses e micosis. 3.ed. Washington: OPAS, 416, 2001.
4. AFLEY, P.; DOHRE, S.K.; PRASAD, G.B. et al. Prediction of T cell epitopes of *Brucella abortus* and evaluation of their protective role in mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.99, n.18, p.7625-7637, 2015.
5. AIN, R.; CANHAM, L.N.; SOARES, M.J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev. Biol.*, v. 260, p.179-190, 2003.
6. ALLEN, C.A.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.*, v.66, p.1008-1016, 1998.
7. AL-MARIRI, A.; TIBOR, A.; LESTRATE, P. et al. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* Bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.*, v.70, n.4, p.1915-1923, 2002.
8. AL-MARIRI, A.; TIBOR, A.; MERTENS, P. et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect. Immun.*, v.69, p.6264-6270, 2001.
9. ALTON, G.G.; ELBERG, S.S.; CROUSH, D. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. The stability of the degree of attenuation. *J. Comp. Pathol.*, v.77, n.3, p.293-300, 1967.
10. ANDERSEN-NISSEN, E.; SMITH, K.D.; STROBE, K.L. et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, p.9247-9252, 2005.
11. ANDERSON, T.D.; MEADOR, V.P.; CHEVILLE, N.F. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Vet. Pathol.*, v.23, p.219226, 1986.
12. ARENAS, G.N.; STASKEVICH, A.S.; ABALLAY, A. et al. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, v.68, p.4255-4263, 2000.
13. ARENAS-GAMBOA, A.M.; FICHT, T.A.; KAHL-MCDONAGH, M.M. et al. Immunization with a single dose of a microencapsulated *Brucella melitensis* mutant enhances protection against wild-type challenge. *Infect. Immun.*, v.76, n.6, p.2448-2455, 2008.
14. ASHFORD, D.A.; DI PIETRA, J.; LINGAPPA, J. et al. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v.22, p.3435-3439, 2004.
15. AVILA-CALDERÓN, E.D.; LOPEZ-MERINO, A.; SRIRANGANATHAN, N. et al. A history of the development of *Brucella* vaccines. *Biomed. Res. Int.*, 2013, 743509, 2013.
16. AYGEN, B.; SUMERKAN, B.; DOGANAY, M. et al. Prostatitis and hepatitis due to *Brucella melitensis*: a case report. *J. Infect.*, v.36, n.1, p.111-112, 1998.
17. BABIUK, L.A. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine*, v.17, p.1587-1595, 1999.
18. BALDI, P.C.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. Pathogenesis and pathobiology of zoonotic brucellosis in humans. *Rev. Sci. Tech.*, v.32, n.1, p.117-125, 2013.

19. BALDWIN, C.L.; GOENKA, R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit. Rev. Immunol.*, v.26, p.407-442, 2006.
20. BALDWIN, C.L.; JIANG, X.; FERNANDES, D.M. Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of cytokines and iron. *Trends Microbiol.*, v.1, p.99-104, 1993.
21. BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.367-382, 2002.
22. BARRIO, M.B.; GRILLO, M.J.; MUNOZ, P.M. et al. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, v.27, 1741e9, 2009.
23. BECKETT, F.W.; MACDIARMID, S.C. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *Br. Vet. J.*, v.141, p.507-514, 1985.
24. BELLAIRE B.H.; ROOP, R.M.; CARDELLI, J.A. Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect. Immun.*, v.73, p.3702-3713, 2005.
25. BHATTACHARJEE, A.K.; IZADJOO, M.J.; ZOLLINGER, W.D. et al. Comparison of protective efficacy of subcutaneous versus intranasal immunization of mice with a *Brucella melitensis* lipopolysaccharide subunit vaccine. *Infect. Immun.*, v.74, p.5820-5825, 2006.
26. BLASCO, J.M. A review of the use of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, v.31, p.275-283, 1997.
27. BOSCHIROLI, M.L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.4, p.58-64, 2001.
28. BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V. et al. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v.99, p.1544-1549, 2002.
29. BOWDEN, R.A.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S. et al. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immune sorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.*, v.63, p.3945-3952, 1995.
30. BRANDÃO, A.; OLIVEIRA, F.; CARVALHO, N. et al. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- $\gamma$  knockout than IL-12/ $\beta$  2-microglobulin double-deficient mice. *Clin. Dev. Immunol.*, v.2012, 589494, 2012.
31. BROWN, G.M.; PIETZ, D.E.; PRICE, D.A. Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Vet.*, v.63, p.29-40, 1973.
32. BYNDLOSS M. X.; TSOLIS R. M. *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v.4, p.111-127, 2016.
33. CABRERA, A.; SÁEZ, D.; CÉSPEDES, S. et al. Vaccination with recombinant Semliki Forest virus particles expressing translation initiation factor 3 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Immunobiology*, v.214, n.6, p.467-474, 2009.
34. CANNING, P.C.; ROTH, J.A.; DEYOE, B.L. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J. Infect. Dis.*, v.154, p.464-470, 1986.
35. CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N. et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rum. Res.*, v.102, n.2, p.213-222, 2012.
36. CARVALHO NETA, A.V.; MOL, J.P.; XAVIER, M.N. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, v.184, p.146-155, 2010.
37. CARVALHO NETA, A.V.; STEYNEN, A.P.R.; PAIXÃO, T.A. et al. Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.76, p.1897-1907, 2008.

38. CARVALHO, T.F.; HADDAD, J.P.A.; PAIXÃO, T.A. et al. Meta-Analysis and Advancement of Brucellosis Vaccinology. *PLoS ONE*, v.11, n.11, e0166582, 2016.
39. CASCIO, A.; BOSILKOVSKI, M.; RODRIGUEZ-MORALES, A.J. et al. The socio-ecology of zoonotic infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.17, n.3, p.336-342, 2011.
40. CASSATARO, J.; ESTEIN, S.M.; PASQUEVICH, K.A. et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect. Immun.*, v.73, n.12, p.8079-8088, 2005.
41. CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K.A.; ESTEIN, S.M. et al. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev. 1 vaccination. *Vaccine*, v.25, n.32, p.5958-5967, 2007.
42. CASSATARO, J.; VELIKOVSKY, C.A.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. et al. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. *Vaccine*, v.20, n.11-12, p.1660-1669, 2002.
43. CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M. et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, v.198, p.545-556, 2003.
44. CELLI, J.; SALCEDO, S.P.; GORVEL, J.P. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, p.1673-1678, 2005.
45. CHEERS, C. Pathogenesis and cellular immunity in experimental murine brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, v.56, p.237-246, 1984.
46. CHEN, F.; HE, Y. Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*. *PLoS ONE*, v.4, n.8, e6830, 2009.
47. CHEVILLE N.F.; JENSEN, A.E.; HALLING, S.M. et al. Bacterial survival, lymph node changes and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.1881-1888, 1992.
48. CHEVILLE, N.F.; STEVENS, M.G.; JENSEN, A.E. et al. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.1591-1597, 1993.
49. CIRL, C.; WIESER, A.; YADAV, M. et al. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat. Med.*, v.14, p.399-406, 2008.
50. CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; GHERSI, G. et al. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine*, v.31, n.51, p.6129-6135, 2013.
51. COMERCI, D.J.; MARTINEZ-LORENZO, M.J.; SIEIRA, R. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol.*, v.3, p.159-168, 2001.
52. COPIN, R.; De BAETSELIER, P.; CARLIER, Y. et al. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY 6C<sup>+</sup> dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J. Immunol.*, v.178, p.5182-5191, 2007.
53. CORBEL, M.J. Brucellosis in Humans and Animals. WHO Press, World Health Organization, Switzerland, 2006.
54. CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, p.213-221, 1997.
55. CURINA, G.; NARDINI, R.; CORNELI, S. et al. Evaluation of immune responses in mice and sheep inoculated with a live attenuated *Brucella melitensis* REV1 vaccine produced in bioreactor. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.198, p.44-53, 2018.
56. DANESE, I.; HAINE, V.; DELRUE, R.M. The Ton system, an ABC transporter, and a universally conserved GTPase are involved in iron utilization by *Brucella melitensis* 16M. *Infect. Immun.*, v.72, p.5783-5790, 2004.
57. DE FIGUEIREDO, P.; FICHT, T.; RICE-FICHT, A. et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis review of *Brucella*-Host interactions. *Am. J. Pathol.*, v.185, p.1505-1517, 2015.
58. DELRUE, R.M.; MARTINEZ-LORENZO, M.; LESTRATE, P. et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol.*, v.3, p.487-497, 2001.

59. DEN HARTIGH, A.B.; SUN, Y.-H.; SONDERVAN, D. et al. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.72, p.5143-5149, 2004.
60. DEQU, S.; DONGLOU, X.; JIMING, Y. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.165-182, 2002.
61. DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.*, v.58, p.2320-2328, 1990.
62. DORNELES, E.M.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A.P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet. Res.*, 46, p.76, 2015.
63. EDMONDS, M.; BOOTH, N.; HAGIUS, S. et al. Attenuation and immunogenicity of a *Brucella abortus* htrA cycL double mutant in cattle. *Vet. Microbiol.*, v.76, n.1, p.81-90, 2000.
64. EDMONDS, M.D.; CLOECKAERT, A.; ELZER, P.H. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet Microbiol.*, v.88, n.3, p.205-221, 2002.
65. ELZER, P. H.; HAGIUS, S. D.; DAVIS, D. S. et al. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, n. 1, p.25-31, 2002.
66. ELZER, P.H., ENRIGHT, F.M., COLBY, L. et al. Protection against infection and abortion induced by virulent challenge exposure after oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.1575-1578, 1998.
67. ENRIGHT, F.M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: K. NIELSEN, K.; DUNCAN, R. Animal brucellosis. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1990. p.301-320.
68. ESCALONA, E.; SÁEZ D.; OÑATE A. Immunogenicity of a Multi-Epitope DNA Vaccine Encoding Epitopes from Cu-Zn Superoxide Dismutase and Open Reading Frames of *Brucella abortus* in Mice. *Front. Immunol.*, v.8, n.125, p.1-10, 2017.
69. ESTEIN, S.M.; CASSATARO, J.; VIZCAÍNO, N. et al. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect.*, v.5, p.85-93, 2003.
70. ESTEIN, S.M.; FIORENTINO, M.A.; PAOLICCHI, F.A. et al. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, v.27, p.6704-6711, 2009.
71. EZE, M.O.; YUAN, L.; CRAWFORD, R.M. et al. Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infect. Immun.*, v.68, p.257-263, 2000.
72. FERNANDES, D.M.; BALDWIN, C.L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.63, p.1130-1133, 1995.
73. FERNANDEZ-PRADA, C.M.; NIKOLICH, M.; VEMULAPALLI, R. et al. Deletion of wboA enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, v.69, p.4407-4416, 2001.
74. FERNANDEZ-PRADA, C.M.; ZELAZOWSKA, E.B.; NIKOLICH, M. et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect. Immun.*, v.71, p.2110-2119, 2003.
75. FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO, J.M. et al. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rum. Res.*, v.29, p.13-19, 1998.
76. FICHT, T.A. Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational analysis. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.311-315, 2002.
77. FICHT, T.A.; KAHL-MCDONAGH, M.M.; ARENAS-GAMBOA, A.M. et al. Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine*, v.27, n.4, p.40-43, 2009.
78. FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIERA, P. et al. IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.*, v.146, p.3444-3451, 1991.
79. FIORENTINO, M.A.; CAMPOS, E.; CRAVERO, S. et al. Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2. *Vet. Microbiol.*, v.132, p.302-311, 2008.

80. FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.57, Pt 11, p.2688-2693, 2007.
81. FU, S.; XU, J.; LI, X. et al. Immunization of mice with recombinant protein CobB or AsnC confers protection against *Brucella abortus* infection. *PlosOne*, v.7, n.2, e29552, 2012.
82. GHASEMI, A.; JEDDI-TEHRANI, M.; MAUTNER, J. et al. Immunization of mice with a novel recombinant molecular chaperon confers protection against *Brucella melitensis* infection. *Vaccine*, v.32, n.49, p.6659-6666, 2014.
83. GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.*, v.36, p.313-326, 2005.
84. GOEL, D.; BHATNAGAR, R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects BALB/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol. Immunol.*, v.51, n.2, p.159-168, 2012.
85. GOEL, D.; RAJENDRAN, V.; GHOSH, P.C. et al. Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent *Brucella abortus* 544. *Vaccine*, v.31, n.8, p.1231-1237, 2013.
86. GOLDSTEIN, J.; HOFFMAN, T.; FRASCH, C. et al. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect. Immun.*, v.60, p.1385-1389, 1992.
87. GOLSHANI, M.; GHASEMIAN, M.; GHEIBI, N. et al. *In silico* design, and *in vitro* expression of a fusion protein encoding *Brucella abortus* L7/L12 and SOmp2b Antigens. *Adv. Biomed. Res.*, v.16, n.7, p.21, 2018.
88. GOLSHANI, M.; RAFATI, S.; SIADAT, S.D. et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNA vaccine encoding *Brucella* L7/L12-truncated Omp31 fusion protein by a DNA priming and protein boosting regimen. *Mol. Immunol.*, v.66, p.384-391, 2015.
89. GOMEZ, G.; ADAMS, L.G.; RICE-FICHT, A. et al. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Front Cell Infect. Microbiol.*, v.3, p.17, 2013.
90. GONZALEZ, D.; GRILLO, M. J.; DE MIGUEL, M. J. et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and o-polysaccharide synthesis and export. *PLoS ONE*, v.3, e2760, 2008.
91. GRÉGOIRE, F.; MOUSSET, B.; HANREZ, D. et al. A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Vet. Res.*, v.8, p.80, 2012.
92. GRILLÓ, M.J.; BLASCO, J.M.; GORVEL, J.P. et al. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet. Res.*, v.43, n.29, p.1-35, 2012.
93. GRILLÓ, M.J.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P.M. et al. Efficacy of several antibiotic combinations against *Brucella melitensis* Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.58, n.3, p.622-626, 2006.
94. GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M. et al. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, v.27, p.187-191, 2009.
95. GROSS, A.; SPIESSER, S.; TERRAZA, A. et al. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis* infected murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.66, p.1309-1316, 1998.
96. GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A. et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.12375-12380, 2002.
97. HAAG, A.; MYKA, K.; ARNOLD, M.F. et al. Importance of lipopolysaccharide and cyclic  $\beta$ -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. *Int. J. Microbiol.*, v.2010, 124509, 2010.
98. HAMDY, M.E.; EL-GIBALY, S.M.; MONTASSER, A.M. Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3. *Vet. Microbiol.*, v.88, p.85-94, 2002.
99. HARMS, J.S.; DURWARD, M.A.; MAGNANI, D.M. et al. Evaluation of recombinant invasive, non-pathogenic *Escherichia coli* as a vaccine vector against the intracellular pathogen, *Brucella*. *J. Immune Based Ther Vaccines*, v.7, p.1, 2009.

100. HE Y. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Front Cell Infect. Microbiol.*, v.2, p.2, 2012.
101. HE, Y.; REICHOW, S.; RAMAMOORTHY, S. et al. *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages. *Infect. Immun.*, v.74, n.9, p.5035-5046, 2006.
102. HE, Y.; VEMULAPALLI, R.; SCHURIG, G.G. Recombinant *Ochrobactrum anthropi* expressing *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase protects mice against *B. abortus* infection only after switching of immune responses to Th1 type. *Infect. Immun.*, v.70, n.5, p.2535-2543, 2002.
103. HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.*, v.5, p.971-974, 2004.
104. HOFFMANN, E.M.; HOULE, J.J. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. *Crit. Rev. Microbiol.*, v.21, p.153-163, 1995.
105. HOFFMANN, E.M.; HOULE, J.J. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.5, p.65-76, 1983.
106. HONG, P.C.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, v.68, p.4102-4107, 2000.
107. HOP, H.T.; ARAYAN, L.T.; HUY, T.X.N. et al. Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. *Vaccine*, v.36, n.21, p.3027-3033, 2018.
108. HU, X.D.; CHEN, S.T.; LI, J.Y. et al. An IL-15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against *Brucella* by increasing the CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell response. *Vaccine*, v.28, n.12, p.2408-2415, 2010.
109. HUNT, J.; BROWN, L.; JACKSON, D. Antigenic competition. In: Encyclopedia of Life Sciences, Chichester (UK): John Wiley & Sons Ltd; 2001: p. 1–6.
110. IANNINO, F.; HERRMANN, C.K.; ROSET, M.S. et al. Development of a dual vaccine for prevention of *Brucella abortus* infection and *Escherichia coli* O157:H7 intestinal colonization. *Vaccine*, v.33, n.19, p.2248-2253, 2015.
111. IVANOV, A.V.; SALMAKOV, K.M.; OLSEN, S.C et al. A live vaccine from *Brucella abortus* strain 82 for control of cattle brucellosis in the Russian Federation. *Anim. Health Res. Rev.*, v.12, p.113-121, 2011.
112. IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, v.5, p.987-995, 2004.
113. JACK, D.L.; DODDS, A.W.; ANWAR, N. et al. Activation of complement by mannose bindinglectin on isogenic mutants of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Immunol.*, v.160, p.1346-1353, 1998.
114. JACQUES, I.; GRAYON, M.; VERGER, J.M. Oxidative metabolic profiles of *Brucella* strains isolated from marine mammals: contribution to their species classification. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.270, p.245-249, 2007.
115. JAIN, S.; AFLEY, P.; DOHRE, S.K. et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*, v.32, n.35, p.4537-4542, 2014.
116. JAIN, S.; KUMAR, S.; DOHRE, S.; AFLEY, P. et al. Identification of a protective protein from stationary-phase exoproteome of *Brucella abortus*. *Pathog. Dis.*, v.70, n.1, p.75-83, 2014.
117. JENNER, D.C.; DASSA, E.; WHATMORE, A.M. ATP-Binding Cassette Systems of *Brucella*. *Comp. Funct. Genomics*, v.2009, p.354649, 2009.
118. JIANG, X.; BALDWIN, C.L. Effect of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.61, p.124-129, 1993.
119. JIANG, X.; LEONARD, B.; BENSEN, R. et al. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol.*, v.151, p.309-319, 1993.
120. JIMENEZ DE BAGUÉS, M.P.; ELZER, P.H.; JONES, S.M. et al. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect. Immun.*, v.62, p.4990-4996, 1994.

121. JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P.; TERRAZA, A.; GROSS, A. et al. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect. Immun.*, v.72, n.4, p.2429-2433, 2004.
122. JOINER, K.A. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing and on the mechanism of action of bactericidal antibody. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.121, p.99-133, 1985.
123. JONES, S.M.; WINTER, A.J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v.60, p.3011-3014, 1992.
124. KAHL-MCDONAGH, M.M.; ELZER, P.H.; HAGIUS, S.D. et al. Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine*, v.24, p.5169-5177, 2006.
125. KAHL-MCDONAGH, M.M.; FICHT TA. Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, v.74, n.7, p.4048-4057, 2006.
126. KAUSHIK, P.; SINGH, D.K.; KUMAR, S.V. et al. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant Omp28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet. Res. Commun.*, v.34, n.2, p.119-132, 2010.
127. KEPPIE, J.; WILLIAMS, A.E.; WITT, K. et al. The role of erythritol in tissue localization of the Brucellae. *Br. J. Experim. Pathol.*, v.46, p.104-108, 1965.
128. KIM, S.; LEE, D.S.; WATANABE, K. et al. Interferon- $\gamma$  promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol.*, v.5, p.22, 2005.
129. KO, J.; SPLITTER, G.A. *Brucella abortus* tandem repeated ATP-binding proteins, BapA and BapB, homologs of *Haemophilus influenzae* LktB, are not necessary for intracellular survival. *Microb. Pathog.*, v.29, p.245-253, 2000.
130. KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, p.65-78, 2003.
131. KRISHNAN, L.; GUILBERT, L.J.; RUSSELL, A.S. et al. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.*, v.156, p.644-652, 1996.
132. LALSAMTHARA, J.; LEE, J.H. *Brucella* lipopolysaccharide reinforced *Salmonella* delivering *Brucella* immunogens protects mice against virulent challenge. *Vet. Microbiol.*, v.205, p.84-91, 2017.
133. LAPAQUE, N.; TAKEUCHI, O.; CORRALES, F. et al. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol.*, v.8, p.401-413, 2006.
134. LEAN, I.J.; RABIEE, A.R.; DUFFIELD, T.F. et al. Invited review: Use of meta-analysis in animal health and reproduction: methods and applications. *J. Dairy Sci.*, v.92, n.8, p.3545-3565, 2009.
135. LESTRATE, P.; DELRUE, R.M.; DANESE, I. et al. Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol. Microbiol.*, v.38, n.3, p.543-551, 2000.
136. LETSSON, J.J.; BARBIER, T.; ZÚÑIGA-RIPA, A. et al. *Brucella* genital tropism: what's on the menu. *Front. Microbiol.*, v.8, p.506, 2017.
137. LEVITZ, S.M.; GOLENBOCK, D.T. Beyond empiricism: informing vaccine development through innate immunity research. *Cell*, v.148, p.1284-1292, 2012.
138. LI, X.; XU, J.; XIE, Y. et al. Vaccination with recombinant flagellar proteins FlgJ and FljN induce protection against *Brucella abortus* 544 infection in BALB/c mice. *Vet. Microbiol.*, v.161, n.1-2, p.137-44, 2012.
139. LI, Z.Q.; SHI, J.X.; FU, W.D. et al. A *Brucella melitensis* M5-90 wboA deletion strain is attenuated and enhances vaccine efficacy. *Mol. Immunol.*, v.66, n.2, p.276-283, 2015.
140. LILJEQVIST, S.; STÅHL, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.*, v.73, p.1-33, 1999.
141. LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L. et al. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.329-339, 2002.

142. LOWRY, J.E.; ISAAK, D.D.; LEONHARDT, J.A. et al. Vaccination with *Brucella abortus* recombinant in vivo induced antigens reduces bacterial load and promotes clearance in a mouse model for infection. *PLoS One*, v.6, n.3, e17425, 2011.
143. MACÊDO, A.A.; SILVA, A.P.C.; MOL, J.P.S. et al. The abcEDCBA-encoded ABC transporter and the virB operon-encoded type IV secretion system of *Brucella ovis* are critical for intracellular trafficking and survival in ovine monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, v.10, n.9, e0138131, 2015.
144. MARIN, C.M.; BARBERAN, M.; JIMENEZ DE BAGUES, M.P. et al. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, v.48, n.2, p.209-215, 1990.
145. MENSE, M.G.; VAN DE VERG, L.L.; BHATTACHARJEE, A.K. et al. Bacteriologic and histologic features in mice after intranasal inoculation of *Brucella melitensis*. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.398-405, 2001.
146. MÉRESSE, S.; STEELE-MORTIMER, O.; MORENO, E. et al. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nature Cell Biol.*, v.1, p.E183-E188, 1999.
147. MIRANDA, K.L.; DORNELES, E.M.S.; PAULETTI, R.B. et al. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: Evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1®) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine*, v.33, p.507-511, 2015.
148. MONREAL, D.; GRILLO, M.J.; GONZALEZ, D. et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect. Immun.*, v.71, p.3261-3271, 2003.
149. MONTARAZ, J.A.; WINTER, A.J.; HUNTER, D.M. et al. Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, v.51, p.961-963, 1986.
150. MORIYON, I. Against Gram-negative bacteria: the LPS case. In: TOWN G. Intracellular Pathogens in membrane interactions and vacuole biogenesis. Texas: Landes Bioscience/Eurekah.com. 2003. p.204-230.
151. MORIYON, I.; GRILLO, M.J.; MONREAL, D. et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, v.35, n.1, p.1-38, 2004.
152. MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, p.958-969, 2008.
153. MURPHY, E.A.; SATHIYASEELAN, J.; PARENT, M.A. et al. Interferon gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*, v.103, p.511-518, 2001.
154. MYENI, S.; CHILD, R.; NG, T.W. et al. *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS Pathog.*, v.9, e1003556, 2013.
155. NENE, V.; KOLE, C. Genome mapping and genomics in animal-associated microbes. 1 ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2009.
156. NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v.9, n.6, p.255-262, 1988.
157. NICOLETTI, P. Vaccination against *Brucella*. *Adv. Biotechnol. Processes*, v.13, p.147-168, 1990.
158. NICOLETTI, P. Vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19 administered by differing routes and doses. *Vaccine*, v.2, n.2, p.133-135, 1984.
159. NOL, P.; OLSEN S.C.; RHYAN J.C. et al. Vaccination of elk (*Cervus canadensis*) with *Brucella abortus* strain RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes does not induce adequate protection against experimental *Brucella abortus* challenge. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v.6, n.10, p.1-10, 2016.
160. Novagen user protocol TB055 Rev. C 0611JN, pET system manual. 11th Edition. Germany: EMD Chemicals Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt; p. 4, 2011.
161. O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A. et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.*, v.33, p.1210-1220, 1999.

162. OIE Biological Standards Commission, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6ed. Paris: World Organisation for Animal Health, 2008.
163. OIE Terrestrial Manual, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017. 1ed. Paris: World Organisation for Animal Health, 2016.
164. OLIVEIRA, S.C.; SPLITTER, G.A. CD8<sup>+</sup> type 1 CD44<sup>hi</sup> CD45 RB<sup>lo</sup> T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, v.25, p.2551-2557, 1995.
165. OLIVEIRA, S.C.; SPLITTER, G.A. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*, v.14, p.959-962, 1996.
166. OLSEN, S.C.; BRICKER, B.; PALMER, M.V. et al. Respostas de bovinos a duas dosagens de *Brucella abortus* estirpe RB51: sorologia, depuração e eficácia. *Res. Vet. Sci.*, v.66, p.101-105, 1999.
167. OLSEN, S.C. Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination. *Rev. Sci. Tech.*, v.32, n.1, p.207-217, 2013.
168. OLSEN, S.C.; MCGILL, J.L.; SACCO, R.E. et al. Immune responses of bison and efficacy after booster vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, p.440-447, 2015.
169. OLSEN, S.C.; STOFFREGEN, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert. Rev. Vaccines*, v.4, p.915-928, 2005.
170. ONATE, A.A.; VEMULAPALLI, R.; ANDREWS, E. et al. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect Immun.*, v.67, p.986-988, 1999.
171. PAIXÃO, T. A.; ROUX, C.M.; DEN HARTIGH, A.B. et al. 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, p.4197-4208, 2009.
172. PAPPAS, G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.36, n.1, p.S8-S11, 2010.
173. PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet. Infect. Dis.*, v.6, p.91-99, 2006.
174. PARK, H.J.; PARK, S.J.; KOO, D.B. et al. Progesterone production is affected by unfolded protein response (UPR) signaling during the luteal phase in mice. *Life Sci.*, v.113, p.60-67, 2014.
175. PASQUALI, P.; ROSANNA, A.; PISTOIA, C. et al. *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain *B. abortus* 2308. *Infect. Immun.*, v.71, p.2326-2330, 2003.
176. PASQUEVICH, K.A.; ESTEIN, S.M.; GARCIA SAMARTINO, C. et al. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.77, p.436-445, 2009.
177. PASQUEVICH, K.A.; GARCIA SAMARTINO, C.; CORIA, L.M. et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J. Immunol.*, v.184, n.9, p.5200-5212, 2010.
178. PASQUEVICH, K.A.; IBÁÑEZ, A.E.; CORIA, L.M. et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *Plos One*, v.6, n.1, e16203, 2011.
179. PAUL, S.; PEDDAYELACHAGIRI, B.V.; NAGARAJ, S. et al. Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model. *Mol. Immunol.*, v.99, p.9-18, 2018.
180. PEI, J.; KAHL-MCDONAGH, M.; FICHT, T.A. *Brucella* dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v.5, n.4, p.23, 2014.
181. PENDELA, S.V.; AGRAWAL, N.; MATHEW, T. et al. An Uncommon Presentation of *Brucella* Endocarditis Masquerading as Neurobrucellosis. *J. Clin. Diagn. Res.*, v.11, n.2, p.OD10-OD11, 2017.
182. 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.
183. PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V. et al. Virulent *Brucella abortus* avoids lysosome fusion and distributes within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.*, v.66, p.2387-2392, 1998.

184. PLOTKIN, S. A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.17, p.1055-1065, 2010.
185. PLOTKIN, S.A. Vaccines: the fourth century. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.16, p.1709-1719, 2009.
186. POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; PAIXÃO, T.A. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, n.25, p.5327-5334, 2006.
187. POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech.*, v.32, p.105-115, 2013.
188. PORTE, F.; NAROENI, A.; OUAHRANI-BETTACHE, S. et al. Role of the *Brucellaspis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.*, v.71, p.1481-1490, 2003.
189. QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; COLMENERO, J.D.; MUÑOZ, N. et al. Rapid diagnosis of brucella epididymo-orchitis by real-time polymerase chain reaction assay in urine samples. *J. Urol.*, v.176, p. 2290-2293, 2006.
190. RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today*, v.18, p.478-482, 1997.
191. RAJAPAKSE, C.N. Bacterial infections: osteoarticular brucellosis. *Bailliere's Clin. Rheumatol.*, v.9, p.161-177, 1995.
192. RANKIN, J.E.F. *Brucella abortus* in bulls: a study of twelve naturally infected cases. *Vet. Rec.*, v.77, p.132-135, 1965.
193. RAPPUOLI, R. Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nat. Biotechnol.*, v.25, p.1361-1366, 2007.
194. RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. *Curr. Opin Microbiol.*, v.3, n.5, p.445-450, 2000.
195. RAPPUOLI, R.; BAGNOLI, F. Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategies. *Clin. Infect. Dis.*, v.53, n.3, 2011, p.318, 2011.
196. RASOOL, O.; FREER, E.; MORENO, E. et al. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect. Immun.*, v.60, p.1699-1702, 1992.
197. RILEY, L.K.; ROBERTSON, D.C. Brucellacidal activity of human and bovine polymorphonuclear leukocyte granule extracts against smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.46, p.231-236, 1984.
198. RITTIG, G.; KAUFMANN, A.; ROBINS, A. et al. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, v.74, p.1045-1055, 2003.
199. ROCKX-BROUWER, D.; CHONG, A.; WEHRLY, T. D. et al. Low dose vaccination with attenuated *Francisella tularensis* strain SchuS4 mutants protects against tularemia independent of the route of vaccination. *PLoS ONE*, v.7, e37752, 2012.
200. ROLÁN, H.G.; TSOLIS, R.M. Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.76, p.3207-3213, 2008.
201. ROLÁN, H.G.; XAVIER, M.N.; SANTOS, R.L. et al. Natural antibody contributes to host defense against anattenuated *Brucella abortus* virB mutant. *Infect. Immun.*, v.77, p.3004-3013, 2009.
202. ROOP, R.M.; BELLAIRE, B.H.; VALDERAS, M.W. et al. Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. *Mol. Microbiol.*, v.52, p.621-630, 2004.
203. ROSSETTI, C.A.; DRAKE, K.L.; ADAMS, L.G. Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes Infect.*, v.14, 756e767, 2012.
204. ROSSETTI, C.A.; GALINDO, C.L.; LAWHON, S.D. et al. *Brucella melitensis* global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding *Brucella*: host initial interactions. *BMC Microbiol.*, v.9, p.81, 2009.
205. ROUX, C.M.; ROLAN, H.G.; SANTOS, R.L. et al. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cell. Microbiol.*, v.9, p.1851-1869, 2007.
206. SAEZ, D.; FERNANDEZ, P.; RIVERA, A. et al. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine*, v.30, p.1283-1290, 2012.

207. SALCEDO, S.P.; MARCHESINI, M.I.; LELOUARD, H. et al. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog.*, v.4, e21, 2008.
208. SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. vet.Res.*, v.53, p.359-363, 1992.
209. SANO, M.; MITSUYAMA, M.; WATANABE, Y. et al. Impairment of T cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* in pregnant mice. *Microbiol. Immunol.*, v.30, p.165-176, 1986.
210. SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M. et al. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, p.759-764, 2013.
211. SANTOS, R.L.; SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A. et al. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, v.47, p.83-98, 2005.
212. SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.*, v.10, p.170-181, 2010.
213. SATHIYASEELAN, J.; GOENKA, R.; PARENT, M. et al. Treatment of *Brucella* susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cell. Immunol.*, v.243, p.1-9, 2006.
214. SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.58, p.375-382, 2008.
215. SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; LLNER, C.G. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.60, p.801-808, 2010.
216. SCHOLZ, H.C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; AL DAHOUK, S. et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.66, p.2090-2098, 2016.
217. SCHURIG, G.; BOYLE, S.; SRIRANGANATHAN, N. *Brucella abortus* vaccine strain RB51: a brief review. *Arch. Med. Vet.*, v.27, p.19-22, 1995.
218. SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M. 2nd.; BAGCHI, T. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.28, p.171-188, 1991.
219. SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.479-496, 2002.
220. SEDER, R.A.; HILL, A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature*, v.406, p.793-798, 2000.
221. SENGUPTA, D.; KOBLANSKY, A.; GAINES, J. et al. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J. Immunol.*, v.184, p.956-964, 2010.
222. SIEIRA, R.; COMERCI, D.J.; PIETRASANTA, L.I. et al. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol. Microbiol.*, v.54, p.808-822, 2004.
223. SILVA, A.P.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F. et al. *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet. Microbiol.*, v.167, n.3-4, p.546-553, 2013.
224. SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F. et al., Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ( $\Delta abcBA$ ) protects against wild type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS One*, v.10, e0136865, 2015b.
225. SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; SILVA, T.M.A. et al. Protection of an encapsulated live attenuated strain of *Brucella ovis* ( $\Delta abcBA$ ) against experimental challenge in the murine model. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, p.789-797, 2015a.
226. SILVA, T.M.; MOL, J.P.; WINTER, M.G. et al. The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*. *PLoS One*, v.9, n.12, e114532, 2014.
227. SILVA, T.M.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A. et al. Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect. Immun.*, v.79, n.4, p.1706-1717, 2011a.
228. SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A. et al. Laboratory Animal Models for Brucellosis Research. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2011, p.1-9, 2011b.
229. SINGHA, H.; MALLICK, A.I.; JANA, C. et al. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine*, v.29, p.4720-4727, 2011.

230. SMITH, L.D.; FICHT, T.A. Pathogenesis of *Brucella*. *Crit. Rev. Microbiol.*, v.17, p.209-230, 1990.
231. SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GRILLÓ, M.J. et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is presente in *Brucella abortus* and endosymbionts is presente in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.29, p.125-138, 1998.
232. SOLER-LLORENS, P.F.; QUANCE, C.R.; LAWHON, S.D. et al. 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.
233. STEVENS, M.G.; PUGH, G.W.; JR TABATABAI, L.B. Effects of c-interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect. Immun.*, v.60, n.10, p.4407-4409, 1992.
234. STINAVAGE, P.; MARTIN, L.E.; SPITZNAGEL, J.K.O. antigen and lipid A phosphoryl groups in resistance of *Salmonella typhimurium* LT-2 to nonoxidative killing in human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.*, v.57, p.3894-3900, 1989.
235. STRUGNELL, R.; ZEPP, F.; CUNNINGHAM, A. et al. Vaccine antigens. Understanding Modern Vaccines. *Perspectives in Vaccinology*, v.1, n.1, p.61-88, 2011.
236. SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; JIMÉNEZ-ROJAS. et al. *Brucella neotomae* infection in humans, Costa Rica. *Emerg. Infect. Dis.*, v.23, p.997-1000, 2017.
237. SUTHERLAND S.S.; SEARSON J. The immune response of *Brucella abortus*: the humoral response. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, R. Animal brucellosis. Florida: CRC Press, Boca Raton. p.65-81. 1990.
238. TABYNOV, K.; KYDYRBAYEV, Z.; RYSKELDINOVA, S. et al. Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins in cattle induced a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection. *Vaccine*, v.32, n.18, p.2034-2041, 2014.
239. TABYNOV, K.; SANSYZBAY, A.; KYDYRBAYEV, Z. et al. Influenza viral vectors expressing the *Brucella* Omp16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection. *Viol. J.*, v.11, p.69, 2014.
240. TADEPALLI, G.; SINGH, A.K.; BALAKRISHNA, K. et al. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19+rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model., *Mol. Immunol.*, v.71, p.34-41, 2016.
241. TAMURA, S.; HASEGAWA, H.; KURATA, T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. *Jpn. J. Infect. Dis.*, v.63, n.1, p.8-15, 2010.
242. TATUM, F.M.; DETILLEUX, P.G.; SACKS, J.M. et al. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect. Immun.*, v.60, p.2863-2869, 1992.
243. TERWAGNE, M.; FERROOZ, J.; ROLAN, H.G. et al. Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella*. *Cell. Microbiol.*, v.15, p.942-960, 2013.
244. THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella*. IN: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames: Iowa State University Press. p.236-247, 1993.
245. TITBALL, R. W. Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discov. Today*, v.13, p.596-600, 2008.
246. TOBIAS, L.; SCHURIG, G.G.; CORDES, D.O. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strains 1Y and RB51 in the pregnant mouse. *Res. Vet. Sci.*, v.53, p.179-183, 1992.
247. TODD, T.E.; TIBI, O.; LIN, Y et al. Meta-analysis of variables affecting mouse protection efficacy of whole organism *Brucella* vaccines and vaccine candidates. *BMC Bioinformatics*, v.14, n.6, S3, 2013.
248. TOLOMEO, M.; DICARLO, P.; ABBADESSA, V. et al. Monocyte and lymphocyte apoptosis resistance in acute and chronic brucellosis and its possible implications in clinical management. *Clin. Infect. Dis.*, v.36, p.1533-1538, 2003.
249. TOMLINSON, S. Complement defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.*, v.5, p.83-89, 1993.

250. TØNNESEN, R.; BORGE, K. S.; NØDTVEDT, A. et al. Canine perinatal mortality: a cohort study of 224 breeds. *Teriogenology*, v.77, p.1788-1801, 2012.
251. TSOLIS, R.M.; SESHADRI, R.; SANTOS, R.L. et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PloS One*, v.4, e5519, 2009.
252. TSOLIS, R.M.; YOUNG, G.M.; SOLNICK, J.V. et al. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.6, p.883-992, 2008.
253. UPPALAPATI, S.R.; KINGSTON, J.J.; MURALI, H.S. et al. Heterologous protection against alpha toxins of *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* induced by binding domain recombinant chimeric protein. *Vaccine*, v.32, p.3075-3081, 2014.
254. VELIKOVSKY, C.A.; GOLDBAUM, F.A.; CASSATARO, J. et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect. Immun.*, v.71, p.5750-5755, 2003.
255. VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; CRAVERO, S. et al. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. *Infect. Immun.*, v.68, p.3286-3289, 2000.
256. VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; SRIRANGANATHAN, N. et al. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.521-532, 2002.
257. VENDRELL, J. P.; CONGE, A.M.; SEGONDY, M. et al. *In vitro* antibody secretion by peripheral blood mononuclear cells as an expression of the immune response to *Brucella* spp. in humans. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p.2200-2203, 1992.
258. VERGER, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. et al. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v.138, p.235-238, 1987.
259. VISHNU, U.S.; SANKARASUBRAMANIAN, J.; GUNASEKARAN, P. et al. Novel vaccine candidates against *Brucella melitensis* identified through reverse vaccinology approach. *OMICS*, v.19, p.722-729, 2015.
260. VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S. et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, v.64, p.3744-3751, 1996.
261. WAAG, D.M.; ENGLAND, M.J.; TAMMARIELLO, R.F. et al. Comparative efficacy and immunogenicity of Q fever chloroform:methanol residue (CMR) and phase I cellular (Q-Vax) vaccines in cynomolgus monkeys challenged by aerosol. *Vaccine*, v.20, p.2623-2634, 2002.
262. WANG, X.; LI, Z.; LI, B. et al. Bioluminescence imaging of colonization and clearance dynamics of *Brucella Suis* vaccine strain S2 in mice and guinea pigs. *Mol. Imaging Biol.*, v.18, 519Y526, 2016.
263. WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today*, v.14, p.353-356, 1993.
264. WEINBERG, E.D. Pregnancy-associated immune suppression: risks and mechanisms. *Microb. Pathog.*, v.3, p.393-397, 1987.
265. WHATMORE, A.D.; DALE, E.J.; STUBBERFIELD, E. et al. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Rep.*, v.2, e000017, 2015.
266. WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A. et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.64, Pt 12, p.4120-4128, 2014.
267. WILLIAMS, R.K.; CROSSLEY, K. Acute and chronic hepatic involvement of brucellosis. *Gastroenterology.*, v.83, n.2, p.455-458, 1982.
268. WILSON, R.P.; WINTER, S.E.; SPEES, A.M. et al. The VI capsular polysaccharide prevents complement receptor 3-mediated clearance of *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infect. Immun.*, v.79, p.830-837, 2011.
269. WU, X.; XIE, C.; ZHANG, Y. et al. Ciclo glutamico-glutamico e troca na unidade placenta-feto durante o final da gravidez. *Aminoácidos*, v.47, p.45-53, 2015.
270. WYCKOFF III, J.H.; HOWLAND, J.L.; SCOTT, C.M. et al. Recombinant bovine interleukin 2 enhances immunity and protection induced by *Brucella abortus* vaccines in cattle. *Vet. Microbiol.*, v.111, n.1-2, p.77-87, 2005.

271. XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A. et al. Development and evaluation of a species specific PCR assay for detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.145, p.158-164, 2010.
272. XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P. et al. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.*, v.140, p.149-157, 2009.
273. XAVIER, M.N.; WINTER, M.G.; SPEES, A.M. et al. CD4+ T Cell-derived IL-10 Promotes *Brucella abortus* Persistence via Modulation of Macrophage Function. *PLoS Pathog.*, v.9, n.6, e1003454, 2013a.
274. XAVIER, M.N.; WINTER, M.G.; SPEES, A.M. et al. PPAR $\gamma$ -mediated increase in glucose availability sustains chronic *Brucella abortus* infection in alternatively activated macrophages. *Cell Host Microbe*, v.14, p.159-170, 2013b.
275. XIE, J.; WANG, J.; LI, ZHANGYONG et al. Ontology-Based meta-analysis of animal and human adverse events associated with licensed brucellosis vaccines. *Front. Pharmacol.*, v.9, n.503, p. 1-11, 2018.
276. YANG Y, SUN M, SHAN Y, et al. Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptotic Pathway Is Involved in Corpus Luteum Regression in Rats. *Reprod. Sci.*, v.22, n.5, p.572-584, 2015.
277. YANG, X.; SKYBERG, J.A.; CAO L. et al. Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol.*, v.8, p.60-77, 2013.
278. YAO, L.; WU, C.X.; ZHENG, K.; XU, X.J. et al. Immunogenic response to a recombinant pseudorabies virus carrying bp26 gene of *Brucella melitensis* in mice. *Res. Vet. Sci.*, v.100, p.61-67, 2015.
279. YIN, D.; LI, L.; SONG, D. et al. A novel recombinant multi-epitope protein against *Brucella melitensis* infection. *Immunol. Lett.*, v.75, p.1-7, 2016.
280. YOUNG, E.J. Human brucellosis. *Reviews of Infectious Diseases*, v.5, p.821-842, 1983.
281. YOUNG, E.J.; GOMEZ, C.I.; YAWN, D.H. et al. Comparison of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* infections of mice and their effect on acquired cellular resistance. *Infect. Immun.*, v.26, n.2, p.680-685, 1979.
282. ZHAN, Y.; CHEERS, C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.61, p.4899-4901, 1993.
283. ZHAN, Y.; CHEERS, C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.63, p.1387-1390, 1995.
284. ZHAN, Y.; LIU, Z.; CHEERS, C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect. Immun.*, v.64, p.2782-2786, 1996.
285. ZHANG, X.; KIMURA, Y.; FANG, C. et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood.*, v.110, p.228-236, 2007.
286. ZHANG, Y.; LI, T.; ZHANG, J. et al. The *Brucella melitensis* M5-90 phosphoglucomutase (PGM) mutant is attenuated and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.32, p.58, 2016.
287. ZHAO, Z.; LI, M.; LUO, D. et al. Protection of mice from *Brucella* infection by immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing a L7/L12 and BLS fusion antigen of *Brucella*. *Vaccine*, v.27, p.5214-5219, 2009.

RESEARCH ARTICLE

# Meta-Analysis and Advancement of Brucellosis Vaccinology

Tatiane F. Carvalho<sup>1</sup>, João Paulo A. Haddad<sup>2</sup>, Tatiane A. Paixão<sup>3</sup>, Renato L. Santos<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, **2** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, **3** Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

\* rsantos@vet.ufmg.br



CrossMark  
click for updates

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Carvalho TF, Haddad JPA, Paixão TA, Santos RL (2016) Meta-Analysis and Advancement of Brucellosis Vaccinology. PLoS ONE 11(11): e0166582. doi:10.1371/journal.pone.0166582

**Editor:** Roy Martin Roop, II, East Carolina University Brody School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** August 17, 2016

**Accepted:** October 31, 2016

**Published:** November 15, 2016

**Copyright:** © 2016 Carvalho et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Work in RLS lab is supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil). RLS and JPAH have fellowships from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

### Background/Objectives

In spite of all the research effort for developing new vaccines against brucellosis, it remains unclear whether these new vaccine technologies will in fact become widely used. The goal of this study was to perform a meta-analysis to identify parameters that influence vaccine efficacy as well as a descriptive analysis on how the field of *Brucella* vaccinology is advancing concerning type of vaccine, improvement of protection on animal models over time, and factors that may affect protection in the mouse model.

### Methods

A total of 117 publications that met the criteria were selected for inclusion in this study, with a total of 782 individual experiments analyzed.

### Results

Attenuated (n = 221), inactivated (n = 66) and mutant (n = 102) vaccines provided median protection index above 2, whereas subunit (n = 287), DNA (n = 68), and vectored (n = 38) vaccines provided protection indexes lower than 2. When all categories of experimental vaccines are analyzed together, the trend line clearly demonstrates that there was no improvement of the protection indexes over the past 30 years, with a low negative and non significant linear coefficient. A meta-regression model was developed including all vaccine categories (attenuated, DNA, inactivated, mutant, subunit, and vectored) considering the protection index as a dependent variable and the other parameters (mouse strain, route of vaccination, number of vaccinations, use of adjuvant, challenge *Brucella* species) as independent variables. Some of these variables influenced the expected protection index of experimental vaccines against *Brucella* spp. in the mouse model.

### Conclusion

In spite of the large number of publication over the past 30 years, our results indicate that there is not clear trend to improve the protective potential of these experimental vaccines.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Brucellosis is a zoonotic bacterial disease that accounts for approximately half a million new cases of human infections annually [1]. The disease is caused by different *Brucella* species, which are facultative intracellular Gram negative bacteria that belong to the  $\alpha$ -2 Proteobacteriacea family [2,3]. Human patients with brucellosis develop nonspecific symptoms including undulating fever, and the disease may progress to endocarditis, arthritis, osteomyelitis, among other less common clinical manifestations [4]. In cattle, brucellosis is characterized by abortion and infertility [5–7]. Therefore, bovine brucellosis results in very significant economic losses [8,9].

Animal brucellosis control and prevention is largely based on vaccination. Therefore, over the past decades there has been an intensive research effort for developing safer and more efficacious vaccines against brucellosis [3,10–12]. Animal vaccination against brucellosis is based mostly on live attenuated vaccines [12], including *Brucella abortus* S19, *Brucella abortus* RB51, and *Brucella melitensis* Rev.1 [3,11,13], whereas *Brucella abortus* S19 is often considered a gold standard for vaccine development [14]. However, these live attenuated vaccine strains have some significant disadvantages including pathogenic potential for humans, induction of abortion in animals, shedding in the milk, and interference with serologic tests in the case of smooth LPS strains [3,15]. Furthermore, these traditional vaccine strains have their use restricted to ruminants, whereas pigs, camels, or wild life animals are not covered.

Traditionally, live attenuated vaccines have a much broader use and efficacy than inactivated vaccine formulations [12,16]. During the past few years, there have been an increasing number of studies on alternative approaches for immunization against brucellosis, including recombinant subunit vaccines using surface or intracellular proteins of *Brucella* spp. [17–20]. Several *Brucella* proteins have been used as immunogens for experimental subunit vaccine formulations, including outer membrane proteins, namely Omp16, Omp19, Omp31, Omp28, and Omp25 [21–24], ribosomal protein L7/L12 [17,25], Cu-Zn superoxide dismutase [26], a cytoplasmic protein p39 [27], lumazine synthase BLS [28], among others. In addition, experimental DNA vaccines [28,29] as well as vectored vaccines using deliver vectors such as *Salmonella enterica* serotype Typhimurium [30], *Escherichia coli* [31], *Yersinia enterocolitica* [32], *Lactococcus lactis* [33], and the influenza virus [34] have been increasingly studied. Overexpression of *Brucella* antigens in attenuated vaccine strains have also been experimentally evaluated [35]. However, up to date these new approaches have not resulted in the generation of commercially available vaccines.

Due to the limitations of experimental procedures involving the natural hosts, since it is expensive and time-consuming, the mouse has been largely used as an experimental model for vaccine development against brucellosis [15]. The mouse model is suitable for studying pathogenesis, host immune response, and vaccine protection [36,37]. However, experimental protocols for assessing vaccine efficacy using this animal model are not standardized, which generates results that are often not quite reproducible [38]. Balb/c is the most commonly used mouse strain, although other strains have also been used for vaccine experiments, namely CD1, C57BL/6, OF1, 129/Sv, Swiss, and, mixed/outbred [16]. Vaccine efficacy is assessed based on experimental challenge with a pathogenic wild type *Brucella* strain after immunization, and quantification of wild type bacteria in target organs, particularly the spleen [39].

In spite of all the research effort for developing new vaccines against brucellosis, it remains unclear whether these new vaccine technologies will in fact become widely used tools for preventing brucellosis. Therefore, the goal of this study was to perform a meta-analysis to identify

parameters that influence vaccine efficacy as well as a descriptive analysis on how the field of *Brucella* vaccinology is advancing in regard to type of vaccine, improvement of protection on animal models over time, and factors that may affect protection in the mouse model.

## Material and Methods

### Data source

Data were retrieved from publications indexed in PubMed up to February 15<sup>th</sup> 2016, using the following combinations of terms: (i) “*Brucella*” and “vaccine”; (ii) “*Brucella*” and “vaccine” and “mice”; or (iii) “*Brucella*” and “vaccine” and “mice” and “challenge”. The list of publications were then manually disambiguated. Only papers using the mouse model were included in this study. Importantly, a criterion for inclusion was that the paper must indicate the protective index or provide original data that allowed us to calculate the index. By definition, protective index refers to the difference in the log of colony forming unit (CFU) numbers in the spleen of naive and vaccinated mice. Only papers published in English were included in this study. In addition, papers with insufficient data—i.e. absence of indication of number of mice per group, absence of CFU values with their standard deviation, and absence of non vaccinated controls—were not included in this study.

### Data retrieval

This study was performed according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses criteria (PRISMA) as detailed in S1 Table. Data were obtained from each individual experimental group in a given publication. These data were grouped according to the category of experimental vaccine being tested, including: (i) live attenuated strains, (ii) DNA vaccines; (iii) inactivated vaccines; (iv) mutant attenuated strains; (v) subunit vaccines; and (vi) vectored vaccines. Parameters extracted from each individual experiment and considered for analysis included: publication year, vaccine species (in the case of live vaccines), protection index, mouse strain, variables related to vaccination (route, dose, number of injections, and adjuvant), variables related to the challenge (challenge *Brucella* species and strain, route, and interval in days between challenge and sampling), vector species was considered in the case of vectored vaccines.

A linear regression analysis was performed considering the year of publication and protection index, for all experiments or grouped according to the category of vaccine. In addition, the influence of each parameter (category of vaccine, mouse strain, route of vaccination and challenge, number of vaccinations, adjuvant, challenge species, and interval between challenge and euthanasia) on the protective index.

### Data transformation and meta-regression analysis

Arbitrary values were attributed to qualitative data. For instance, values from 0 to 5, being “0” for attenuated vaccines; “1” for DNA vaccines; “2” for inactivated vaccines; “3” for mutant vaccine strains; “4” for subunit vaccines; and “5” for vectored vaccines. Similarly, values were attributed to mouse strains, routes of vaccination and challenge, use of adjuvant, *Brucella* spp. species used for challenge, and number of vaccinations, applying the value zero to the reference and integral crescent values to the other categories. The interval between challenge and euthanasia was analyzed as linear quantitative data.

The coefficient of variation, standard error, and confidence intervals were calculated for each experiment included in this study.

## Statistical analysis

The analysis was conducted initially a random effects meta-analysis estimation with a heterogeneity test. If the heterogeneity test is significant ( $p$ -value lower than 0.05), and probable would be significant because there are different types of study with different types of vaccines, it is necessary to work using a meta-regression in order to verify which factor has positive or negative effect over the protective index.

The conduction of the meta-regression would use first two independent variables, one always the type of vaccine with the objective of control the effect of the second independent variable. In this “controlled univariate meta-regression” will conduct checking the association of independent variables such as mouse strain, vaccination route, number of vaccinations, use of adjuvant, *Brucella* species used for challenge, route of challenge, interval between challenge and euthanasia; and the dependent variable Protective Index. The independent variables with over-all  $p$ -values lower than 0.200 will be selected to the next step of the multivariable meta-regression analysis. The multivariable meta-regression was conducted using Protective Index as dependent variable and all others, which selected in the controlled univariate as independent variable. The multivariable model was conducted in a backwards approach, but in this case the exclusion was done manually in order to understand how the removal of no significant variable would affect the other variables. The statistical package used was the Stata software (Statacorp, Texas, USA).

This meta-regression approach allowed for attributing a given weight for each individual experiment based on their standard error. Therefore, a multiple meta-regression analysis was performed, including all parameters together, generating a meta-regression final model. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant and was retained in the final model.

## Results

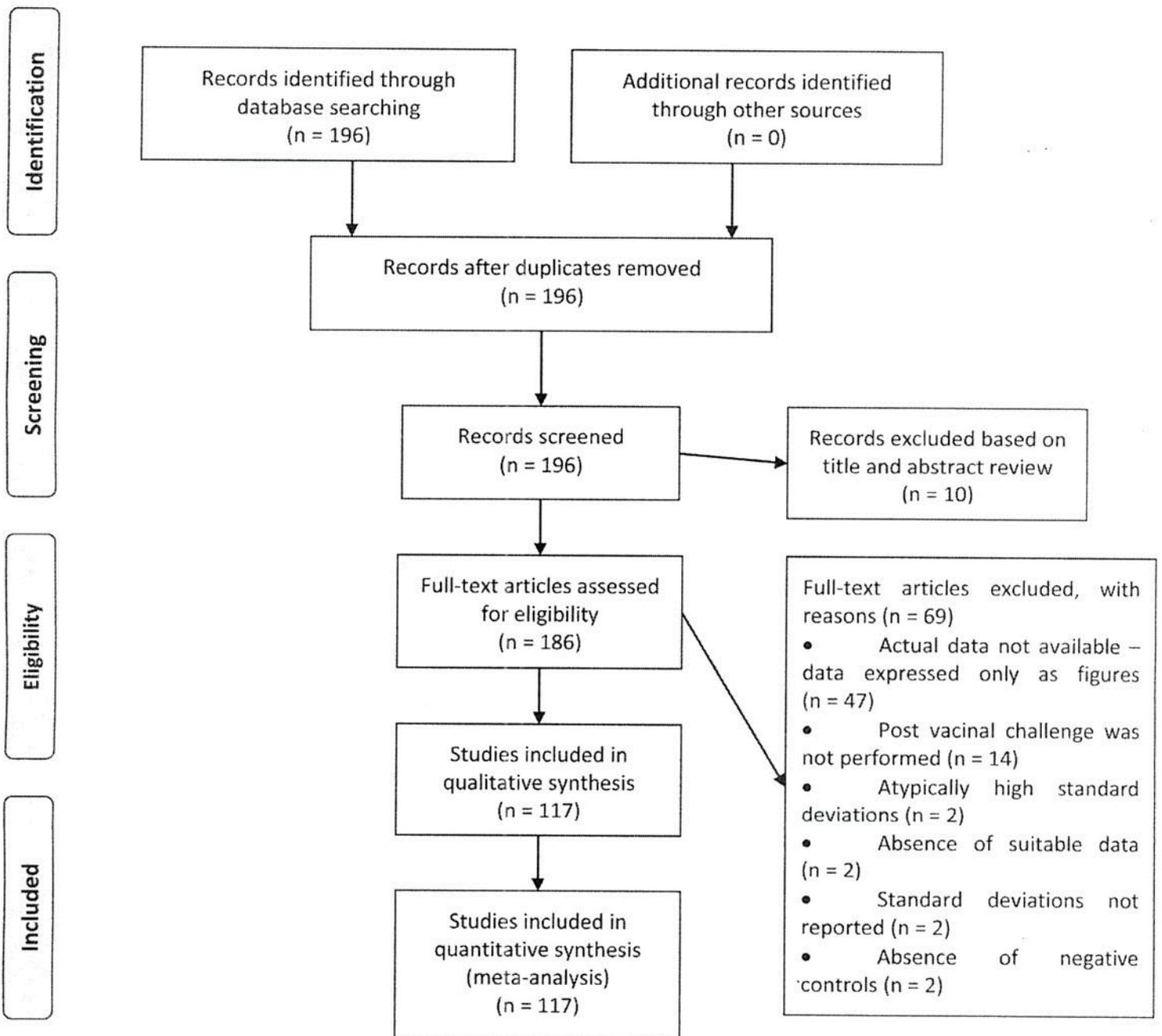
### Literature search and study characteristics

A total of 117 articles and data from 782 individual experiments were included in this study. Criteria for inclusion in this study are detailed in Fig 1. A total of 117 publications that met the criteria were selected for inclusion in this study [14, 17, 18, 20–28, 32, 33, 38, 40–141]. Therefore, a total of 782 individual experiments were analyzed. Raw data extracted from all 117 publications and each individual experiment are provided in the S2 Table.

### Protection against *Brucella* spp. induced by different categories of vaccines in mice—descriptive statistics

Currently, experimental subunit vaccines concentrate most of the research efforts in the field of *Brucella* vaccinology, since this category of vaccine accounted for 36.7%, followed by attenuated vaccine strains, which corresponded to 28.26% of all experiments. The others categories of experimental vaccines account for 13.04%, 8.69%, 8.43%, and 4.9%, in the case of mutant, DNA, inactivated, and vectored vaccines, respectively. Furthermore, the proteins that were more often used as subunit vaccines included: LPS fractions ( $n = 44$ ), L7/L12 ( $n = 31$ ), HS ( $n = 27$ ), Omp19 ( $n = 22$ ), Omp31 ( $n = 20$ ), Omp16 ( $n = 17$ ), Omp25 ( $n = 8$ ), BLS ( $n = 8$ ), SOD ( $n = 6$ ), P39 ( $n = 6$ ), BRF ( $n = 6$ ), Omp28 ( $n = 5$ ), and urease ( $n = 4$ ).

Some categories of vaccines were established earlier while other types of vaccines emerged over the time of this study (1986–2016) as demonstrated in Fig 2. By the end of 1980's (1986–1990) there were only experiments with attenuated and subunit vaccines. Inactivated vaccines appear between 1991 and 1995, whereas more diverse vaccine approaches have been developed and studied beginning in 2001. The period between 2011 and 2016 included the largest number

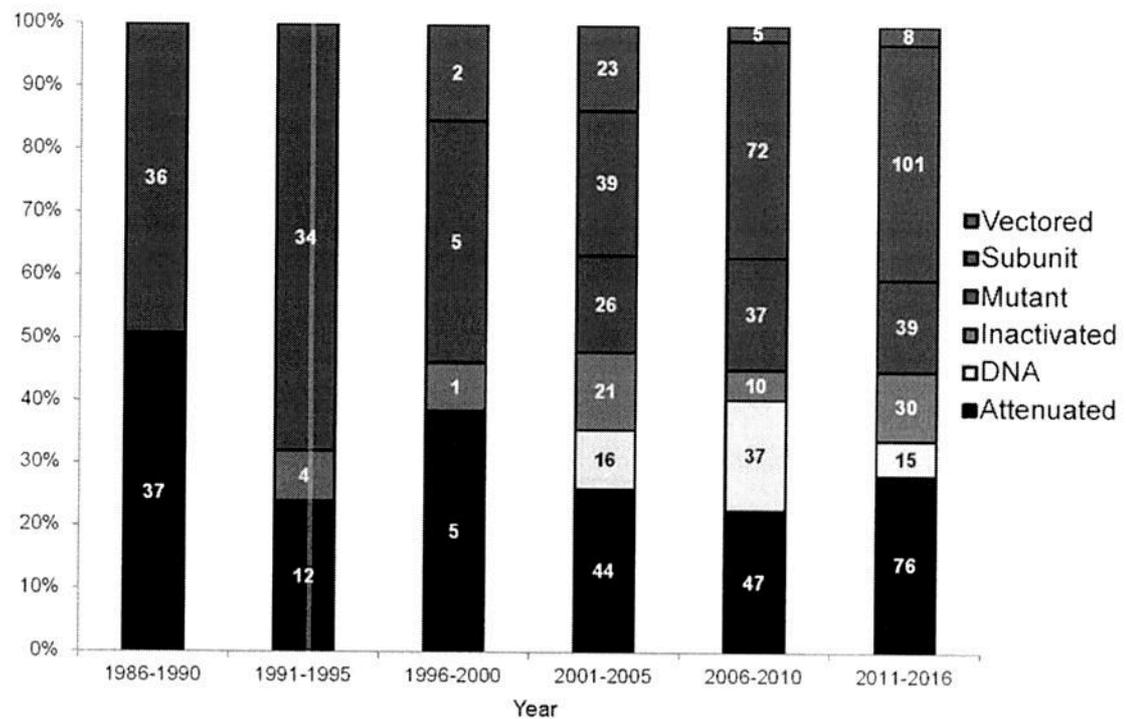


**Fig 1. Flow chart describing the selection of articles for inclusion in the meta-analysis.**

doi:10.1371/journal.pone.0166582.g001

of experiments (n = 269) when compared to the other intervals, which clearly indicates an increasing investment of research time and resources for brucellosis vaccine development.

Data from 782 previously published experiments were grouped according to the category of experimental vaccines, namely naturally attenuated, mutant, inactivated, subunit, DNA, and vectored vaccines. Attenuated (n = 221), inactivated (n = 66) and mutant (n = 102) vaccines provided median protection index above 2, whereas subunit (n = 287), DNA (n = 68), and vectored (n = 38) vaccines provided protection indexes lower than 2 (Fig 3).



**Fig 2. Time line with the number and percentage of experiments for brucellosis vaccine development according to the type of vaccine.** Time intervals and corresponding number of experiments were: 1986–1990 (n = 73), 1991–1995 (n = 50), 1996–2000 (n = 13), 2001–2005 (n = 169), 2006–2010 (n = 208) e 2011–2016 (n = 269). The number of experiments for each data point is indicated in the graph.

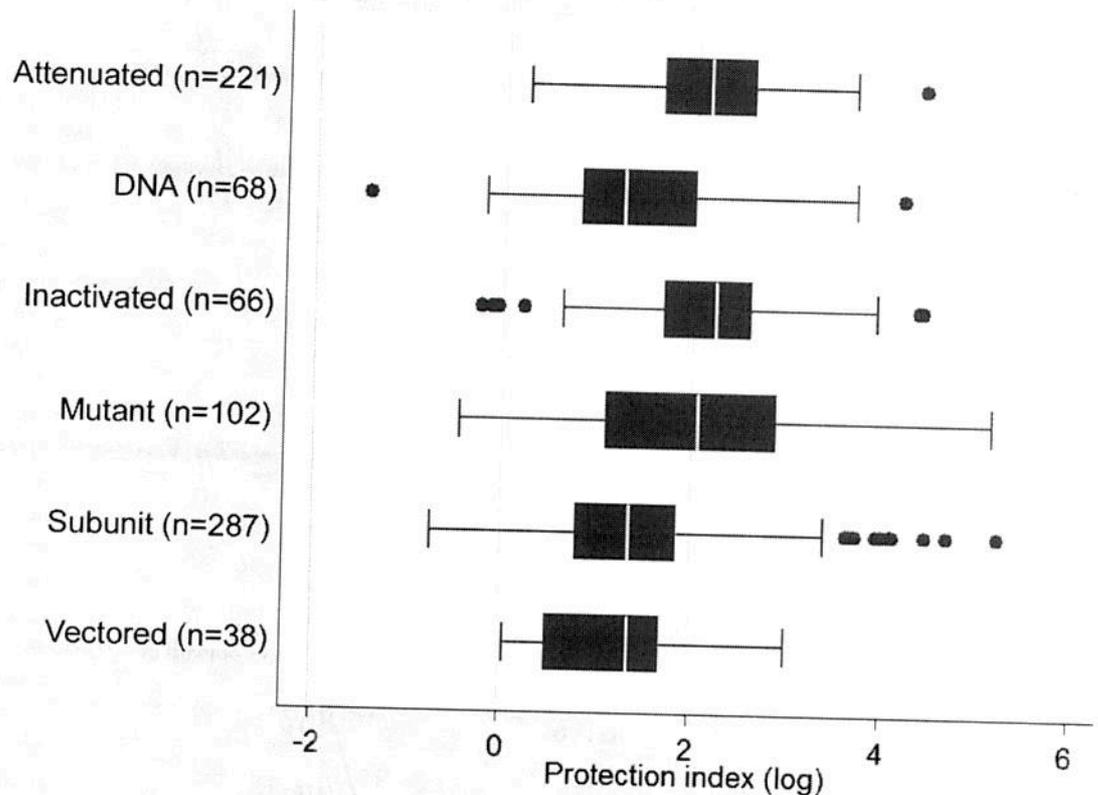
doi:10.1371/journal.pone.0166582.g002

### Protection provided by experimental brucellosis vaccines over the past 30 years

In order to assess whether protection indexes have been improving over time, a correlation analysis was applied to protection indexes and the year of publication of each individual experiment over the past 30 years. When all categories of experimental vaccines are analyzed together, the trend line clearly demonstrates that there was no improvement of the protection indexes over the past 30 years, with a low negative and non significant linear coefficient (Fig 4). During this period of time, average protection indexes of experimental vaccines remained stable and close to 2 Log. A similar trend was observed when different vaccine categories were analyzed separately (Fig 5), with the exception of DNA vaccines that had a statistically significant positive correlation coefficient (Fig 5B). However, this trend to improving protection indexes over time in the case of DNA vaccines reflects the very low protection indexes of the early studies rather than high protection indexes since more recent studies have protection indexes that were in average below 2 Log (Fig 5).

### Parameters that influenced protection in the mouse model—descriptive statistics

A descriptive statistic analysis was performed considering the possible effect of several parameters, including mouse strain, vaccination routes, number of vaccinations, *Brucella* species used for experimental challenge, challenge route, and use of adjuvant, on protection indexes of experimental *Brucella* vaccines. Note this statistic descriptive does not take in account the weight of each experimental group, based in sample size and standard errors.



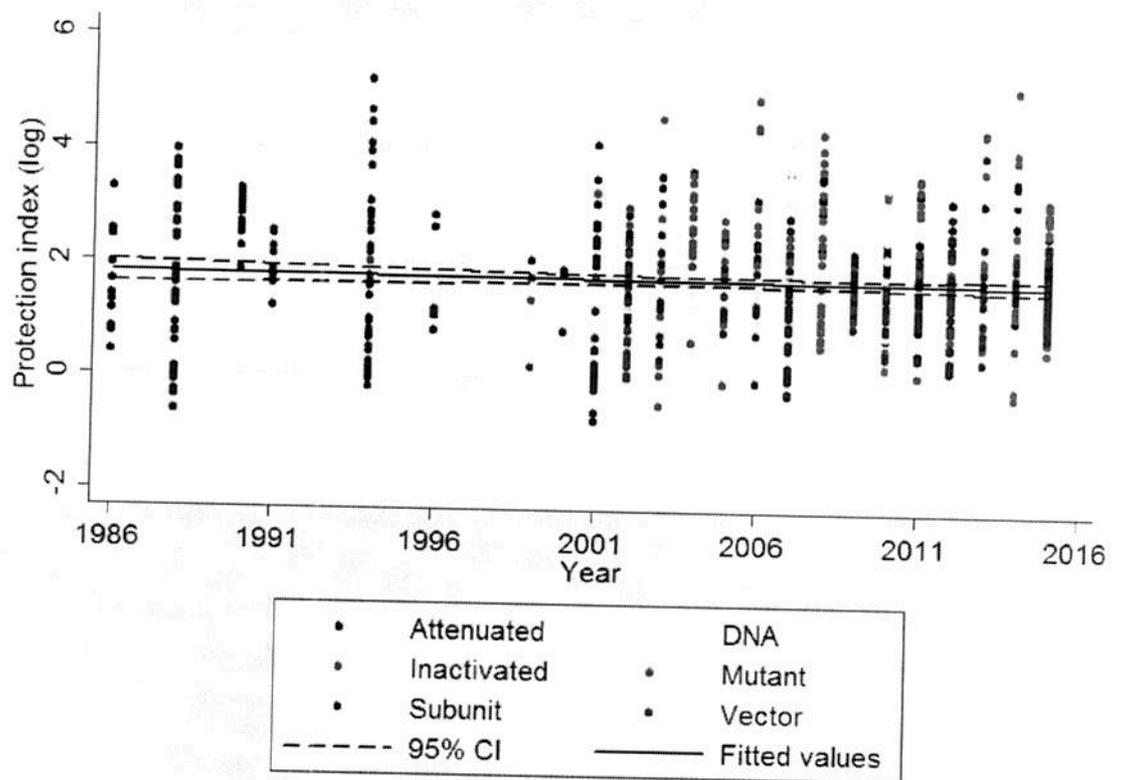
**Fig 3. Protection index provided by different categories of experimental vaccine candidates against *Brucella* spp. infection.** Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots. Median protection indexes were based on 782 independent experiments. The numbers of experimental groups per category are indicated between parentheses.

doi:10.1371/journal.pone.0166582.g003

Protection indexes were evaluated according to mouse strains, including Balb/c, Swiss, C57BL/6 and others, used in each one of the 782 experiments. In average, the highest levels of protection were observed in experiments using Swiss mice and its variations, including albino Swiss and outbreed Swiss CD-1 (Fig 6A). Balb/c is the most commonly used mouse strain for *Brucella* vaccine experiments, corresponding to 88.75% (694/782) of all experiments included in this study. In average, this strain provided lower protection indexes (1.7076), when compared to Swiss mice (2.3791) or other strains (1.7293), but higher than C57BL/6, which provided the lowest protection indexes (1.296) (Fig 6), when all vaccine categories were grouped together. Protection indexes provided by each mouse strain according to the category of vaccine (attenuated, DNA, inactivated, mutant, subunit, and vectored) are described in S1 Fig.

Different vaccination routes, i.e. oral and intragastric (ORAL/IG), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), subcutaneous (SC), and others (intranasal, intraesplenic, etc) provided similar protection indexes when all vaccine categories were analyzed together (Fig 6B). Protection indexes provided by different vaccination routes according to the vaccine category are detailed in S2 Fig.

The effect of the number of vaccinations, i.e. single vs. multiple vaccinations (2, 3, 4, and 9 vaccinations) on protection indexes were compared grouping all vaccine categories together. Interestingly, single vaccinations provided the highest median protection index (Fig 6C). Protection indexes provided by single or multiple vaccinations according to each vaccine category are described in S3 Fig.



**Fig 4. Linear regression of protection index over time for experimental vaccine candidates against *Brucella* spp. in the mouse model.** All experimental vaccine categories (attenuated strains,  $n = 221$ ; attenuated mutant strains,  $n = 102$ ; inactivated vaccines,  $n = 66$ ; subunit vaccines,  $n = 287$ ; DNA vaccines,  $n = 68$ ; and vectored vaccines,  $n = 38$ ) were included in this analysis, corresponding to 782 individual experiments ( $r = -0.0038$ ;  $r^2 = 0.09\%$ ;  $p = 0.4052$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0166582.g004

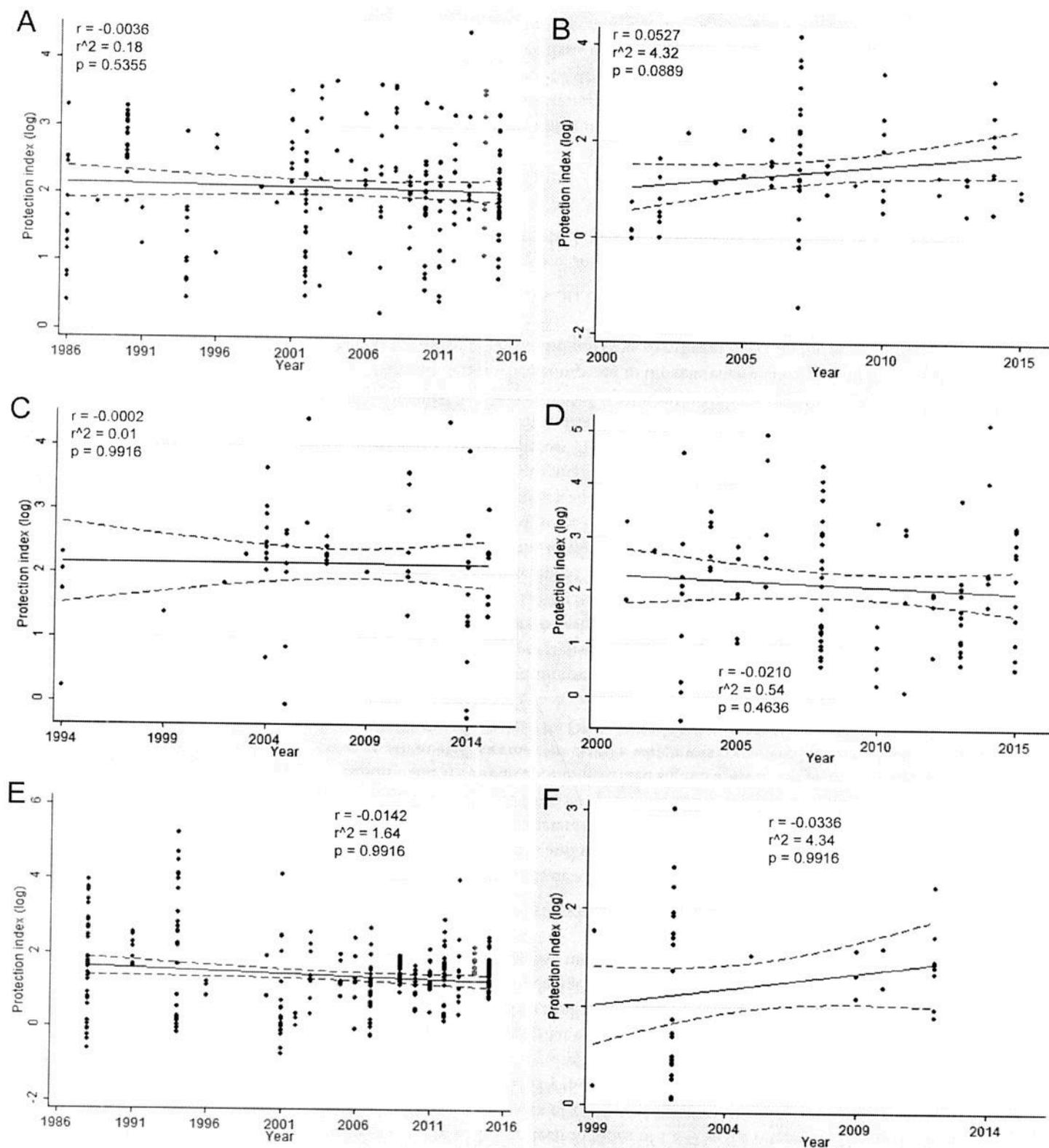
Post vaccination challenges with different *Brucella* spp. species, namely *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis*, were compared. A marked variation in protection indexes were observed against these virulent challenge species, with nearly two logs of difference in protection indexes between the lower and higher protection indexes, and challenge with *B. suis* resulted in the highest median protection index, when all vaccine categories were analyzed together (Fig 6D). Protection indexes provided by different vaccine categories against different *Brucella* spp. is described in S4 Fig.

The effect of the route of challenge on the protection index was also evaluated after analyzing all vaccine categories together. The median protection indexes obtained with challenge through different routes, i.e. oral and intragastric (ORAL-IG), intraperitoneal (IP), other (intranasal, intraesplenic, etc) e intravenous (IV), were quite similar (Fig 6E). Protection indexes provided by different routes of challenge according to each vaccine category are described in S5 Fig.

When analyzing all vaccine categories together, protection indexes provided by experimental vaccines with or without adjuvant were similar (Fig 6F). Importantly the use of adjuvant is largely restricted to some categories of experimental vaccines, as detailed in S6 Fig.

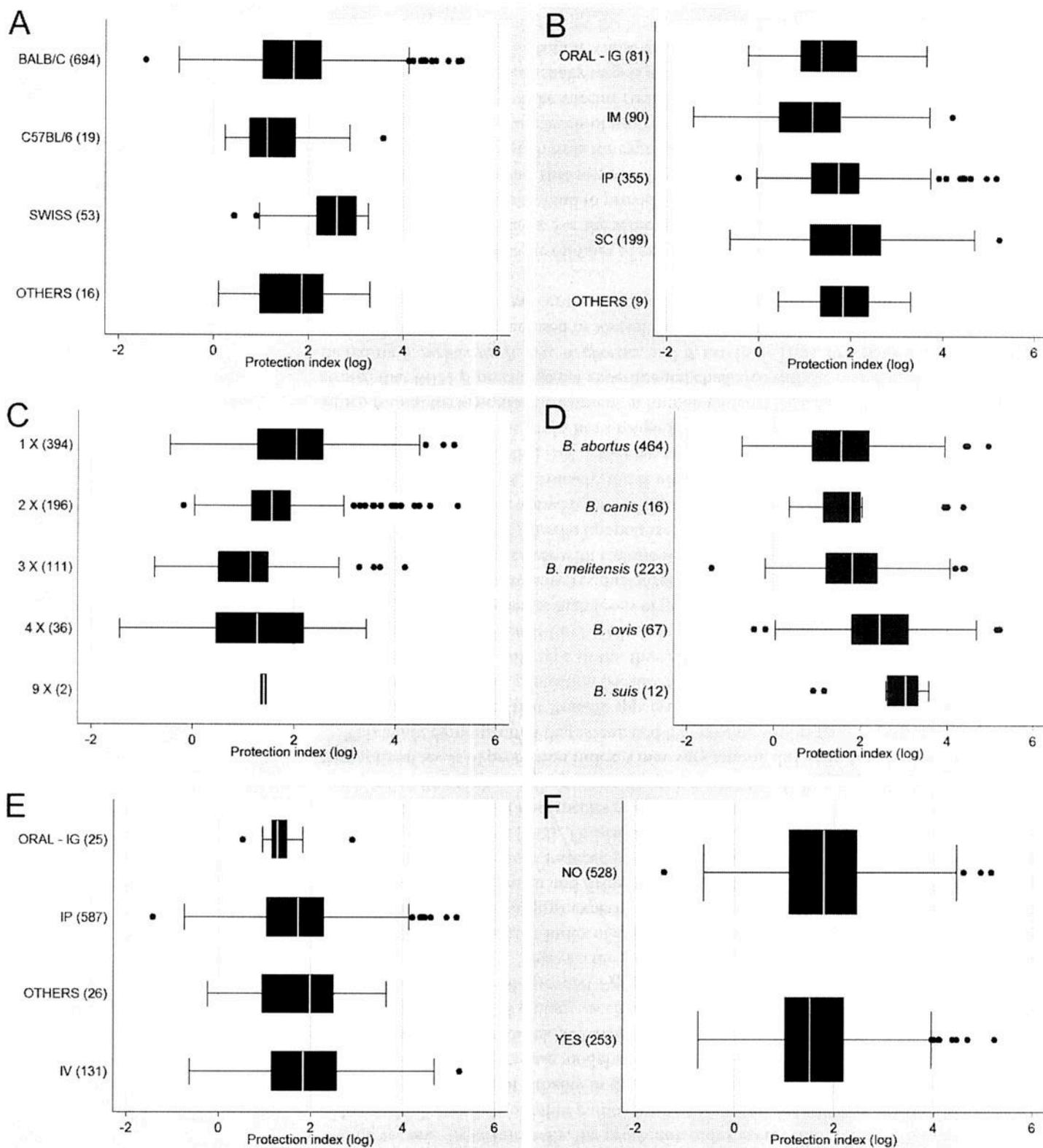
### Meta-analysis estimations

Random effects meta-analysis was conducted using 782 experimental groups from the 117 selected papers estimating the protection index and testing for heterogeneity. This procedure



**Fig 5. Linear regression of protection index over time of different categories of experimental vaccines against *Brucella* spp. in the mouse model.** (A) attenuated strains (n = 221); (B) DNA vaccines (n = 68); (C) inactivated vaccines (n = 66); (D) attenuated mutant strains (n = 102); (E) subunit vaccines (n = 287); and (F) vectored vaccines (n = 38). Dots indicate each individual experiment, with solid trend lines and dotted lines indicating the confidence interval. Linear coefficients and p values are indicated in each graph.

doi:10.1371/journal.pone.0166582.g005



**Fig 6. Protection indexes according to different parameters.** All experimental vaccine categories were analyzed together and grouped according to: (A) the mouse strains used in each individual experiment; (B) vaccination route; (C) number of vaccinations; (D) the *Brucella* spp. species used for experimental challenge; (E) challenge route; and (F) use of adjuvant. The number of experimental groups for each parameter is indicated between parentheses. Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots.

doi:10.1371/journal.pone.0166582.g006

Table 1. Random effect meta-analysis results.

Type of vaccine	N	Estimation of PI	CI 95% of the estimation*		Heterogeneity test p-value
			Lower	Upper	
All	787	1.711	1.650	1.773	> 0.001
Attenuated	221	2.083	1.964	2.202	> 0.001
DNA	68	1.408	1.163	1.654	> 0.001
Inactivated	66	2.148	1.929	2.367	> 0.001
Mutant	102	2.052	1.831	2.274	> 0.001
Subunit	287	1.357	1.273	1.441	> 0.001
Vector	38	1.165	0.943	1.387	> 0.001

\* CI: confidence interval, which indicates that under the same experimental conditions values would have that range in 95% of the time.

doi:10.1371/journal.pone.0166582.t001

was made for the experimental groups divided by type of vaccine as well. All estimations show high heterogeneity suggesting the necessity of use the meta-regression in order to access which factor is affecting the protection index. The results are displayed in the Table 1.

### Bivariate analyses

In order to select variables to be included in the multivariate meta-regression model, a bivariate meta-regression analysis was performed considering each of the variables controlled by vaccine category, i.e. a bivariate analysis (Table 2). Variables studied included: vaccine category, mouse strain, vaccination route, number of vaccinations, use or adjuvant, *Brucella* species used for challenge, challenge route, and interval between challenge and euthanasia. Naturally attenuated vaccine strains with an average protection index of 2.079 were significantly more protective ( $p < 0.001$ ) than DNA, subunit and vectored vaccines, which had average protection indexes of 1.377, 1.369, and 1.180, respectively. In contrast, protection indexes provided by inactivated and mutant vaccine strains (2.758 and 2.527, respectively) were statistically similar to that of the naturally attenuated vaccine strains.

Evaluation of mouse strains considering Balb/c as the reference strain, with a protection index of 2.058, indicated that it had significantly higher protection indexes when compared to C57BL/6 ( $p = 0.003$ ) that had a median protection index of 1.43. Conversely, Swiss mice had protection indexes (2.478) that were significantly higher than those of Balb/c mice ( $p = 0.002$ ), whereas no significant differences were observed among “other” strains of mice and Balb/c (Table 2).

Meta-regression analysis of vaccination routes, considering the oral/intragastric route as reference, demonstrated that this route, with a protection index of 1.726, was significantly less protective ( $p < 0.001$ ) than the subcutaneous route (2.205). Protection indexes provided by intramuscular, intraperitoneal, and others (2.083, 1.938, and 2.184, respectively) were similar to the oral/intragastric route (Table 2).

Considering one single vaccination as reference with a protection index of 2.059, two vaccinations with a protection index of 2.446 provided better protection ( $p = 0.002$ ) than single vaccinations. Conversely, three, four or nine vaccinations, with protection indexes of 1.835, 1.795, and 2.576, respectively, were statistically similar ( $p > 0.05$ ) to single vaccinations (Table 2).

The use of adjuvant resulted in a significantly better ( $p = 0.002$ ) protective index (2.359), when compared to vaccination without adjuvant that resulted in a protective index of 2.066 (Table 2).

The analysis of challenge species, considering *B. abortus* as the reference with a protection index of 1.954 demonstrated that protection indexes against *B. melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis*

Table 2. Bivariate meta-regression analysis of variables influencing the protection indexes of experimental brucellosis vaccines.

Variable	Coefficient*	p value**	Confidence interval***	
			Lower limit	Upper limit
<b>Vaccine category—Attenuated reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>				
DNA	-0.7025	<0.001*	-0.9597	-0.4453
Inactivated	0.0679	0.607	-0.1916	0.3275
Mutant	-0.04485	0.695	-0.2690	0.1793
Subunit	-0.7107	<0.001*	-0.8751	-0.5463
Vector	-0.8990	<0.001*	-1.2208	-0.5772
Constant	2.0799	<0.001*	1.9560	2.2038
<b>Mouse strain—Balb/c reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>				
C57BL/6	-0.6272	0.003*	-1.0439	-0.2104
Swiss	0.4197	0.002*	0.1555	0.6839
Others	-0.2984	0.203	-0.7583	0.1615
Constant	2.0589	<0.001*	1.9251	2.1927
<b>Route of vaccination—oral/intragastric reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>				
Intramuscular	-0.3571	0.081	-0.7591	0.0447
Intraperitoneal	0.2123	0.083	-0.0280	0.4526
Subcutaneous	0.4790	<0.001*	0.2226	0.7354
Others	0.4581	0.177	-0.2070	1.1233
Constant	1.7265	<0.001*	1.4697	1.9832
<b>Number of vaccinations—Single vaccination reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>				
Two	0.3872	0.002*	0.1453	0.6291
Three	-0.2241	0.108	-0.4974	0.0491
Four	-0.2645	0.197	-0.6667	0.1376
Nine	0.5179	0.437	-0.7895	1.8253
Constant	2.0597	<0.001*	1.9412	2.1783
<b>Adjuvant—without adjuvant reference</b>				
Adjuvant use	0.2937	0.002*	0.1111	0.4763
Constant	2.0665	<0.001*	1.9428	2.1901
<b>Species challenge—<i>B. abortus</i> reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>				
<i>B. canis</i>	0.4031	0.084	-0.054	0.8603
<i>B. melitensis</i>	0.1947	0.011*	0.0456	0.3438
<i>B. ovis</i>	0.8208	<0.001*	0.5739	1.0677
<i>B. suis</i>	0.8088	0.003*	0.2751	1.3425
Constant	1.9541	<0.001*	1.8232	2.085
<b>Challenge route—oral/intragastric reference—Overall p-value = 0.009</b>				
Intraperitoneal	0.1676	0.375	-0.2034	0.5386
Others	-0.4428	0.870	-0.5747	0.4861
Intravenous	0.4419	0.029*	0.4438	0.8395
Constant	1.8772	<0.001*	1.4957	2.2588
<b>Interval (days) between challenge and euthanasia</b>				
	-0.004	0.165	-0.0096	0.001
Constant	2.1665	<0.001*	1.9916	2.3414

\* Positive regression coefficients indicate that the variable has higher protection indexes than the reference variable when statistically significant. Negative regression coefficients indicate the opposite.

\*\* Statistically significant p values (p < 0.05).

\*\*\* Confidence interval indicates that under the same experimental conditions values would have that range in 95% of the time.

doi:10.1371/journal.pone.0166582.t002

(2.148, 2.774, and 2.762, respectively) were significantly higher when compared to *B. abortus* (Table 2). Conversely, the protection index against *B. canis* (2.357) was similar to that of *B. abortus* ( $p < 0.05$ ).

Bivariate meta-regression analysis also considered the route of challenge, with the oral/intragastric route with a protection index of 1.877 as the reference. The intravenous (IV) route, with a protection index of 2.318, was significantly more protective than the reference. Protection indexes provided by the intraperitoneal (IP) or “other” routes (2.044 and 1.833, respectively) were statistically similar to the reference (Table 2).

Importantly, considering that vaccine experiments are not standardized, we evaluated the effect of the interval between challenge and measurement of the protective index, and the number of days between challenge and euthanasia of experimental animals did not significantly influence the protective index (Table 2).

### Multivariate meta-regression

A meta-regression model was developed including all vaccine categories (attenuated, DNA, inactivated, mutant, subunit, and vectored) considering the protection index as a dependent variable and the other parameters (mouse strain, route of vaccination, number of vaccinations, use of adjuvant, challenge *Brucella* species) as independent variables (Table 3).

Subunit and vectored vaccines provided significantly lower protection indexes when compared to attenuated vaccines ( $p < 0.001$ ), which was considered the reference vaccine category. Protection indexes provided by DNA, inactivated or mutant vaccines were statistically similar ( $p < 0.05$ ) to the reference (Table 3).

Regarding the mouse strain used in the experiment, C57BL/6 and Swiss mice resulted in protection indexes that were statistically similar to the reference Balb/c strain (Table 3). Interestingly, “other” mouse strains, which included mouse strains that were knockout for genes related to immunity on a 129/Sv background, resulted in a lower protection index ( $p = 0.021$ ) when compared to the reference (Table 3).

With the exception of the intramuscular route of vaccination that provided lower protection index when compared to the oral/intragastric ( $p = 0.035$ ), the other vaccination routes (intraperitoneal, subcutaneous, and others) provided similar protection when compared to the reference (Table 3). Two vaccinations performed better than the reference that was one single vaccination ( $p < 0.001$ ), whereas three, four or nine vaccination did not improve the protection index when compared to the reference (Table 3).

Experimental vaccines provided significantly higher protection indexes against *B. melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis* when compared to the reference challenge with *B. abortus* (Table 3), whereas the use of adjuvant did not have significant effect on the protection index (Table 3).

### Source of publications on brucellosis vaccinology

The data used in this study was obtained from 117 scientific articles, which were grouped according to the journal in which they were published. Frequencies of publications in different journals are detailed S3 Table.

### Discussion

Brucellosis remains as one of the most important zoonotic diseases in the world, which justifies the large number of studies aiming to develop new and improved vaccines [10]. A meta-analysis based on brucellosis vaccine development experiments in the mouse model was performed in this study. A temporal analysis indicates that protection indexes remained stable over the past 30 years, which may indicate that the knowledge accumulated during the past decades did

**Table 3. Multivariate meta-regression analysis of variables influencing the protection indexes of experimental brucellosis vaccines.**

Variable	Coefficient*	Standard	p value**	Confidence interval***	
		Error		Lower limit	Upper limit
<b>Vaccine category—Attenuated reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>					
DNA	-0.1826	0.2291	0.426	-0.6325	0.2672
Inactivated	-0.1333	0.139	0.338	-0.6325	0.1397
Mutant	-0.0145	0.1126	0.898	-0.2356	0.2066
Subunit	-1.0207	0.1453	<0.001*	-1.3059	-0.7355
Vector	-1.0774	0.1947	<0.001*	-1.4597	-0.695
<b>Mouse strain—Balb/c reference—Overall p-value = 0.020</b>					
C57BL/6	-0.4214	0.2086	0.044	-0.8309	-0.0119
Swiss	0.1386	0.1912	0.469	-0.2368	0.5141
Others	-0.5824	0.2524	0.021*	-1.0780	-0.0868
<b>Route of vaccination—oral/intragastric reference—Overall p-value = 0.007</b>					
Intramuscular	-0.4072	0.1929	0.035*	-0.7859	-0.0285
Intraperitoneal	-0.0454	0.1242	0.715	-0.2893	0.1985
Subcutaneous	0.1466	0.1316	0.266	-0.1118	0.4051
Others	0.3178	0.3136	0.311	-0.2979	0.9335
<b>Number of vaccinations—Single vaccination reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>					
Two	0.3943	0.1236	<0.001*	0.1516	0.6369
Three	-0.0459	0.1439	0.750	-0.3284	0.2366
Four	-0.2248	0.2096	0.284	-0.6363	0.1866
Nine	0.5015	0.644	0.436	-0.7629	1.766
<b>Adjuvant—without adjuvant reference</b>					
Adjuvant use	0.1745	0.0927	0.060	-0.0075	0.3565
<b>Species challenge—<i>B. abortus</i> reference—Overall p-value &lt; 0.001</b>					
<i>B. canis</i>	0.157	0.2281	0.491	-0.2908	0.6048
<i>B. melitensis</i>	0.1652	0.0788	0.036*	0.0106	0.3198
<i>B. ovis</i>	0.7301	0.1287	<0.001*	0.4774	0.9828
<i>B. suis</i>	0.7793	0.3802	0.041*	0.0329	1.5257
Constant	1.8983	0.1349	<0.001*	1.6335	2.1632

\* Positive regression coefficients indicate that the variable has higher protection indexes than the reference variable when statistically significant. Negative regression coefficients indicate the opposite.

\*\* Statistically significant p values (p < 0.05).

\*\*\* Confidence interval indicates that under the same experimental conditions values would have that range in 95% of the time.

doi:10.1371/journal.pone.0166582.t003

not necessarily translated into better protection when considered the mouse as a model. Another way to interpret this unexpected and disturbing finding is that the mouse model may have a limited range of protection when it comes to brucellosis, which may have resulted in stable protection indexes over time. Limited knowledge on protective immune responses of mice and natural host species of *Brucella* spp. may also be a factor limiting advancement of this field. Furthermore, traditional vaccine strategies, particularly those based on the use of attenuated strains [79,88,142] provided better protection when compared to new strategies such as subunit, DNA, and vectored vaccines. In the case of live attenuated vaccine strains there is a clear correlation between results obtained in the mouse model and actual protection in the preferred host species [10,11,143,144]. Indeed, vaccine strains such as *B. abortus* S19 and *B. melitensis* Rev.1 are known to generate a robust immune response [11,143], and to induce significant levels of protection against *B. abortus* in cattle and *B. melitensis* in sheep and goats [10,11,144].

The mouse has been largely used as an experimental model for *Brucella* spp. infection [36]. This model allows for calculating the protection index that is based on the difference between the number of CFU (in Log) in the spleens of non vaccinated controls and vaccinated mice [39]. Thus, a higher protection index indicates a better protection provided by a given experimental vaccine. Experimentally, the protection index is very important for *Brucella* sp. vaccinology, which contrasts to other pathogens that are lethal, for which protection may be assessed by prevention of lethality in the mouse model [145]. Importantly, correlation between protection index in the mouse model and protection in the preferred host species is not clear for most of the recently developed experimental vaccines. For instance, we have recently developed a *B. ovis* attenuated mutant vaccine candidate strain that lacks an ABC transporter [36], which influences the *virB*-encoded Type IV secretion system [146] thus interfering with intracellular trafficking [147]. This vaccine strain provided only moderate protection in the mouse model, yielding a protection index of approximately 1.0 [120], whereas it surprisingly provided a very strong protection against experimental challenge in rams, preventing shedding of the wild type strain in the semen and urine, accumulation of inflammatory cells in the semen, and gross or microscopic lesions induced by wild type *B. ovis*, resulting in sterile immunity under experimental conditions [148]. This lack of a direct correlation between protection in the mouse and the preferred host species may also be related to the fact that protection indexes varied according to the wild type *Brucella* species used for challenging, which may indicate that optimal levels of protection indexes may vary among different *Brucella* species.

This study demonstrated that attenuated live vaccine strains tend to provide higher levels of protection. Considering that *Brucella* spp. is an intracellular pathogen, attenuated vaccines tend to provide superior protection because the vaccine strain remains with the same tissue and cell tropism as the wild type strain, thus mimicking a natural infection [149]. In fact, *B. abortus* S19 and *B. melitensis* Rev1 are largely used as vaccine strains worldwide. Although these vaccine strains generate high levels of protection against disease, there are considerable drawbacks since they both have residual virulence for their hosts, they cause human infections and disease, and they interfere with routine serological assays since they generate an antibody response against smooth *Brucella* lipopolysaccharide (LPS). Additionally, the Rev 1 vaccine strain is resistant to streptomycin, one of the antibiotics used for brucellosis treatment in human patients [11,76]. Conversely, the *B. abortus* RB51 vaccine strain provides protection against the disease in cattle [150], and it has the advantage of not interfering with the standard serological tests since this strain has a rough LPS [119], but this strain is resistant to rifampicin, which is used for brucellosis treatment in human patients [11]. Mouse experiments demonstrated that RB51 protects against experimental challenge with several *Brucella* spp. species, including *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. abortus*, and *B. suis* [88]. Thus, *Brucella* mutant strains carrying a rough LPS have been used in several vaccine experiments [11,15]. However, mutant rough strains provide lower levels of protection when compared to smooth attenuated vaccines such as Rev 1 [74,151].

Beginning in 2000, a large number of experiments evaluated mutant attenuated *Brucella* strains as vaccine candidates. For the same reasons discussed concerning naturally attenuated strains, these mutant strains tend to provide protection in the mouse model. A limiting factor for these vaccines is the fact that some of these mutants have poor persistence in the host, which may not allow enough time for exposure of the vaccine strain to the immune system, thus preventing appropriate levels of protection [152–154]. However, delivery systems that promote a slow delivery of the vaccine strain may overcome this limitation [120,148]. The mutagenesis in these cases usually targets genes that are required for virulence or survival in the host [93,153,155,156]. Mutant whose deleted genes are required during the early stages of infection are quickly eliminated by the host immune system [153] so they tend to generate

insufficient protective immunity [157,158]. There is a great interest in the generation of mutant strains that carry a rough LPS, such as RB51, since these strains do not interfere with the most commonly used serologic diagnostic methods [11,101]. However, rough strains tend to be rapidly eliminated from the host, which results in lower levels of protection [101].

This study demonstrated that, in general, subunit vaccines provided lower levels of protection, which may be due to limitations to identify the most protective antigens, but it is reasonable to hypothesize that one single antigen may not be sufficient to trigger a strong protective immune response against *Brucella* spp. [159,160,161].

In this study, some parameters affected protection against experimental challenge in the mouse model. Balb/c is the most commonly used mouse strain for *Brucella* vaccine experiments [16]. Importantly, protection indexes are influenced by the mouse strain. Indeed, although C57BL/6 and Swiss mice provided protection indexes that were similar to those of Balb/c, other strains, which included knockout strains for immune genes, provided lower protection indexes. With the exception of the intramuscular route of vaccination, all other vaccination routes provided similar levels of protection, including the subcutaneous route that is one of the preferable routes for practical purposes. The efficacy of the subcutaneous route of vaccination is in agreement with previous studies [16]. Another parameter that may influence protection, particularly in the case of subunit or DNA vaccines is the number of vaccinations, with two vaccination providing better results than single vaccination.

This study associated descriptive statistics with a meta-regression analysis, which is a powerful tool for advancing research on animal health [162]. A previous meta-analysis study on *Brucella* vaccinology have identified factors that may influence experimental outcomes in experiments evaluating whole organism vaccine formulations [16]. This study was more inclusive, covering most of the relevant *Brucella* vaccine research performed using the mouse model over the past three decades. The identification of variables that significantly influence protection indexes in the mouse model, clearly indicates that more standardized experimental protocols are urgently required to generate data that is more reproducible and with higher prediction value for vaccine performance in the preferred host species. Comparing with a previous meta-analysis study, which was restricted to whole organism vaccines [16], we found variables that are equally significant for other kinds of vaccines. For instance, vaccine category, mouse strain, vaccination route, challenge pathogen strain, challenge route, and challenge-killing interval, influenced protection in the previous study [16] as well as in this more comprehensive meta-analysis. Therefore, this study largely expands the knowledge previously gained with meta-analysis on *Brucella* vaccinology [16].

A critical aspect of the mouse model for *Brucella* vaccine development is the lack of standardized experimental conditions, which has been previously reviewed [163]. Although the mouse is a well established model for *Brucella* infection and vaccinology [36, 163], and in spite of very specific recommendations by the World Organisation for Animal Health (OIE) for employing the mouse as a model for predicting protective potential against brucellosis in ruminants [39], there is a wide range of parameters in experimental protocols, including sex, age and strain of mice, vaccination and challenge routes, time elapsed between vaccination and challenge and/or between challenge and assessment of splenic bacterial loads, among others. This fact makes comparisons between studies and laboratories very unreliable.

Potential limitations of this study may be associated with restrictions of the original database, although PubMed covers the vast majority of relevant papers on the field of experimental *Brucella* vaccinology. Absence of publication of negative results may also have influenced the outcome of this study, although similar levels of negative results would be expected among different categories of experimental vaccines.

## Conclusions

In conclusion, the importance of brucellosis as a threat for human health as well as due to economic losses for the animal industry [1,9], justifies the enormous scientific effort to develop better vaccines that lack residual pathogenic potential for animals and humans [19]. However, in spite of the large number of publication over the past 30 years, our results indicate that there is not clear trend to improve the protective potential of these experimental vaccines, which may at least in part explain why none of these new vaccine formulations or strategies has reached the market.

## Supporting Information

**S1 Fig. Protection index according to the mouse strain experimentally used for different categories of experimental vaccines against *Brucella* spp. infection.** Vaccine categories (attenuated strains, DNA vaccines, inactivated vaccines, attenuated mutant strains, subunit vaccines, and vectored vaccines) were regrouped according to the mouse strain experimentally used (Balb/c, C57BL/6, Swiss, and others). Attenuated vaccines: Balb/c, n = 166; C57BL/6, n = 9; Swiss, n = 34; others, n = 12. DNA vaccines: Balb/c, n = 67; C57BL/6, n = 1. Inactivated vaccines: Balb/c, n = 60; Swiss, n = 6. Mutant vaccines: Balb/c, n = 89; C57BL/6, n = 6; Swiss, n = 4; others, n = 3. Subunit vaccines: Balb/c, n = 274; C57BL/6, n = 3; Swiss, n = 9; others, n = 1. Vectored vaccines: Balb/c, n = 38. Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots. (TIF)

**S2 Fig. Protection index according to the route of vaccination for different categories of *Brucella* spp. experimental vaccines.** Vaccine categories (attenuated strains, DNA vaccines, inactivated vaccines, attenuated mutant strains, subunit vaccines, and vectored vaccines) were regrouped according to the route of vaccination (intragastric and oral, n = 81; intramuscular, n = 90; intraperitoneal, n = 355; subcutaneous, n = 199; others, n = 9). Attenuated vaccines: intragastric and oral, n = 12; intraperitoneal, n = 119; subcutaneous, n = 48. DNA vaccines: intramuscular, n = 62; others, n = 4. Inactivated vaccines: oral, n = 20; intraperitoneal, n = 19; subcutaneous, n = 26; others, n = 1. Mutant vaccines: oral, n = 5; intraperitoneal, n = 79; subcutaneous, n = 14. Subunit vaccines: oral, n = 25; intramuscular, n = 28; intraperitoneal, n = 119, others, n = 4. Vectored vaccines: oral, n = 19; intraperitoneal, n = 19. Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots. (TIF)

**S3 Fig. Protection index according to the number of vaccinations for different categories of experimental vaccines against *Brucella* spp.** Vaccine categories (attenuated strains, DNA vaccines, inactivated vaccines, attenuated mutant strains, subunit vaccines, and vectored vaccines) were regrouped according to the number of vaccinations (1x, n = 394; 2x, n = 196; 3x, n = 111; 4x, n = 36; 9x, n = 2). Attenuated vaccines: 1x, n = 211; 2x, n = 6; 4x, n = 1). DNA vaccines: 1x, n = 6; 2x, n = 2; 3x, n = 34; 4x, n = 26). Inactivated vaccines: 1x, n = 4; 2x, n = 13; 3x, n = 6; 4x, n = 3. Mutant vaccines: 1x, n = 97; 3x, n = 1. Subunit vaccines: 1x, n = 32; 2x, n = 148; 3x, n = 68; 4x, n = 3. Vectored vaccines: 1x, n = 4; 2x, n = 27; 3x, n = 2; 4x, n = 3; 9x, n = 2. Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots. (TIF)

**S4 Fig. Protection indexes according to the challenge *Brucella* spp. species for different categories of experimental vaccines.** Vaccine categories (attenuated strains, DNA vaccines, inactivated vaccines, attenuated mutant strains, subunit vaccines, and vectored vaccines) were regrouped according to the *Brucella* spp. species used for experimental challenge (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis*). Attenuated vaccines: *B. abortus*, n = 140; *B. melitensis*, n = 60; *B. ovis*, n = 12; *B. suis*, n = 9. DNA vaccines: *B. abortus*, n = 33; *B. canis*, n = 2; *B. melitensis*, n = 27; *B. ovis*, n = 6. Inactivated vaccines: *B. abortus*, n = 28; *B. canis*, n = 2; *B. melitensis*, n = 26; *B. ovis*, n = 7; *B. suis*, n = 3. Mutant vaccines: *B. abortus*, n = 40; *B. canis*, n = 4; *B. melitensis*, n = 47; *B. ovis*, n = 11. Subunit vaccines: *B. abortus*, n = 194; *B. canis*, n = 8; *B. melitensis*, n = 54; *B. ovis*, n = 31. Vectored vaccines: *B. abortus*, n = 29; *B. melitensis*, n = 9. Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots.

(TIF)

**S5 Fig. Protection index according to the challenge route for different experimental vaccine categories against *Brucella* spp.** Vaccine categories (attenuated strains, DNA vaccines, inactivated vaccines, attenuated mutant strains, subunit vaccines, and vectored vaccines) were regrouped according to the route of challenge (oral and intragastric, n = 25; intraperitoneal, n = 587; others, n = 26; intravenous, n = 131). Attenuated vaccines: oral and intragastric, n = 5; intraperitoneal, n = 185; others, n = 4; intravenous, n = 23. DNA vaccines: oral and intragastric, n = 1; intraperitoneal, n = 48; intravenous, n = 15. Inactivated vaccines: intraperitoneal, n = 35; others, n = 14; intravenous, n = 17. Mutant vaccines: oral and intragastric, n = 1; intraperitoneal, n = 93; others, n = 4. Subunit vaccines: oral and intragastric, n = 16; intraperitoneal, n = 191; others, n = 4; intravenous, n = 75. Vectored vaccines: oral and intragastric, n = 2; intraperitoneal, n = 35; intravenous, n = 1. Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots.

(TIF)

**S6 Fig. Protection index according to the use of adjuvant for different categories of experimental vaccines against *Brucella* spp.** Vaccine categories (attenuated strains, DNA vaccines, inactivated vaccines, attenuated mutant strains, subunit vaccines, and vectored vaccines) were regrouped according to the use or not of adjuvant (no, n = 528; yes, n = 253). Attenuated vaccines: no, n = 213; yes, n = 7. DNA vaccines: no, n = 61; yes, n = 7. Inactivated vaccines: no, n = 44; yes, n = 22. Mutant vaccines: no, n = 96; yes, n = 6. Subunit vaccines: no, n = 84; yes, n = 203. Vectored vaccines: no, n = 30; yes, n = 8. Values indicate the median, second and third quartiles (box), first and fourth quartiles (error bars). Outliers are indicated by dots.

(TIF)

**S1 Table. PRISMA Checklist.**

(DOC)

**S2 Table. Raw data extracted from all 117 publications and 782 individual experiments.**

(XLSX)

**S3 Table. Distribution of the 117 articles included in this study according to the journal they were published.**

(DOC)

## Acknowledgments

RLS, TAP and JPAH have fellowships from CNPq.

## Author Contributions

**Conceptualization:** TFC JPAH TAP RLS.

**Data curation:** JPAH.

**Formal analysis:** TFC JPAH TAP RLS.

**Funding acquisition:** RLS.

**Investigation:** TFC TAP RLS.

**Methodology:** TFC JPAH TAP RLS.

**Project administration:** RLS.

**Resources:** JPAH.

**Software:** JPAH.

**Supervision:** RLS.

**Visualization:** TFC JPAH TAP RLS.

**Writing – original draft:** TFC RLS.

**Writing – review & editing:** TFC JPAH TAP RLS.

## References

1. Pappas G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36 (1):S8–S11. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.013 PMID: 20696557
2. Cheers C. Pathogenesis and cellular immunity in experimental murine brucellosis. *Dev Biol Stand* 1984; 56:237–46. PMID: 6333362
3. Corbel MJ. *Brucellosis in Humans and Animals*. WHO Press, 2006; World Health Organization, Switzerland.
4. Boschirolu ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4:58–64. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00165-X PMID: 11173035
5. Xavier MN, Paixão TA, Poester FP, Lage AP, Santos RL. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Pathol* 2009; 140:149–57. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00165-X PMID: 19111839
6. Carvalho Neta AV, Mol JPS, Xavier MN, Paixão TA, Lage AP, Santos RL. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J* 2010; 184:146–55. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.04.010 PMID: 19733101
7. Poester FP, Samartino LE, Santos RL. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev Sci Tech—OIE* 2013; 32:105–15.
8. Cascio A, Bosilkovski M, Rodriguez-Morales AJ, Pappas G. The socio-ecology of zoonotic infections. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:336–42. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03451.x PMID: 21175957
9. Santos RL, Martins TM, Borges AM, Paixão TA. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq Vet Bras* 2013; 33:759–64. doi: 10.1590/S0100-736X2013000600012
10. Nicoletti P. Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes* 1990; 13:147–68. PMID: 2185782
11. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002; 90:479–96. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00255-9 PMID: 12414166
12. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodríguez A. A history of the development of *Brucella* vaccines. *Biomed Res Int* 2013; 2013:743509. doi: 10.1155/2013/743509 PMID: 23862154
13. Nicoletti P. Vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19 administered by differing routes and doses. *Vaccine* 1984; 2:133–5. doi: 10.1016/0264-410X(84)90004-5 PMID: 6531956
14. Iannino F, Herrmann CK, Roset MS, Briones G. Development of a dual vaccine for prevention of *Brucella abortus* infection and *Escherichia coli* O157:H7 intestinal colonization. *Vaccine* 2015; 33:2248–53. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.033 PMID: 25820069

15. Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, Lopez-Goni I, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res* 2004; 35:1–38. doi: 10.1051/vetres:2003037 PMID: 15099501
16. Todd TE, Tibi O, Lin Y, Sayers S, Bronner DN, Xiang Z, et al. Meta-analysis of variables affecting mouse protection efficacy of whole organism *Brucella* vaccines and vaccine candidates. *BMC Bioinformatics* 2013; 14:S3. doi: 10.1186/1471-2105-14-S6-S3 PMID: 23735014
17. Oliveira SC, Splitter GA. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine* 1996; 14:959–62. doi: 10.1016/0264-410X(96)00018-7 PMID: 8873388
18. Bhattacharjee AK, Izadjoo MJ, Zollinger WD, Nikolich MP, Hoover DL. Comparison of protective efficacy of subcutaneous versus intranasal immunization of mice with a *Brucella melitensis* lipopolysaccharide subunit vaccine. *Infect Immun* 2006; 74:5820–25. doi: 10.1128/IAI.00331-06 PMID: 16988260
19. Olsen SC. Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination. *Rev Sci Tech.* 2013; 32:207–17. PMID: 23837378
20. Velikovsky CA, Goldbaum FA, Cassataro J, Estein S, Bowden RA, Bruno L, et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect Immun* 2003; 71:5750–55. doi: 10.1128/IAI.71.10.5750-5755.2003 PMID: 14500496
21. Pasquevich KA, Estein SM, Garcia Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, et al. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 2009; 77:436–45. doi: 10.1128/IAI.01151-08 PMID: 18981242
22. Kaushik P, Singh DK, Kumar SV, Tiwari AK, Shukla G, Dayal S, et al. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet Res Commun* 2010; 34:119–32. doi: 10.1007/s11259-009-9337-x PMID: 20013309
23. Estein SM, Cassataro J, Vizcaino N, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Bowden AR. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2003; 5:85–93. doi: 10.1016/S1286-4579(02)00075-8 PMID: 12650766
24. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol Immunol* 2012; 51:159–68. doi: 10.1016/j.molimm.2012.02.126 PMID: 22464098
25. Golshani M, Rafati S, Dashti A, Gholami E, Siadat SD, Oloomi M, et al. Vaccination with recombinant L7/L12-truncated Omp31 protein induces protection against *Brucella* infection in BALB/c mice. *Mol Immunol* 2015; 65:287–92. doi: 10.1016/j.molimm.2015.01.009 PMID: 25723468
26. Singha H, Mallick AI, Jana C, Fatima N, Owais M, Chaudhuri P. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu–Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine* 2011; 29:4720–27. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.088 PMID: 21565241
27. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, DeBolle X, Michel P, Godfroid J, et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect Immun* 2001; 69:6264–70. doi: 10.1128/IAI.69.10.6264-6270.2001 PMID: 11553569
28. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Zwerdling A, Barrera S, et al. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev. 1 vaccination. *Vaccine* 2007; 25:5958–67. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.05.049 PMID: 17600596
29. Liljeqvist S, Ståhl S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 1999; 73:1–33. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00107-8 PMID: 10483112
30. Onate AA, Vemulapalli R, Andrews E, Schurig GG, Boyle S, Folch H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect Immun* 1999; 67:986–88. PMID: 9916121
31. Harms JS, Durward MA, Magnani DM, Splitter GA. Evaluation of recombinant invasive, non-pathogenic *Escherichia coli* as a vaccine vector against the intracellular pathogen, *Brucella*. *J Immune Based Ther Vaccines* 2009; 7:1. doi: 10.1186/1476-8518-7-1 PMID: 19126207
32. Al-Mariri A, Tibor A, Lestrade P, Mertens P, DeBolle X, Letesson JJ. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a Naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or p39 antigen. *Infect Immun* 2002; 70:1915–23. doi: 10.1128/IAI.70.4.1915-1923.2002 PMID: 11895955

33. Saez D, Fernandez P, Rivera A, Andrews E, Onate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine* 2012; 30:1283–90. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.088 PMID: 22222868
34. Tabynov K, Kydyrbayev Z, Ryskeldinova S, Yespembetov B, Zinina N, Assanzhanova N, et al. Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins in cattle induced a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection. *Vaccine* 2014; 32(18):2034–41. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.058 PMID: 24598723
35. Vemulapalli R, He Y, Cravero S, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. *Infect Immun* 2000; 68:3286–89. doi: 10.1128/IAI.68.6.3286–3289.2000 PMID: 10816475
36. Silva TMA, Costa EA, Paixão TA, Tsolis RM, Santos RL. Laboratory animal models for brucellosis research. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:1–9. doi: 10.1155/2011/518323 PMID: 21403904
37. Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet Microbiol* 2002; 90:367–82. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00222-5 PMID: 12414157
38. Miranda KL, Dorneles EMS, Pauletti RB, Poester FP, Lage AP. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: Evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1®) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine* 2015; 33:507–11. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.11.056 PMID: 25498211
39. OIE Biological Standards Commission, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6ed. Paris: World Organisation for Animal Health, 2008.
40. Abkar M, Amani J, Sahebghadam Lotfi A, Nikbakht Brujeni G, Alamian S, Kamali M. Subcutaneous immunization with a novel immunogenic candidate (urease) confers protection against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* infections. *APMIS* 2015; 123:667–75. doi: 10.1111/apm.12400 PMID: 25939375
41. Abkar M, Lotfi AS, Amani J, Eskandari K, Ramandi MF, Salimian J, et al. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: influence of nanoparticulation versus traditional immunization. *Vet Res Commun* 2015; 39:217–28. doi: 10.1007/s11259-015-9645-2 PMID: 26395469
42. Adone R, Ciuchini F, Marianelli C, Tarantino M, Pistoia C, Marcon G, et al. Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 2005; 73:4198–204. doi: 10.1128/IAI.73.7.4198–4204.2005 PMID: 15972510
43. Adone R, Francia M, Ciuchini F. Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. *Vaccine* 2008; 26:4913–17. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.030 PMID: 18675869
44. Adone R, Francia M, Pistoia C, Pesciaroli M, Pasquali P. *B. melitensis* rough strain B115 is protective against heterologous *Brucella* spp. infections. *Vaccine* 2011; 29:2523–29. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.072 PMID: 21300102
45. Al-Mariri A, Abbady AQ. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy in mice of a DNA vaccine encoding SP41 from *Brucella melitensis*. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7:329–37. doi: 10.3855/jidc.2296 PMID: 23592643
46. Al-Mariri A, Akel R, Abbady AQ. A DNA vaccine encoding p39 and sp41 of *Brucella melitensis* induces protective immunity in BALB/c mice. *Arch Med Vet* 2014; 46:53–62.
47. Al-Mariri A, Mahmoud NH, Hammoud R. Efficacy evaluation of live *Escherichia coli* expression *Brucella* P39 protein combined with CpG oligodeoxynucleotides vaccine against *Brucella melitensis* 16M, in BALB/c mice. *Biologicals* 2012; 40:140–45. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.01.002 PMID: 22296786
48. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, Bolle X, Michel P, Godefroid J, et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* 2001; 69:4816–22. doi: 10.1128/IAI.69.8.4816–4822.2001 PMID: 11447155
49. Al-Mariri A. Protection of BALB/c mice against *Brucella melitensis* 16M infection induced by vaccination with live *Escherichia coli* expression *Brucella* P39 protein. *Vaccine* 2010; 28:1766–70. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.12.012 PMID: 20036752
50. Bosseray N, Plommet M. *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. *Vaccine* 1990; 8:462–68. doi: 10.1016/0264-410X(90)90247-J PMID: 2123586
51. Briones G, Iannino NI, Roset M, Vigliocco A, Paulo PS, Ugalde RA. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* 2001; 69:4528–35. doi: 10.1128/IAI.69.7.4528–4535.2001 PMID: 11401996

52. Cabrera A, Sáez D, Céspedes S, Andrews E, Oñate A. Vaccination with recombinant Semliki Forest virus particles expressing translation initiation factor 3 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Immunobiology* 2009; 214:467–74. doi: 10.1016/j.imbio.2008.11.016 PMID: 19150742
53. Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovskiy CA, Barrera S, Bowden R, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun* 2005; 73:8079–88. doi: 10.1128/IAI.73.12.8079–8088.2005 PMID: 16299302
54. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Velikovskiy CA, Barrera S, et al. A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine* 2007; 25:4437–46. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.03.028 PMID: 17442465
55. Cassataro J, Velikovskiy CA, Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, et al. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect Immun* 2005; 73:6537–46. doi: 10.1128/IAI.73.10.6537–6546.2005 PMID: 16177328
56. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, Barrera S, Bowden R, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14:869–74. doi: 10.1128/CVI.00472-06 PMID: 17428946
57. Cassataro J, Velikovskiy CA, Giambartolomei GH, Estein S, Bruno L, Cloeckaert A, et al. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. *Vaccine* 2002; 20:1660–69. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00498-4 PMID: 11858876
58. Céspedes S, Andrews E, Folch H, Oñate A. Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *J Med Microbiol* 2000; 49:165–70. doi: 10.1099/0022-1317-49-2-165 PMID: 10670567
59. Clapp B, Skyberg JA, Yang X, Thornburg T, Walters N, Pascual DW. Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and Th17 cell responses. *Infect Immun* 2011; 79:4165–74. doi: 10.1128/IAI.05080-11 PMID: 21768283
60. Clause M, Díaz AG, Ghersi G, Zylberman V, Cassataro J, Giambartolomei GH, et al. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine* 2013; 31:6129–35. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.041 PMID: 23906889
61. Clause M, Díaz AG, Ibañez AE, Cassataro J, Giambartolomei GH, Estein SM. Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c mice. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21:1689–94. doi: 10.1128/CVI.00527-14 PMID: 25339409
62. Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco JM, et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev. 1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* 2004; 22:2827–35. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.01.001 PMID: 15246618
63. Commander NJ, Brewer JM, Wren BW, Spencer SA, MacMillan AP, Stack JA. Liposomal delivery of p-ialB and p-omp25 DNA vaccines improves immunogenicity but fails to provide full protection against *B. melitensis* challenge. *Genet Vaccines Ther* 2010; 8:1–12. doi: 10.1186/1479-0556-8-5 PMID: 20637091
64. Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, MacMillan AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine* 2007; 25:43–54. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.07.046 PMID: 17049676
65. Dabral N, Moreno-Lafont M, Sriranganathan N, Vemulapalli R. Oral immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* induces protection against intraperitoneal and intranasal challenge with virulent *B. abortus* 2308. *PlosOne* 2014; 9:e107180. doi: 10.1371/journal.pone.0107180 PMID: 25225910
66. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine* 2007; 25:6721–29. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.07.002 PMID: 17686554
67. Estevan M, Gamazo C, Grilló MJ, Barrio GG, Blasco JM, Irache JM. Experiments on a sub-unit vaccine encapsulated in microparticles and its efficacy against *Brucella melitensis* in mice. *Vaccine* 2006; 24:4179–87. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.01.038 PMID: 16481077
68. Fu S, Xu J, Li X, Xie Y, Qiu Y, Du X, et al. Immunization of mice with recombinant protein CobB or AsnC confers protection against *Brucella abortus* infection. *PlosOne* 2012; 7:e29552. doi: 10.1371/journal.pone.0029552 PMID: 22383953

69. Ghasemi A, Jeddi-Tehrani M, Mautner J, Salari MH, Zarnani AH. Immunization of mice with a novel recombinant molecular chaperon confers protection against *Brucella melitensis* infection. *Vaccine* 2014; 32:6659–66. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.013 PMID: 25240754
70. Ghasemi A, Zarnani AH, Ghoojani A, Rezaia S, Salari MH, Jeddi-Tehrani M. Identification of a new immunogenic candidate conferring protection against *Brucella melitensis* infection in mice. *Mol Immunol* 2014; 62:142–49. doi: 10.1016/j.molimm.2014.06.017 PMID: 24995396
71. Ghasemi A, Jeddi-Tehrani M, Mautner J, Salari MH, Zarnani AH. Simultaneous immunization of mice with Omp31 and TF provides protection against *Brucella melitensis* infection. *Vaccine* 2015; 33:5532–8. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.013 PMID: 26384448
72. Goel D, Rajendran V, Ghosh PC, Bhatnagar R. Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent *Brucella abortus* 544. *Vaccine* 2013; 31:1231–37. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.043 PMID: 23273966
73. Golshani M, Rafati S, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Shahcheraghi F, Arsang A, et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNA vaccine encoding *Brucella* L7/L12-truncated Omp31 fusion protein by a DNA priming and protein boosting regimen. *Mol Immunol* 2015; 66:384–91. doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.015 PMID: 25968974
74. González D, Grilló MJ, Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue RM, et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PlosOne* 2008; 3:e2760. doi: 10.1371/journal.pone.0002760 PMID: 18648644
75. Gonzalez-Smith A, Vemulapalli R, Andrews E, Onate A. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. *Immunobiology* 2006; 211:65–74. doi: 10.1016/j.imbio.2005.09.004 PMID: 16446171
76. Grilló MJ, Manterola L, Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Moriyón I, et al. Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth bvrS/bvrR and rough wbkA mutants. *Vaccine* 2006; 24:2910–16. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.12.038 PMID: 16439039
77. Guilloteau LA, Laroucau K, Vizcaino N, Jacques I, Dubray G. Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the omp31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *Vaccine* 1999; 17:353–61. doi: 10.1016/S0264-410X(98)00205-9 PMID: 9987174
78. Gupta VK, Rout PK, Vihan VS. Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Res Vet Sci* 2007; 82:305–13. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.07.014 PMID: 17014873
79. Hamdy MER, El-Gibaly SM, Montasser AM. Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3. *Vet Microbiol* 2002; 88:85–94. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00088-3 PMID: 12119140
80. He Y, Vemulapalli R, Schurig GG. Recombinant *Ochrobactrum anthropi* expressing *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase protects mice against *B. abortus* infection only after switching of immune responses to Th1 type. *Infect Immun* 2002; 70:2535–43. doi: 10.1128/IAI.70.5.2535-2543.2002 PMID: 11953393
81. Hu XD, Chen ST, Li JY, Yu DH, Zhang Y, Cai H. An IL-15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against *Brucella* by increasing the CD8+ cytotoxic T cell response. *Vaccine* 2010; 28:2408–15. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.12.076 PMID: 20064480
82. Izadjoo MJ, Bhattacharjee AK, Paranavitana CM, Hadfield TL, Hoover DL. Oral vaccination with *Brucella melitensis* WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent *Brucella melitensis* 16M. *Infect Immun* 2004; 72:4031–39. doi: 10.1128/IAI.72.7.4031-4039.2004 PMID: 15213148
83. Jain L, Rawat M, Prajapati A, Tiwari AK, Kumar B, Chaturvedi VK, et al. Protective immune-response of aluminium hydroxide gel adjuvanted phage lysate of *Brucella abortus* S19 in mice against direct virulent challenge with *B. abortus* 544. *Biologicals* 2015; 43:369–76. doi: 10.1016/j.biologicals.2015.06.006 PMID: 26156404
84. Jain S, Afley P, Dohre SK, Saxena N, Kumar S. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 2014; 32:4537–42. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.012 PMID: 24950353
85. Jain S, Afley P, Kumar S. Immunological responses to recombinant cysteine synthase A of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *World J Microbiol Biotechnol* 2013; 29:907–13. doi: 10.1007/s11274-012-1247-3 PMID: 23269507
86. Jain-Gupta N, Contreras-Rodriguez A, Vemulapalli R, Witonsky SG, Boyle SM, Sriranganathan N. Pluronic P85 enhances the efficacy of outer membrane vesicles as a subunit vaccine against *Brucella melitensis* challenge in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 66:436–44. doi: 10.1111/1574-695X.12010 PMID: 23163875

87. Jiménez de Bagüés MP, Elzer PH, Blasco JM, Marín CM, Gamazo C, Winter AJ. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect Immun* 1994; 62:632–38. PMID: 8300219
88. Jiménez de Bagüés MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, et al. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect Immun* 1994; 62:4990–96. PMID: 7927779
89. Lacerda TLS, Cardoso PG, Almeida LA, Camargo ILBC, Afonso DAF, Trant CC, et al. Inactivation of formyl transferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine* 2010; 28:5627–34. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.023 PMID: 20580469
90. Lalsiamthara J, Gogia N, Goswami TK, Singh RK, Chaudhuri P. Intermediate rough *Brucella abortus* S19Δper mutant is DIVA enable, safe to pregnant guinea pigs and confers protection to mice. *Vaccine* 2015; 33:2577–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.04.004 PMID: 25869887
91. Leclercq S, Harms JS, Rosinha GMS, Azevedo V, Oliveira SC. Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *J Med Microbiol* 2002; 51:20–6. doi: 10.1099/0022-1317-51-1-20 PMID: 11803949
92. Li X, Xu J, Xie Y, Qiu Y, Fu S, Yuan X, et al. Vaccination with recombinant flagellar proteins FlgJ and FlhN induce protection against *Brucella abortus* 544 infection in BALB/c mice. *Vet Microbiol* 2012; 161:137–44. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.016 PMID: 22854331
93. Li Z, Gui D, Zhang J, Zhang W, Zhang H, Guo F, et al. Immunization of BALB/c mice with *Brucella abortus* 2308ΔwbkA confers protection against wild-type infection. *J Vet Sci* 2015; 16:467–73. doi: 10.4142/jvs.2015.16.4.467 PMID: 26040616
94. Li ZQ, Shi JX, Fu WD, Zhang Y, Zhang J, Wang Z, et al. A *Brucella melitensis* M5-90 wboA deletion strain is attenuated and enhances vaccine efficacy. *Mol Immunol* 2015; 66:276–83. doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.004 PMID: 25899866
95. Lim JJ, Kim DH, Lee JJ, Kim DG, Min W, Lee HJ, et al. Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice. *J Vet Sci* 2012; 13:287–92. doi: 10.4142/jvs.2012.13.3.287 PMID: 23000585
96. Liu J, Li Y, Sun Y, Ji X, Zhu L, Guo X, et al. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 166:138–44. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.04.008 PMID: 26022514
97. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice. *Infect Immun* 2006; 74:2734–41. doi: 10.1128/IAI.74.5.2734–2741.2006 PMID: 16622210
98. Mallick AI, Singha H, Khan S, Anwar T, Ansari MA, Khalid R, et al. Escheriosome-mediated delivery of recombinant ribosomal L7/L12 protein confers protection against murine brucellosis. *Vaccine* 2007; 25:7873–84. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.09.008 PMID: 17931756
99. Mancilla M, Grilló MJ, Miguel MJ, López-Goñi I, San-Román B, Zabalza-Baranguá A, et al. Deletion of the GI-2 integrase and the wbkA flanking transposase improves the stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *BMC Vet Res* 2013; 44:105. doi: 10.1186/1297-9716-44-105 PMID: 24176078
100. Martins RC, Gamazo C, Sánchez-Martínez M, Barberán M, Peñuelas I, Irache JM. Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles. *J Control Release* 2012; 162:553–60. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.07.030 PMID: 22846987
101. Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, López-Goñi I, et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun* 2003; 71: 3261–71. doi: 10.1128/IAI.71.6.3261–3271.2003 PMID: 12761107
102. Montaraz JA, Winter AJ. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun* 1986; 53:245–51. PMID: 3089933
103. Moustafa D, Garg VK, 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* 2011; 29:784–94. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.11.018 PMID: 21109033
104. Muñoz-Montesino C, Andrews E, Rivers R, González-Smith A, Moraga-Cid G, Folch H, et al. Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of *Brucella abortus* induces SOD-specific CD4 and CD8 T Cells. *Infect Immun* 2004; 72:2081–87. doi: 10.1128/IAI.72.4.2081–2087.2004 PMID: 15039330

105. Murillo M, Grilló MJ, Reñé J, Marín CM, Barberán M, Goñi MM, et al. A *Brucella ovis* antigenic complex bearing poly- $\epsilon$ -caprolactone microparticles confer protection against experimental brucellosis in mice. *Vaccine* 2001; 19:4099–106. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00177-3 PMID: 11457533
106. Oñate AA, Céspedes S, Cabrera A, Rivers R, González A, Muñoz C, et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 2003; 71:4857–61. doi: 10.1128/IAI.71.9.4857–4861.2003 PMID: 12933826
107. Oñate AA, Donoso G, Moraga-Cid G, Folch H, Céspedes S, Andrews E. An RNA vaccine based on recombinant Semliki Forest Virus Particles Expressing the Cu,Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 2005; 73:3294–300. doi: 10.1128/IAI.73.6.3294–3300.2005 PMID: 15908354
108. Oñate AA, Vemulapalli R, Andrews E, Schurig GG, Boyle S, Folch H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect Immun* 1999; 67:986–88. PMID: 9916121
109. Palomares-Resendiz E, Arellano-Reynoso B, Hernández-Castro R, Tenorio-Gutiérrez V, Salas-Téllez E, Suárez-Güemes F, et al. Immunogenic response of *Brucella canis* virB10 and virB11 mutants in a murine model. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:35. doi: 10.3389/fcimb.2012.00035 PMID: 22919627
110. Pasquevich KA, Garcia Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J Immunol* 2010; 184:5200–12. doi: 10.4049/jimmunol.0902209 PMID: 20351187
111. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, Samartino CG, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PlosOne* 2011; 6:e16203. doi: 10.1371/journal.pone.0016203 PMID: 21264260
112. Pollak CN, Wanke MM, Estein SM, Delpino MV, Monachesi NE, Comercio EA, et al. Immunization with *Brucella* VirB proteins reduces organ colonization in mice through a Th1-type immune response and elicits a similar immune response in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2015; 22:274–81. doi: 10.1128/CVI.00653-14 PMID: 25540276
113. Pugh GW Jr, Phillips M, Tabatabai LB, McDonald TJ. Unresponsiveness of vaccinated BALB/c mice to a second inoculation of lipopolysaccharide from *Brucella abortus* strain 2308. *Vet Microbiol* 1991; 26:167–77. doi: 10.1016/0378-1135(91)90053-I PMID: 1902610
114. Retamal-Díaz A, Riquelme-Neira R, Sáez D, Rivera A, Fernández P, Cabrera A, et al. Use of S-[2,3-bisphalmitoyloxy-(2R)-propyl]-R-cysteinyl-amido-monomethoxy polyethylene glycol as an adjuvant improved protective immunity associated with a DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* in mice. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21:1474–80. doi: 10.1128/CVI.00554-14 PMID: 25165025
115. Riquelme-Neira R, Retamal-Díaz A, Acuña F, Riquelme P, Rivera A, Sáez D, et al. Protective effect of a DNA vaccine containing an open reading frame with homology to an ABC-type transporter present in the genomic island 3 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 2013; 31:3663–67. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.013 PMID: 23834811
116. Rosinha GMS, Freitas DA, Miyoshi A, Azevedo V, Campos E, Cravero SL, et al. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect Immun* 2002; 70:5036–44. doi: 10.1128/IAI.70.9.5036–5044.2002 PMID: 12183550
117. Rosinha GMS, Miyoshi A, Azevedo V, Splitter GA, Oliveira SC. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J Med Microbiol* 2002; 51:661–71. doi: 10.1099/0022-1317-51-8-661 PMID: 12171297
118. Sanakkayala N, Sokolovska A, Gulani J, HogenEsch H, Sriranganathan N, Boyle SM, et al. Induction of antigen-specific Th1-Type immune responses by gamma-irradiated recombinant *Brucella abortus* RB51. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12:1429–36. doi: 10.1128/CDLI.12.12.1429–1436.2005 PMID: 16339067
119. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 1991; 28:171–88. doi: 10.1016/0378-1135(91)90091-S PMID: 1908158
120. Silva AP, Macêdo AA, Silva TM, Ximenes LC, Brandão HM, Paixão TA, et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated  $\Delta$ abcBA strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin Vaccine Immunol* 2015; 22:789–97. doi: 10.1128/CVI.00191-15 PMID: 25947146

121. Singh D, Goel D, Bhatnagar R. Recombinant L7/L12 protein entrapping PLGA (poly lactide-co-glycolide) micro particles protect BALB/c mice against the virulent *B. abortus* 544 infection. *Vaccine* 2015; 33:2786–92. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.04.030 PMID: 25930114
122. Singha H, Mallick AI, Jana C, Isore DP, Goswami TK, Srivastava SK, et al. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect* 2008; 10:1089–96. doi: 10.1016/j.micinf.2008.05.007 PMID: 18602490
123. Singh D, Somani VK, Aggarwal S, Bhatnagar R. PLGA (85:15) nanoparticle based delivery of rL7/L12 ribosomal protein in mice protects against *Brucella abortus* 544 infection: A promising alternate to traditional adjuvants. *Mol Immunol* 2015; 68:272–9. doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.011 PMID: 26442664
124. Sislema-Egas F, Céspedes S, Fernández P, Retamal-Díaz A, Sáez D, Oñate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1\_0263 and BAB1\_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 2012; 30:7286–91. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.039 PMID: 23026687
125. Soler-Lloréns P, Gil-Ramírez Y, Zabalza-Baranguá A, Iriarte M, Conde-Álvarez R, Zúñiga-Ripa A, et al. Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *BMC Vet Res* 2014; 45:2–11. doi: 10.1186/s13567-014-0072-0 PMID: 25029920
126. Souza Filho JA, Martins VP, Campos PC, Alves-Silva J, Santos NV, Oliveira FS, et al. Mutant *Brucella abortus* membrane fusogenic protein (BMFP) is highly attenuated and induces protection against challenge infection in mice. *Infect Immun* 2015; 83:1458–64.
127. Tabatabai LB, Pugh GW Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine* 1994; 12:919–24. doi: 10.1016/0264-410X(94)90035-3 PMID: 7526568
128. Trant CGMC, Lacerda TLS, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GMS, Salcedo SP, et al. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. *Infect Immun* 2010; 78:2283–91. doi: 10.1128/IAI.01433-09 PMID: 20194591
129. Truong QL, Cho Y, Barate AK, Kim S, Hahn TW. Characterization and protective property of *Brucella abortus* cydC and looP mutants. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21:1573–80. doi: 10.1128/CVI.00164-14 PMID: 25253663
130. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun* 2003; 71:6264–69. doi: 10.1128/IAI.71.11.6264-6269.2003 PMID: 14573645
131. Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden RA, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 2002; 70:2507–11. doi: 10.1128/IAI.70.5.2507-2511.2002 PMID: 11953389
132. Verma SK, Jain S, Kumar S. Immunogenicity and protective potential of a bacterially expressed recombinant dihydrolipoamide succinyltransferase (rE2o) of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; 28:2487–95. doi: 10.1007/s11274-012-1056-8 PMID: 22806154
133. Wang X, An C, Yang M, Li X, Ke Y, Lei S, et al. Immunization with individual proteins of the Lrp/AsnC family induces protection against *Brucella melitensis* 16M challenges in mice. *Front Microbiol* 2015; 6:1193. doi: 10.3389/fmicb.2015.01193 PMID: 26579099
134. Wang Z, Niu J, Wang S, Lv Y, Wu Q. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20:174–80. doi: 10.1128/CVI.00573-12 PMID: 23239800
135. Winter AJ, Rowe GE, Duncan JR, Eis MJ, Widom J, Ganem B, et al. Effectiveness of natural and synthetic complexes of porin and O polysaccharide as vaccines against *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 1988; 56:2808–17. PMID: 2844673
136. Yang Y, Wang L, Yin J, Wang X, Cheng S, Lang X, et al. Immunoproteomic analysis of *Brucella melitensis* and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine. *Mol Immunol* 2011; 49:175–84. doi: 10.1016/j.molimm.2011.08.009 PMID: 21943783
137. Yang Y, Yin J, Guo D, Lang X, Wang X. Immunization of mice with recombinant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase protein confers protection against *Brucella melitensis* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 61:159–67. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00758.x PMID: 21166726
138. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol* 2007; 26:435–43. doi: 10.1089/dna.2006.0552 PMID: 17570767
139. Zhang J, Guo F, Chen C, Li Z, Zhang H, Wang Y, et al. *Brucella melitensis* 16MΔhfq attenuation confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. *Microbiol Immunol* 2013; 57:502–10. doi: 10.1111/1348-0421.12065 PMID: 23647412

140. Zhang J, Yin S, Guo F, Meng R, Chen C, Zhang H, et al. A potent *Brucella abortus* 2308  $\Delta$ ery live vaccine allows for the differentiation between natural and vaccinated infection. *J Microbiol* 2014; 52:681–88. doi: 10.1007/s12275-014-3689-9 PMID: 24994009
141. Zhao Z, Li M, Luo D, Xing L, Wu S, Duan Y, et al. Protection of mice from *Brucella* infection by immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing A L7/L12 and BLS fusion antigen of *Brucella*. *Vaccine* 2009; 27:5214–19. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.06.075 PMID: 19596411
142. Pasquali P, Rosanna A, Pistoia C, Petrucci P, Ciuchini F. *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain *B. abortus* 2308. *Infect Immun* 2003; 71:2326–30. doi: 10.1128/IAI.71.5.2326–2330.2003 PMID: 12704101
143. Deqiu S, Dongliou X, Jiming Y. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Vet Microbiol* 2002; 90:165–82. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00252-3 PMID: 12414142
144. Blasco JM. A review of the use of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 1997; 31:275–83. doi: 10.1016/S0167-5877(96)01110-5 PMID: 9234451
145. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63:8–15. PMID: 20093755
146. Silva TMA, Mol JPS, Winter MG, Atluri VL, Xavier MN, Pires SF, et al. The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*. *PLoS One* 2014; 9:e114532. doi: 10.1371/journal.pone.0114532 PMID: 25474545
147. Macêdo AA, Silva APC, Mol JPS, Costa LF, Garcia LNN, Araújo MSS, et al. The abcEDCBA-encoded ABC transporter and the virB operon-encoded type IV secretion system of *Brucella ovis* are critical for intracellular trafficking and survival in ovine monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2015; 10(9): e0138131. doi: 10.1371/journal.pone.0138131 PMID: 26366863
148. Silva APC, Macêdo AA, Costa LF, Rocha CE, Garcia LNN, Farias JRD, et al. Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ( $\Delta$ abcBA) protects against wild type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS One* 2015b; 10:e0136865. doi: 10.1371/journal.pone.0136865 PMID: 26317399
149. Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht AC. Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine* 2009; 27(Suppl. 4):D40–3. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.058 PMID: 19837284
150. Poester FP, Gonçalves VSP, Paixão TA, Santos RL, Olsen SC, Schurig GG, et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine* 2006; 24:5327–34. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.020 PMID: 16713034
151. Barrio MB, Grillo MJ, Munoz PM, Jacques I, Gonzalez D, Miguel MJ, et al. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine* 2009; 27:1741e9. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.025 PMID: 19186196
152. Young EJ, Gomez CI, Yawn DH, Musher DM. Comparison of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* infections of mice and their effect on acquired cellular resistance. *Infect Immun* 1979; 26:680–5. PMID: 121113
153. Hong PC, Tsois RM, Ficht TA. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 2000; 68:4102–07. PMID: 10858227
154. Kahl-McDonagh MM, Ficht TA. Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect Immun* 2006; 74:4048–57. doi: 10.1128/IAI.01787-05 PMID: 16790778
155. Allen CA, Adams LG, Ficht TA. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 1998; 66:1008–16. PMID: 9488389
156. Ficht TA. Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational analysis. *Vet Microbiol* 2002; 90:311–15. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00216-X PMID: 12414151
157. Edmonds M, Booth N, Hagius S, Walker J, Enright F, Martin Roop RM II, et al. Attenuation and immunogenicity of a *Brucella abortus* htrA cycl double mutant in cattle. *Vet Microbiol* 2000; 76:81–90. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00225-X PMID: 10925044
158. Fiorentino MA, Campos E, Cravero SL, Arese AI, Paolicchi F, Campero C, et al. Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2. *Vet Microbiol* 2008; 132:302–11. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.003 PMID: 18565697
159. Titball RW. Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discov Today* 2008; 13:596–600. doi: 10.1016/j.drudis.2008.04.010 PMID: 18598915
160. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17:1055–65. doi: 10.1128/CCI.00131-10 PMID: 20463105

161. Gomez G, Adams LG, Rice-Ficht A, Ficht TA. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3:17. doi: 10.3389/fcimb.2013.00017 PMID: 23720712
162. Lean IJ, Rabiee AR, Duffield TF, Dohoo IR. Invited review: Use of meta-analysis in animal health and reproduction: methods and applications. *J Dairy Sci* 2009; 92:3545–65. doi: 10.3168/jds.2009-2140 PMID: 19620636
163. Grilló MJ, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet Res* 2012; 43:29. doi: 10.1186/1297-9716-43-29 PMID: 22500859

## Anexo II

Lista de 117 referencias [1-117] usadas na meta-análise – Capítulo II

1. ABKAR, M.; AMANI, J.; SAHEBGHADAM LOTFI, A. et al. Subcutaneous immunization with a novel immunogenic candidate (urease) confers protection against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* infections. *APMIS*, v.123, n.8, p.667-675, 2015.
2. ABKAR, M.; LOTFI, A.S.; AMANI, J. et al. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: influence of nanoparticulation versus traditional immunization. *Vet. Res. Commun.*, v.39, n.4, p.217-228, 2015.
3. ADONE, R.; CIUCHINI, F.; MARIANELLI, C. et al. Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, v.73, n.7, p.4198-4204, 2005.
4. ADONE, R.; FRANZIA, M.; CIUCHINI, F. Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. *Vaccine*, v.26, n.38, p.4913-4917, 2008.
5. ADONE, R.; FRANZIA, M.; PISTOIA, C. et al. *B. melitensis* rough strain B115 is protective against heterologous *Brucella* spp. infections. *Vaccine*, v.29, n.14, p.2523-2529, 2011.
6. AL-MARIRI, A.; ABBADY, A.Q. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy in mice of a DNA vaccine encoding SP41 from *Brucella melitensis*. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v.7, n.4, p.329-337, 2013.
7. AL-MARIRI, A.; AKEL, R.; ABBADY, A.Q. A DNA vaccine encoding p39 and sp41 of *Brucella melitensis* induces protective immunity in BALB/c mice. *Arch. Med. Vet.*, v.46, p.53-62, 2014.
8. AL-MARIRI, A.; MAHMOUD, N.H.; HAMMOUD, R. Efficacy evaluation of live *Escherichia coli* expression *Brucella* P39 protein combined with CpG oligodeoxynucleotides vaccine against *Brucella melitensis* 16M, in BALB/c mice. *Biologicals*, v.40, n.2, p.140-145, 2012.
9. AL-MARIRI, A.; TIBOR, A.; LESTRATE, P. et al. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* Bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.*, v.70, n.4, p.1915-1923, 2002.
10. AL-MARIRI, A.; TIBOR, A.; MERTENS, P. et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect. Immun.*, v.69, n.8, p.4816-4822, 2001.
11. AL-MARIRI, A.; TIBOR, A.; MERTENS, P. et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect. Immun.*, v.69, n.10, p.6264-6270, 2001.
12. AL-MARIRI, A. Protection of BALB/c mice against *Brucella melitensis* 16M infection induced by vaccination with live *Escherichia coli* expression *Brucella* P39 protein. *Vaccine*, v.28, n.7, p.1766-1770, 2010.
13. BHATTACHARJEE, A.K.; IZADJOO, M.J.; ZOLLINGER, W.D. et al. Comparison of protective efficacy of subcutaneous versus intranasal immunization of mice with a *Brucella melitensis* lipopolysaccharide subunit vaccine. *Infect. Immun.*, v.74, n.10, p.5820-5825, 2006.
14. BOSSERAY, N.; PLOMMET, M. *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. *Vaccine*, v.8, n.5, p.462-468, 1990.
15. BRIONES, G.; IANNINO, N.I.; ROSET, M. et al. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.*, v.69, n.7, p.4528-4535, 2001.
16. CABRERA, A.; SÁEZ, D.; CÉSPEDES, S. et al. Vaccination with recombinant Semliki Forest virus particles expressing translation initiation factor 3 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Immunobiology*, v.214, n.6, p.467-474, 2009.
17. CASSATARO, J.; ESTEIN, S.M.; PASQUEVICH, K.A. et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect. Immun.*, v.73, n.12, p.8079-8088, 2005.

18. CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K.A.; ESTEIN, S.M. et al. A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine*, v.25, n.22, p.4437-4446, 2007.
19. CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K.A.; ESTEIN, S.M. et al. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev. 1 vaccination. *Vaccine*, v.25, n.32, p.5958-5967, 2007.
20. CASSATARO, J.; VELIKOVSKY, C.A.; de la BARRERA et al. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect. Immun.*, v.73, n.10, p.6537-6546, 2005.
21. CASSATARO, J.; VELIKOVSKY, C.A.; BRUNO, L. et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.14, n.7, p.869-874, 2007.
22. CASSATARO, J.; VELIKOVSKY, C.A.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. et al. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. *Vaccine*, v.20, n.11-12, p.1660-1669, 2002.
23. CESPEDES, S.; ANDREWS, E.; FOLCH, H. et al. Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *J. Med. Microbiol.*, v.49, n.2, p.165-170, 2000.
24. CLAPP, B.; SKYBERG, J.A.; YANG, X. et al. Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and Th17 cell responses. *Infect. Immun.*, v.79, n.10, p.4165-4174, 2011.
25. CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; GHERSI, G. et al. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine*, v.31, n.51, p.6129-6135, 2013.
26. CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; IBÁÑEZ, A.E. et al. Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.21, n.12, p.1689-1694, 2014.
27. CLOECKAERT, A.; JACQUES, I.; GRILLÓ, M.J. et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, v.22, n.21-22, p.2827-2835, 2004.
28. COMMANDER, N.J.; BREWER, J.M.; WREN, B.W. et al. Liposomal delivery of p-ialB and p-omp25 DNA vaccines improves immunogenicity but fails to provide full protection against *B. melitensis* challenge. *Genet. Vaccines Ther.*, v.8, n.5, p.1-12, 2010.
29. COMMANDER, N.J.; SPENCER, S.A.; WREN, B.W. et al. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine*, v.25, n.1, p.43-54, 2007.
30. DABRAL, N.; MARTHA-MORENO-LAFONT; SRIRANGANATHAN, N. et al. Oral immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* induces protection against intraperitoneal and intranasal challenge with virulent *B. abortus* 2308. *Plos One*, v.9, n.9, e107180, 2014.
31. DELPINO, M.V.; ESTEIN, S.M.; FOSSATI, C.A. et al. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine*, v.25, n.37-38, p.6721-6729, 2007.
32. ESTEIN, S.M.; CASSATARO, J.; VIZCAINO, N. et al. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect.*, v.5, n.2, p.85-93, 2003.
33. ESTEVAN, M.; GAMAZO, C.; GRILLÓ, M.J. et al. Experiments on a sub-unit vaccine encapsulated in microparticles and its efficacy against *Brucella melitensis* in mice. *Vaccine*, v.24, n.19, p.4179-4187, 2006.
34. FU, S.; XU, J.; LI, X. et al. Immunization of mice with recombinant protein CobB or AsnC confers protection against *Brucella abortus* infection. *Plos One*, v.7, n.2, e29552, 2012.
35. GHASEMI, A.; JEDDI-TEHRANI, M.; MAUTNER, J. et al. Immunization of mice with a novel recombinant molecular chaperon confers protection against *Brucella melitensis* infection. *Vaccine*, v.32, n.49, p.6659-6666, 2014.
36. GHASEMI, A.; ZARNANI, A.H.; GHOODJANI, A. et al. Identification of a new immunogenic candidate conferring protection against *Brucella melitensis* infection in mice. *Mol. Immunol.*, v.62, n.1, p.142-149, 2014.

37. GHASEMI, A.; JEDDI-TEHRANI, M.; MAUTNER, J. et al. Simultaneous immunization of mice with Omp31 and TF provides protection against *Brucella melitensis* infection. *Vaccine*, v.33, n.42, p.5532-5538, 2015.
38. GOEL, D.; BHATNAGAR, R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects BALB/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol. Immunol.*, v.51, n.2, p.159-168, 2012.
39. GOEL, D.; RAJENDRAN, V.; GHOSH, P.C. et al. Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent *Brucella abortus* 544. *Vaccine*, v.31, n.8, p.1231-1237, 2013.
40. GOLSHANI, M.; RAFATI, S.; DASHTI, A. et al. Vaccination with recombinant L7/L12-truncated Omp31 protein induces protection against *Brucella* infection in BALB/c mice. *Mol. Immunol.*, v.65, n.2, p.287-292, 2015.
41. GOLSHANI, M.; RAFATI, S.; SIADAT, S.D. et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNA vaccine encoding *Brucella* L7/L12-truncated Omp31 fusion protein by a DNA priming and protein boosting regimen. *Mol. Immunol.*, v.66, n.2, p.384-391, 2015.
42. GONZÁLEZ, D.; GRILLÓ, M.J.; MIGUEL, M.J. et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *Plos One*, v.3, n.7, e2760, 2008.
43. GONZALEZ-SMITH, A.; VEMULAPALLI, R.; ANDREWS, E. et al. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. *Immunobiology*, v.211, n.1-2, p.65-74, 2006.
44. GRILLO, M.J.; MANTEROLA, L.; MIGUEL, M.J. et al. Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth bvrS/bvrR and rough wbkA mutants. *Vaccine*, v.24, n.15, p.2910-2916, 2006.
45. GUILLOTEAU, L.A.; LAROUCAU, K.; VIZCAÍNO, N. et al. Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the omp31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *Vaccine*, v.17, n.4, p.353-361, 1999.
46. GUPTA, V.K.; ROUT, P.K.; VIHAN, V.S. Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Res. Vet. Sci.*, v.82, p.305-313, 2007.
47. HAMDY, M.E.R.; EL-GIBALY, S.M.; MONTASSER, A.M. Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3. *Vet. Microbiol.*, v.88, n.1, p.85-94, 2002.
48. HE, Y.; VEMULAPALLI, R.; SCHURIG, G.G. Recombinant *Ochrobactrum anthropi* expressing *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase protects mice against *B. abortus* infection only after switching of immune responses to Th1 type. *Infect. Immun.*, v.70, n.5, p.2535-2543, 2002.
49. HU, X.D.; CHEN, S.T.; LI, J.Y. et al. An IL-15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against *Brucella* by increasing the CD8+ cytotoxic T cell response. *Vaccine*, v.28, n.12, p.2408-2415, 2010.
50. IANNINO, F.; HERRMANN, C.K.; ROSET, M.S. et al. Development of a dual vaccine for prevention of *Brucella abortus* infection and *Escherichia coli* O157:H7 intestinal colonization. *Vaccine*, v.33, n.19, p.2248-2253, 2015.
51. IZADJOO, M.J.; BHATTACHARJEE, A.K.; PARANAVITANA, C.M. et al. Oral vaccination with *Brucella melitensis* WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent *Brucella melitensis* 16M. *Infect. Immun.*, v.72, n.7, p.4031-4039, 2004.
52. JAIN, L.; RAWAT, M.; PRAJAPATI, A. et al. Protective immune-response of aluminium hydroxide gel adjuvanted phage lysate of *Brucella abortus* S19 in mice against direct virulent challenge with *B. abortus* 544. *Biologicals*, v.43, n.5, p.369-376, 2015.
53. JAIN, S.; AFLEY, P.; DOHRE, S.K. et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*, v.32, n.35, p.4537-4542, 2014.
54. JAIN, S.; AFLEY, P.; KUMAR, S. Immunological responses to recombinant cysteine synthase A of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.29, n.5, p.907-913, 2013.

55. JAIN-GUPTA, N.; CONTRERAS-RODRIGUEZ, A.; VEMULAPALLI, R. et al. Pluronic P85 enhances the efficacy of outer membrane vesicles as a subunit vaccine against *Brucella melitensis* challenge in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.66, n.3, p.436-444, 2012.
56. JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P.; ELZER, P.H.; BLASCO, J.M. et al. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.*, v.62, n.2, p.632-638, 1994.
57. JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P.; ELZER, P.H.; JONES, S.M. et al. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect Immun.*, v.62, n.11, p.4990-4996, 1994.
58. KAUSHIK, P.; SINGH, D.K.; KUMAR, S.V. et al. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant Omp28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet. Res. Commun.*, v.34, n.2, p.119-132, 2010.
59. LACERDA, T.L.S.; CARDOSO, P.G.; ALMEIDA, L.A. et al. Inactivation of formyl transferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine*, v.28, n.34, p.5627-5634, 2010.
60. LALSIAMTHARA, J.; GOGIA, N.; GOSWAMI, T.K. et al. Intermediate rough *Brucella abortus* S19 $\Delta$ per mutant is DIVA enable, safe to pregnant guinea pigs and confers protection to mice. *Vaccine*, v.33, n.22, p.2577-2583, 2015.
61. LECLERQ, S.; HARMS, J.S.; ROSINHA, G.M.S. et al. Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *J. Med. Microbiol.*, v.51, n.1, p.20-26, 2002.
62. LI, X.; XU, J.; XIE, Y. et al. Vaccination with recombinant flagellar proteins FlgJ and FlhN induce protection against *Brucella abortus* 544 infection in BALB/c mice. *Vet. Microbiol.*, v.161, n.1-2, p.137-144, 2012.
63. LI, Z.; GUI, D.; ZHANG, J. et al. Immunization of BALB/c mice with *Brucella abortus* 2308 $\Delta$ wbkA confers protection against wild-type infection. *J. Vet. Sci.*, v.16, n.4, p.467-473, 2015.
64. LI, Z.Q.; SHI, J.X.; FU, W.D. et al. A *Brucella melitensis* M5-90 wboA deletion strain is attenuated and enhances vaccine efficacy. *Mol. Immunol.*, v.66, n.2, p.276-283, 2015.
65. LIM, J.J.; KIM, D.H.; LEE, J.J. et al. Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice. *J. Vet. Sci.*, v.13, n.3, p.287-292, 2012.
66. LIU, J.; LI, Y.; SUN, Y. et al. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.166, n.3-4, p.138-144, 2015.
67. LUO, D.; NI, B.; LI, P. et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice. *Infect. Immun.*, v.74, n.5, p.2734-2741, 2006.
68. MALLICK, A.I.; SINGHA, H.; KHAN, S. et al. Escheriosome-mediated delivery of recombinant ribosomal L7/L12 protein confers protection against murine brucellosis. *Vaccine*, v.25, n.46, p.7873-7884, 2007.
69. MANCILLA, M.; GRILLÓ, M.J.; MIGUEL, M.J. et al. Deletion of the GI-2 integrase and the wbkA flanking transposase improves the stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *BMC Vet. Res.*, v.44, p.105, 2013.
70. MARTINS, R.C.; GAMAZO, C.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M. et al. Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles. *J. Control. Release*, v.162, n.3, p.553-560, 2012.
71. MIRANDA, K.L.; DORNELES, E.M.S.; PAULETTI, R.B. et al. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: Evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1®) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine*, v.33, n.4, p.507-511, 2015.
72. MONREAL, D.; GRILLÓ, M.J.; GONZÁLEZ, D. et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect. Immun.*, v.71, n.6, p.3261, 2003.
73. MONTARAZ, J.A.; WINTER, A.J. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, v.53, n.2, p.245-251, 1986.

74. MOUSTAFA, D.; GARG, V.K.; JAIN, N. et al. 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.
75. MUÑOZ-MONTESINO, C.; ANDREWS, E.; RIVERS, R. González-Smith A, Moraga-Cid G, Folch H, Céspedes S, Oñate AA. Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of *Brucella abortus* induces SOD-specific CD4 and CD8 T cells. *Infect. Immun.*, v.72, n.4, p.2081-2087, 2004.
76. MURILLO, M.; GRILLÓ, M.J.; REÑÉ, J. et al. A *Brucella ovis* antigenic complex bearing poly-ε-caprolactone microparticles confer protection against experimental brucellosis in mice. *Vaccine*, v.19, n.30, p.4099-4106, 2001.
77. OLIVEIRA, S.C.; SPLITTER, G.A. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*, v.14, n.10, p.959-962, 1996.
78. OÑATE, A.A.; CÉSPEDES, S.; CABRERA, A. et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, v.71, n.9, p.4857-4861, 2003.
79. OÑATE, A.A.; DONOSO, G.; MORAGA-CID, G. et al. An RNA vaccine based on recombinant Semliki Forest Virus Particles Expressing the Cu,Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, v.73, n.6, p.3294-3300, 2005.
80. OÑATE, A.A.; VEMULAPALLI, R.; ANDREWS, E. et al. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect. Immun.*, v.67, n.2, p.986-988, 1999.
81. PALOMARES-RESENDIZ, E.; ARELLANO-REYNOSO, B.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. et al. Immunogenic response of *Brucella canis* virB10 and virB11 mutants in a murine model. *Front Cell Infect. Microbiol.*, v.2, p.35, 2012.
82. PASQUEVICH, K.A.; ESTEIN, S.M.; SAMARTINO, C.G. et al. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4 and CD8 T Cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, v.77, n.1, p.436-445, 2009.
83. PASQUEVICH, K.A.; GARCIA SAMARTINO, C.; CORIA, L.M. et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J. Immunol.*, v.184, n.9, p.5200-5212, 2010.
84. PASQUEVICH, K.A.; IBÁÑEZ, A.E.; CORIA, L.M. et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *Plos One*, v.6, n.1, e16203, 2011.
85. POLLAK, C.N.; WANKE, M.M.; ESTEIN, S.M. et al. Immunization with *Brucella* VirB proteins reduces organ colonization in mice through a Th1-type immune response and elicits a similar immune response in dogs. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, n.3, p.274-281, 2015.
86. PUGH JR, G.W.; PHILLIPS, M.; TABATABAI, L.B. et al. Unresponsiveness of vaccinated BALB/c mice to a second inoculation of lipopolysaccharide from *Brucella abortus* strain 2308. *Vet. Microbiol.*, v.26, n.1-2, p.167-177, 1991.
87. RETAMAL-DÍAZ, A.; RIQUELME-NEIRA, R.; SÁEZ, D. et al. Use of S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]-R-cysteinyl-amido-monomethoxy polyethylene glycol as an adjuvant improved protective immunity associated with a DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* in mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.21, n.11, p.1474-1480, 2014.
88. RIQUELME-NEIRA, R.; RETAMAL-DÍAZ, A.; ACUÑA, F. et al. Protective effect of a DNA vaccine containing an open reading frame with homology to an ABC-type transporter present in the genomic island 3 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*, v.31, p.3663-3667, 2013.
89. ROSINHA, G.M.S.; FREITAS, D.A.; MIYOSHI, A. et al. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect. Immun.*, v.70, n.9, p.5036-5044, 2002.
90. ROSINHA, G.M.S.; MYIOSHI, A.; AZEVEDO, V. et al. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3- phosphate-dehydrogenase, a T- and

- B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J. Med. Microbiol.*, v.51, p.661-671, 2002.
91. SAEZ, D.; FERNANDEZ, P.; RIVERA, A. et al. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine*, v.30, n.7, p.1283-1290, 2012.
  92. SANAKKAYALA, N.; SOKOLOVSKA, A.; GULANI, J. et al. Induction of antigen-specific Th1-Type immune responses by gamma-irradiated recombinant *Brucella abortus* RB51. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.12, n.12, p.1429-1436, 2005.
  93. SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M.; BAGCHI, T. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.28, n.2, p.171-188, 1991.
  94. SILVA, A.P.; MACÊDO, A.A.; SILVA, T.M. et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated  $\Delta$ abcBA strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, n.7, p.789-797, 2015.
  95. SINGH, D.; GOEL, D.; BHATNAGAR, R. Recombinant L7/L12 protein entrapping PLGA (poly lactide-co-glycolide) micro particles protect BALB/c mice against the virulent *B. abortus* 544 infection. *Vaccine*, v.33, n.24, p.2786-2792, 2015.
  96. SINGHA, H.; MALLICK, A.; JANA, C. et al. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine*, v.29, n.29-30, p.4720-4727, 2011.
  97. SINGHA, H.; MALLICK, A.I.; JANA, C. et al. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.*, v.10, n.10-11, p.1089-1096, 2008.
  98. SINGH, D.; SOMANI, V.K.; AGGARWAL, S. et al. PLGA (85:15) nanoparticle based delivery of rL7/L12 ribosomal protein in mice protects against *Brucella abortus* 544 infection: A promising alternate to traditional adjuvants. *Mol Immunol.*, v.68, p.272-279, 2015.
  99. SISLEMA-EGAS, F.; CÉSPEDES, S.; FERNÁNDEZ, P. et al. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1\_0263 and BAB1\_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*, v.30, n.50, p.7286-7291, 2012.
  100. SOLER-LLORENS, P.; GIL-RAMÍREZ, Y.; ZABALZA-BARANGUÁ, A. et al. Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *BMC Vet. Res.*, v.45, n.72, p.2-11, 2014.
  101. SOUZA FILHO, J.A.; MARTINS, V.P.; CAMPOS, P.C. et al. Mutant *Brucella abortus* membrane fusogenic protein (BMFP) is highly attenuated and induces protection against challenge infection in mice. *Infect. Immun.*, v.83, n.4, p.1458-1464, 2015.
  102. TABATABAI, L.B.; PUGH JR, G.W. Modulation of immune responses in BALB/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, v.12, n.10, p.919-924, 1994.
  103. TRANT, C.G.M.C.; LACERDA, T.L.S.; CARVALHO, N.B. et al. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. *Infect. Immun.*, v.78, n.5, p.2283-2291, 2010.
  104. TRUONG, Q.L.; CHO, Y.; BARATE, A.K. et al. Characterization and protective property of *Brucella abortus* cydC and looP mutants. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.21, n.11, p.1573-1580, 2014.
  105. UGALDE, J.E.; COMERCI, D.J.; LEGUIZAMÓN, M.S. et al. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect. Immun.*, v.71, n.11, p.6264-6269, 2003.
  106. VELIKOVSKY, C.A.; CASSATARO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, v.70, n.5, p.2507-2511, 2002.
  107. VELIKOVSKY, C.A.; GOLDBAUM, F.A.; CASSATARO, J. et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect. Immun.*, v.71, n.10, p.5750-5755, 2003.

108. VERMA, S.K.; JAIN, S.; KUMAR, S. Immunogenicity and protective potential of a bacterially expressed recombinant dihydrolipoamide succinyltransferase (rE2o) of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.28, n.7, p.2487-2495, 2012.
109. WANG, X.; AN, C.; YANG, M. et al. Immunization with individual proteins of the Lrp/AsnC family induces protection against *Brucella melitensis* 16M challenges in mice. *Front Microbiol.*, v.6, p.1193, 2015.
110. WANG, Z.; NIU, J.; WANG, S. et al. *In vivo* differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.20, n.2, p.174-180, 2013.
111. WINTER, A.J.; ROWE, G.E.; DUNCAN, J.R. et al. Effectiveness of natural and synthetic complexes of porin and O polysaccharide as vaccines against *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, v.56, n.11, p.2808-2817, 1988.
112. YANG, Y.; WANG, L.; YIN, J. et al. Immunoproteomic analysis of *Brucella melitensis* and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine. *Mol. Immunol.*, v.49, n.1-2, p.175-184, 2011.
113. YANG, Y.; YIN, J.; GUO, D. et al. Immunization of mice with recombinant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase protein confers protection against *Brucella melitensis* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.61, n.2, p.159-167, 2011.
114. YU, D.H.; HU, X.D.; CAI, H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol.*, v.26, n.6, p.435-443, 2007.
115. ZHANG, J.; GUO, F.; CHEN, C. et al. *Brucella melitensis* 16M $\Delta$ hfq attenuation confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. *Microbiol. Immunol.*, v.57, p.502-510, 2013.
116. ZHANG, J.; YIN, S.; GUO, F. et al. A potent *Brucella abortus* 2308  $\Delta$ ery live vaccine allows for the differentiation between natural and vaccinated infection. *J. Microbiol.*, v.52, n.8, p.681-688, 2014.
117. ZHAO, Z.; LI, M.; LUO, D. et al. Protection of mice from *Brucella* infection by immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing A L7/L12 and BLS fusion antigen of *Brucella*. *Vaccine*, v.27, n.38, p.5214-5219, 2009.

### Anexo III

**Tabela 1. Lista de referências utilizadas na meta-análise em hospedeiros naturais, relacionadas com a categoria de vacina**

Categoria de vacina	Imunogeno	Hospedeiro	Espécie desafio	Referência
Inativada irradiação	RB51	Bisão	<i>B. abortus</i>	Olsen et al., 2015
Inativada	<i>B. abortus</i> KB 17/100	Bovino	<i>B. abortus</i>	Shumilov et al., 2010
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bisão	<i>B. abortus</i>	Davis et al., 1991
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Bisão	<i>B. abortus</i>	Olsen et al., 2009
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Bisão	<i>B. abortus</i>	Olsen e Johnson, 2012
Atenuada	<i>B. abortus</i> SRB51	Bisão	<i>B. abortus</i>	Olsen et al., 2003
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bovino	<i>B. abortus</i>	Samartino et al., 2000
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Alce	<i>B. abortus</i>	Cook et al., 2002
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Alce	<i>B. abortus</i>	Kreeger et al., 2002
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Ovino	<i>B. melitensis</i>	el Idrissi et al., 2001
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Ebrahimi et al., 2012
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Kahl-McDonagh et al., 2006
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Edmonds et al., 2002
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Tabynov et al., 2016b
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	caprino	<i>B. melitensis</i>	Díaz-Aparicio et al., 2004
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	caprino	<i>B. melitensis</i>	Phillips et al., 1997
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	caprino	<i>B. melitensis</i>	Elzer et al., 1998
Atenuada	<i>B. abortus</i>	Bovino	<i>B. abortus</i>	Shumilov et al., 2010

---

75/79-AB				
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Bovino	<i>B. abortus</i>	Olsen et al., 1999
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Bovino	<i>B. abortus</i>	Olsen, 2000
subunidade	rBoIL 2	Bovino	<i>B. abortus</i>	Wyckoff III et al., 2005
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bovino	<i>B. abortus</i>	Tabynov et al., 2016a
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bovino	<i>B. abortus</i>	Shumilov et al., 2010
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bovino	<i>B. melitensis</i>	Tabynov et al., 2015
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bovino	<i>B. abortus</i>	Wyckoff III et al., 2005
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bovino	<i>B. abortus</i>	Fiorentino et al., 2008
Atenuada	<i>B. abortus</i> S19	Bovino	<i>B. abortus</i>	Confer et al., 1985
Atenuada	<i>B. abortus</i> RB51	Ovino	<i>B. ovis</i>	Jiménes de Bagués et al., 1995
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. ovis</i>	Blasco et al., 1993
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. ovis</i>	Martins et al., 2010
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. ovis</i>	Muñoz et al., 2006
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. ovis</i>	Garcia-Carrillo, 1981
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. ovis</i>	Blasco e Marin, 1987
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Jacques et al., 2007
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. ovis</i>	Grilló et al., 2009
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Barrio et al., 2009
Atenuada	<i>B. melitensis</i> Rev1	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Tabynov et al., 2016b

---

Vetor	<i>B. abortus</i> RB51 +sodC,wboA	Bisão	<i>B. abortus</i>	Olsen et al., 2009
Vetor	Flu-BA	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Tabynov et al., 2016b
Vetor	Flu-BA	Bovino	<i>B. melitensis</i>	Tabynov et al., 2015
Vetor	Flu-BA	Bovino	<i>B. abortus</i>	Tabynov et al., 2016b
Vetor	Flu-L7/L12- Omp16	Bovino	<i>B. abortus</i>	Tabynov et al., 2014
Vetor	Flu-L7/L12- Omp16- MontanideGe I01	Bovino	<i>B. abortus</i>	Tabynov et al., 2014
Vetor	Omp16 e L7/L12 (vírus H1N1 e H5N1)	Bovino	<i>B. abortus</i>	Tabynov et al., 2016c
Vetor	Flu-BA	Bovino	<i>B. melitensis</i>	Tabynov et al., 2016c
Mutante	sRB51 + SODc, WboA	Alce	<i>B. abortus</i>	Nol et al., 2016
Mutante	<i>B. melitensis</i> htrA	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Phillips et al., 1997
Mutante	<i>B. melitensis</i> $\Delta$ asp24	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Kahl-McDonagh et al., 2006
Mutante	<i>B. melitensis</i> $\Delta$ omp25	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Edmonds et al., 2002
Mutante	<i>B. melitensis</i> $\Delta$ virB2	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Kahl-McDonagh et al., 2006
Mutante	VTRM1 - <i>B.</i> <i>melitensis</i>	Caprino	<i>B. melitensis</i>	Elzer et al., 1998
Mutante	<i>B. abortus</i> INTA2 (I2)	Bovino	<i>B. abortus</i>	Fiorentino et al., 2008
Mutante	<i>B. abortus</i> M1-luc	Bovino	<i>B. abortus</i>	Fiorentino et al., 2008
Mutante	<i>B. ovis</i> $\Delta$ abcBA	Ovino	<i>B. ovis</i>	Silva et al., 2015
Mutante	<i>B. melitensis</i> 16M Rwa	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Barrio et al., 2009
Mutante	<i>B. melitensis</i> H38 Rper	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Barrio et al., 2009

---

Mutante	<i>B. melitensis</i> H38 RwbkF	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Barrio et al., 2009
Mutante	<i>B. melitensis</i> Rev 1 $\Delta$ bp26 (CGV26)	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Jacques et al., 2007
Mutante	<i>B. melitensis</i> Rev 1 $\Delta$ bp26/omp31 (CGV2631)	Ovino	<i>B. melitensis</i>	Jacques et al., 2007
Mutante	<i>B. melitensis</i> Rev1 $\Delta$ bp26	Ovino	<i>B. ovis</i>	Grilló et al., 2009
Mutante	<i>B. melitensis</i> Rev1 $\Delta$ bp26/ $\Delta$ omp 31	Ovino	<i>B. ovis</i>	Grilló et al., 2009
Subunidade	rBoIL 2	Bovino	<i>B. abortus</i>	Wyckoff III et al., 2005
Subunidade	SPEBA	Bovino	<i>B. abortus</i>	Wyckoff III et al., 2005
Subunidade	SPEBA + rBoIL 2	Bovino	<i>B. abortus</i>	Wyckoff III et al., 2005
Subunidade	45/20 bacterin	Ovino	<i>B. ovis</i>	Blasco et al., 1993
Subunidade	Blebs	Ovino	<i>B. ovis</i>	Blasco et al., 1993
Subunidade	HS	Ovino	<i>B. ovis</i>	Blasco et al., 1993
Subunidade	HS - PEC	Ovino	<i>B. ovis</i>	Martins et al., 2010
Subunidade	HS-PCP	Ovino	<i>B. ovis</i>	Blasco et al., 1993
Subunidade	HS-PEC	Ovino	<i>B. ovis</i>	Muñoz et al., 2006
Subunidade	Man-NP-HS	Ovino	<i>B. ovis</i>	Martins et al., 2010
Subunidade	NP - HS	Ovino	<i>B. ovis</i>	Martins et al., 2010
Subunidade	PG-OM	Ovino	<i>B. ovis</i>	Blasco et al., 1993
Subunidade	rBLSOmp31	Ovino	<i>B. ovis</i>	Estein et al. 2009

---

## Anexo IV

### Lista de 45 referencias [1-45] usadas na meta-análise – Capítulo III

1. ALAVI-SHOUSHTARI S.M.; ZEINALI, A. Responses of female lambs to Rev-1 (brucellosis) vaccination. *Prev. Vet. Med.*, v.21, n.4, p.289-229, 1995.
2. ALTON, G.G.; CORNER L.A.; PLACKETT, P. Vaccination of cattle against brucellosis using either a reduced dose of strain 19 or one or two doses of 45/20 vaccine. *Aust. Vet. J.*, v.60, n.6, p.175-177, 1983.
3. ALTON, G.G.; CORNER, L.A.; PLACKETT, P. Vaccination of pregnant cows with low doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *Aust. Vet. J.*, v.56, n.8, p. 369-372, 1980.
4. BARRIO, M.B.; GRILLÓ, M.J.; MUÑOZ, P.M. et al. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, v.27, p.1741-1749, 2009.
5. BLASCO, J.M.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M et al. Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Vet. Microbiol.*, v.14, n.4, p.381-392, 1987.
6. BLASCO, J.M.; GAMAZO, C.; WINTER, A.J. et al. Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.37, p.257-270, 1993.
7. CAPORALE, V.; BONFINI, B.; DI GIANNATALE, E. et al. Efficacy of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 compared to the reference vaccine *Brucella abortus* strain 19 in water buffalo. *Vet. Ital.*, v.46, n.1, p. 5-11, 2010.
8. CONFER, A.W.; HALL, S.M.; FAULKNER, C.B. et al. Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Microbiol.*, v.10, n.6, p.561-575, 1985.
9. COOK, W.E.; WILLIAMS, E.S.; THORNE, E.T. et al. *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in elk. I. Efficacy of reduced dosage. *J. Wildl Dis.*, v.38, n.1, p.18-26, 2002.
10. DAVIS, D.S.; TEMPLETON, J.W.; FICHT, T.A. et al. *Brucella abortus* in Bison. II. Evaluation of strain 19 vaccination of pregnant cows. *J. Wildl Dis.*, v.27, n.2, p.258-264, 1991.
11. DÍAZ-APARICIO, E.; HERNÁNDEZ, L.; SUÁREZ-GÜEMES, F. Protection against brucellosis in goats, five years after vaccination with reduced-dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.36, n.2, p.117-121, 2004.
12. EBRAHIMI, M.; NEJAD, R.B.; ALAMIAN, S. et al. Safety and efficacy of reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 vaccine in pregnant Iranian fat-tailed ewes. *Vet. Ital.*, v.48, n.4, p.405-412, 2012.
13. EDMONDS, M.D.; CLOECKAERT, A.; HAGIUS, S.D. et al. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Delta *Omp25* deletion mutant. *Res. Vet. Sci.*, v.72, n.3, p.235-239, 2002.
14. el IDRISSE, A.H.; BENKIRANE, A.; el MAADOUDI, M. et al. Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Rev. Sci. Tech.*, v.20, n.3, p.741-747, 2001.
15. ELZER, P.H.; ENRIGHT, F.M.; MCQUISTON, J.R. et al. Evaluation of a rough mutant of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Res. Vet. Sci.*, v.64, n.3, p.259-260, 1998.
16. ESTEIN, S.M.; FIORENTINO, M.A.; PAOLICCHI, F.A. et al. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, v.27, p.6704-6711, 2009.
17. FIORENTINO, M.A.; CAMPOS, E.; CRAVERO, S. et al. Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2. *Vet. Microbiol.*, v.132, p.302-311, 2008.
18. GARCIA-CARRILLO, C. Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. *Zbl. Vet. Med. B.*, v.28, p.425-431, 1981.
19. GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M. et al. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, v.27, p.187-191, 2009.

20. JACQUES, I.; VERGER, J.M.; LAROUCAU, K. et al. Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by bp26 and omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine*, v.25, p.794-805, 2007.
21. JIMÉNEZ DE BAGUES, M.P.; BARBERÁN, M.; MARIN, C.M. et al. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, v.13, n.3, p. 301-304, 1995.
22. KAHL-MCDONAGH, M.M.; ELZER, P.H.; HAGIUS, S.D. et al. Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine*, v.24, p.5169-5177, 2006.
23. KREEGER, T.J.; COOK, W.E.; EDWARDS, W.H. et al. *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in elk. II. Failure of high dosage to prevent abortion. *J. Wildl Dis.*, v.38, n.1, p.27-31, 2002.
24. KREEGER, T.J.; MILLER, M.W.; WILD, M.A. et al. Safety and efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in captive pregnant elk. *J. Wildl Dis.*, v.36, n.3, p.477-483, 2000.
25. MARTINS, R.C.; IRACHE, J.M.; BLASCO, J.M. et al. Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, v.28, p.3038-3046, 2010.
26. MUÑOZ, P.M.; ESTEVAN, M.; MARÍN, C.M. et al. *Brucella* outer membrane complex-loaded microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, v.24, p.1897-1905, 2006.
27. NOL, P.; OLSEN S.C.; RHYAN J.C. et al. Vaccination of elk (*Cervus canadensis*) with *Brucella abortus* strain RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes does not induce adequate protection against experimental *Brucella abortus* challenge. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v.6, n.10, p.1-10, 2016.
28. OLSEN, S.C.; BRICKER, B.; PALMER, M.V.; JENSEN, A.E.; CHEVILLE, N.F. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res. Vet. Sci.*, v.66, n.2, p.101-105, 1999.
29. OLSEN SC. Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet. Ther.*, v.1, n.3, p.183-191, 2000.
30. OLSEN SC. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res. Vet. Sci.*, v.69, n.2, p.135-140, 2000.
31. OLSEN, S.C.; BOYLE, S.M.; SCHURIG, G.G. et al. Immune responses and protection against experimental challenge after vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51 or RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.16, n.4, p. 535-540, 2009.
32. OLSEN, S.C.; JENSEN, A.E.; STOFFREGEN, W.C. et al. Efficacy of calfhood vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 in protecting bison against brucellosis. *Res. Vet. Sci.*, v.74, p.17-22, 2003.
33. OLSEN, S.C.; JOHNSON, C.S. Efficacy of dart or booster vaccination with strain RB51 in protecting bison against experimental *Brucella abortus* challenge. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.19, n.6, p. 886-890, 2012.
34. OLSEN, S.C.; MCGILL, J.L.; SACCO, R.E. et al. Immune responses of bison and efficacy after booster vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Clin Vaccine Immunol.*, v.22, p.440-447, 2015.
35. PHILLIPS, R.W.; ELZER, P.H.; ROBERTSON, G.T. et al. A *Brucella melitensis* high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant is attenuated in goats and protects against abortion. *Res. Vet. Sci.*, v.63, n.2, p.165-167, 1997.
36. POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; PAIXÃO, T.A. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, p.5327-5334, 2006.
37. SAMARTINO, L.E.; FORTB, M.; GREGOIRET, R. et al. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, v.45, p.193-199, 2000.
38. SHUMILOV, K.V.; SKLYAROV, O.; KLIMANOV, A. Designing vaccines against cattle brucellosis. *Vaccine*, v.28, n.5, p.F31-F34, 2010.
39. SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, LF. et al. Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ( $\Delta$ abcBA) protects against wild type *Brucella ovis* in rams. *PLoS ONE*, v.10, n.8: e0136865, 2015.

40. TABYNOV, K.; KYDYRBAYEV, Z.; RYSKELDINOVA, S. et al. Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins in cattle induced a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection. *Vaccine*, v.32, p.2034-2041, 2014.
41. TABYNOV, K.; ORYNBAYEV, M.; RENUKARADHYA, G.J. et al. Simultaneous subcutaneous and conjunctival administration of the influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine to pregnant heifers provides better protection against *B. abortus* 544 infection than the commercial *B. abortus* S19 vaccine. *Vaccine*, v.34 p.5049-5052, 2016.
42. TABYNOV, K.; RYSKELDINOVA, S.; SANSYZBAY, A. An influenza viral vector *Brucella abortus* vaccine induces good cross-protection against *Brucella melitensis* infection in pregnant heifers. *Vaccine*, v.33, p.3619-3623, 2015.
43. TABYNOV, K.; YESPEMBETOV, B.; MATIKHAN, N. et al. First evaluation of an influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine in sheep and goats: Assessment of safety, immunogenicity and protective efficacy against *Brucella melitensis* infection. *Vet. Microbiol.*, v.197, p.15-20, 2016.
44. TABYNOV, K.; YESPEMBETOV, B.; RYSKELDINOVA, S. et al. Prime-booster vaccination of cattle with an influenza viral vector *Brucella abortus* vaccine induces a long-term protective immune response against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*, v.34, p.438-444, 2016.
45. WYCKOFF III, J.H.; HOWLAND, J.L.; SCOTT, C.M.O.C. et al. Recombinant bovine interleukin 2 enhances immunity and protection induced by *Brucella abortus* vaccines in cattle. *Vet. Microbiol.*, v.111, p.77-87, 2005.