

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E RESIDUAL DAS VACINAS  
CONTRA A BRUCELOSE BOVINA COMERCIALIZADAS NO  
BRASIL**

***GENETIC AND RESIDUAL EVALUATION OF VACCINE  
AGAINST BRUCELLOSIS MARKED IN BRAZIL***

**Renata Ribeiro Bastos Pereira**

**CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
FEVEREIRO DE 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E RESIDUAL DAS VACINAS  
CONTRA A BRUCELOSE BOVINA COMERCIALIZADAS NO  
BRASIL**

***GENETIC AND RESIDUAL EVALUATION OF VACCINE  
AGAINST BRUCELLOSIS MARKED IN BRAZIL***

**Renata Ribeiro Bastos Pereira**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Grácia Maria Soares Rosinha**

**Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração: Saúde Animal

**CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2011**

**Renata Ribeiro Bastos Pereira**

"Avaliação genética e residual das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil"

"Genetic and residual evaluation of vaccine against bovine brucellosis marketed in Brazil"

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 28/02/2011

  
Dr. Cleber Oliveira Soares  
Co-Orientador

  
Dra. Vanessa Felipe de Souza

  
Dra. Carina Elisei de Oliveira

*Seja o que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes  
não têm as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam.  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem a importância  
das pessoas que passam por suas vidas.*

(Clarisse Lispector)

*Ao Deus supremo...*

*À minha amada família: Meus pais Renato e  
Jupira, e minha irmã Carina, meus mais valiosos  
presentes de vida, que me dão força, segurança e  
coragem para nunca desistir dos meus sonhos...*

*Dedico...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, meu supremo Senhor, pela dádiva da vida, por me fazer superar as adversidades e ter me abençoado para que este sonho nascesse e fosse adiante... Por ter iluminado meus passos, meus pensamentos e meus sentimentos. E principalmente, por ter sido meu suporte na busca de soluções para o que parecia impossível...

Meu maior agradecimento é dirigido aos meus pais, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Agradeço em especial a meu pai, que apesar da distância, me ensinou a arte de pensar no trabalho acadêmico com rigor e disciplina, propiciando-me a fundamentação básica, sem a qual este trabalho não teria sido escrito. Agradeço, de forma muito carinhosa, a atuação de minha mãe no período de construção deste trabalho. Sua paciência infinita e sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta dissertação.

À minha orientadora, Dra. Grácia Maria Soares Rosinha pela sua disposição ímpar e seu incansável esforço de sempre dar todas as condições físicas e laboratoriais para a execução deste trabalho. Mas, principalmente por sua amizade incondicional, carinho, atenção, encorajamento, estímulo, compreensão e confiança a mim depositadas em todos os momentos. Muito obrigada por tudo que você é não só comigo, mas com todos os seus bolsistas e estagiários!

Ao meu co-orientador, pela disponibilidade e esclarecimentos necessários para o meu desempenho e crescimento profissional.

À amiga Dra. Carina Elisei de Oliveira, um agradecimento todo especial, por sua amizade sincera, carinho e companheirismo durante toda a minha vida acadêmica e durante a fase de execução deste projeto, com seu suporte emocional, sempre disposta a ajudar, e pela paciência, sendo meu alicerce nos meus dias de muita ansiedade e nervosismo. E principalmente, por confiar em mim e me fazer acreditar no meu potencial.

Ao Programa de Mestrado em Ciência Animal na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade. A todos os professores, sempre tão dispostos a ensinar, que vieram de seus respectivos estados com tanta energia, alegria, profissionalismo e dedicação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro indispensável.

Ao Sr. Paulo Martins Soares Filho do MAPA por ter cedido as amostras padrão, essenciais para a execução deste projeto.

À Embrapa Gado de Corte, em especial ao laboratório de Biologia Molecular Animal, onde pude realizar meus experimentos. Aos pesquisadores que sempre estiveram dispostos a ajudar, ouvir e discutir qualquer questão.

À Dra. Vanessa Felipe de Souza pelo apoio e por deixar seu laboratório sempre à disposição.

À Dra. Lenita por estar sempre pronta a esclarecer dúvidas e a passar seus conhecimentos.

À Sra. Marinalva pelas brincadeiras e bom humor na limpeza dos laboratórios.

Aos amigos que tive a oportunidade de conviver no laboratório... Entre eles Nádia, Anna Letícia, Aline, Marriellen, Cristiane, Cléber, Mônica, Irene, Simone, Patrícia, Bruna, Carina Jank... Muitos que sempre me apoiaram em todos os momentos, mas principalmente, pela amizade, alegria, companheirismo, união e disposição deste grupo que esteve sempre pronto a ajudar. Sem esquecer os nossos momentos de confraternização, pois o que não faltou foi motivo para comemorar!

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

**SUMÁRIO**

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1.1. Histórico.....	5
1.2. Classificação taxonômica e características do gênero.....	6
1.3. Prevalência.....	7
1.4. Perdas econômicas.....	8
1.5. Transmissão e patogenia.....	8
1.6. Resposta imune.....	9
1.7. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT).....	11
1.7.1. Diagnóstico.....	12
1.7.2. Vacinação.....	13
1.7.2.1. Vacina B19.....	14
1.7.2.2. Vacina RB51.....	17
REFERÊNCIAS.....	19
ARTIGO CIENTÍFICO.....	31

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para identificação e verificação de possíveis alterações nas vacinas comercializadas.....	40
Quadro 2. Resultados das ampliações por PCR para diferenciação das amostras selvagem S2308 e vacinais B19 e RB51.....	41

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação do gene *virB5*.....42
- Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação do gene *ery*.....42
- Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação do gene *wboA*.....43
- Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação do gene *IS711*.....44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% – por cento

μL – microlitro

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desorribonucleotídeo trifosfatado

et al. – e colaboradores

g – grama

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LPS – lipopolissacarídeo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min – minuto

mL – mililitro

nm – nanomol

OIE – Organização mundial de saúde animal (*World Organisation for Animal Health*)

°C – graus Celsius

pb – pares de base

PBS – tampão salina fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pmol – picomol

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose

RNAse – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

SDS – duodecil sulfato de sódio

Taq – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

TSA – meio *Trypic Soy Agar* para crescimento de *Brucella*

TSB – meio *Trypic Soy Broth* para crescimento de *Brucella*

UFC – unidade formadora de colônia

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América

WHO – Organização mundial de saúde (*World Health Organization*)

## RESUMO

A Brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*, que infectam animais e o homem, apresentando um grande impacto econômico e de saúde pública, sobretudo em países em desenvolvimento. Afeta as fêmeas prenhes causando aborto em torno do sétimo mês de gestação e redução na produção de leite. É estimado que a brucelose cause perdas de 20 a 25% na produção leiteira, devido aos abortos e aos problemas de fertilidade. Por ser uma zoonose de distribuição mundial e que causa sérios danos econômicos à produção pecuária, a brucelose nos bovinos recebeu atenção maior, por parte dos órgãos públicos, nas últimas 2 décadas, culminando com a criação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT. A prevenção contra infecções causadas por *Brucella abortus* em bovinos é feita principalmente por meio de administração da amostra vacinal B19. Esta amostra sofreu uma mutação espontânea no gene *ery*, com deleção de 702 pares de base (pb), ocorrendo a inibição do crescimento desta na presença de eritritol. Porém, na Índia foram observadas amostras vacinais B19 que não apresentam essa deleção, mostrando a importância da genotipagem do gene *ery* nas vacinas comercializadas no Brasil. No ano de 2007 a amostra vacinal RB51 passou a ser utilizada como alternativa para a amostra vacinal B19, como uma vacina para prevenção da brucelose e abortos em bovinos, pois os animais vacinados com RB51 mostraram maior resistência à infecção e uma diminuição da incidência de aborto quando foram experimentalmente infectados com a amostra virulenta S2308 de *B. abortus*. Entretanto, no ano de 2009 foram descritos casos de aborto em vacas de uma fazenda no Irã após a vacinação com a amostra vacinal RB51. Portanto, toda a ocorrência de abortos em animais vacinados merece um estudo aprofundado sobre essa causa. No Brasil, não há registro sobre a origem das amostras B19 e RB51 utilizadas na confecção das vacinas comerciais, logo um estudo no sentido da verificação de possíveis mutações em relação às amostras padrão USDA B19 e USDA RB51 se faz necessário, devido estas poderem reverter a sua virulência.

**Palavras-chave:** Brucelose, *Brucella abortus*, vacina, B 19, RB51

## ABSTRACT

Brucellosis is an infectious and contagious disease caused by bacteria of the genus *Brucella*, infecting animals and humans, presenting a major economic and public health impact, especially in developing countries. It affects the pregnant females causing abortion around the seventh month of gestation and reduction in the milk production. It is estimated that brucellosis causes losses of 20 to 25% in milk production due to miscarriages and fertility problems. It is a zoonosis of worldwide distribution and causing serious economic damage to livestock production, the brucellosis in cattle received greater attention on the part of public agencies, in the last 2 decades, culminating with the creation of the National Program for Control and Eradication of Brucellosis in of Tuberculosis – PNCEBT. The prevention of infections caused by *Brucella abortus* in cattle is mainly done through administration of the vaccine sample B19. This sample has a spontaneous mutation in the gene *ery*, with a deletion of 702 base pairs (bp), the inhibition of the growth occurring in the presence of erythritol. However, samples were observed in India B19 vaccine do not show this deletion, showing the importance of genotyping of the gene *ery* in vaccines marketed in Brazil. In 2007 the sample RB51 vaccine began to be used as an alternative for the sample B19 vaccine as a vaccine to prevent brucellosis in cattle and abortion, because the animals vaccinated with RB51 showed greater resistance to infection and a decreased incidence of abortion when they were experimentally infected with virulent S2308 sample *B. abortus*. However, in the year 2009 have been reported cases of abortion in cows from a farm in Iran after vaccination with the vaccine RB51 sample. Therefore, all abortions in vaccinated animals deserve a thorough study on this question. In Brazil, there is no record of the origin of the samples B19 and RB51 vaccines used in the manufacture of commercial, then a study towards the verification of possible mutations compared to standard samples USDA B19 and USDA RB51 is necessary, because they can reverse its virulence.

**Key Words:** Brucellosis, *Brucella abortus*, vaccine, B 19, RB51

## INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Brucella* são os agentes etiológicos da brucelose, uma das principais doenças zoonóticas que pode infectar tanto animais silvestres e animais domésticos de valores elevados quanto seres humanos. O gênero contém diversas espécies que são definidas principalmente com base na especificidade do animal hospedeiro (NICOLETTI, 1989; BOSCHIROLI et al., 2001). A brucelose bovina, causada por *B. abortus*, é uma das doenças infecciosas que causa grandes perdas econômicas à cadeia de bovinocultura de corte e leite, devido aos prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos ocasionados nos animais (POESTER et al., 2002; MONREAL et al., 2003).

As vacinas recomendadas pela Organização Mundial de Epizotias (OIE) nos programas de controle da brucelose são as vacinas atenuadas B19 e RB51. Ambas são boas indutoras de imunidade celular (BRASIL, 2005).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) adotou no ano de 2001 a vacina B19 contra a brucelose para a imunização em massa de vacas entre três e oito meses de idade. No ano de 2007 foi aprovado a Instrução Normativa (IN) DAS-MAPA nº13 (28/08/2007) que regulamentou o uso da vacina RB51 restringindo sua administração para fêmeas que não foram vacinadas com a amostra B19 e para fêmeas adultas não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose (BRASIL, 2007), sendo que os procedimentos de referência recomendado pela OIE incluem testes *in vitro* como: pureza (ausência de microorganismos estranhos); viabilidade (número de bactérias viáveis por dose); suavidade (análise de diluente) e testes *in vivo*, como a determinação da virulência residual e imunogenicidade em camundongos (OIE, 2009).

A B19 é uma amostra lisa, que expressa a cadeia O em seu lipopolissacarídeo (LPS), estimulando a formação de anticorpos que induzem uma resposta sorológica positiva em testes de vigilância. Desta forma, não é possível diferenciar a resposta de anticorpos causada pela vacina de infecções com isolados de campo de *B. abortus* (CHEVILLE et al., 1993; OLSEN, 2010).

As espécies pertencentes ao gênero *Brucella* utilizam preferencialmente a via metabólica do eritritol, promovendo o crescimento das amostras em meios ricos em eritritol (SANGARI et al., 2000). A identificação da amostra vacinal B19 está baseada no gene ligado ao catabolismo do eritritol (*ery*), a qual apresenta uma deleção parcial neste gene. O gene *ery*

tem sido descrito na literatura como um importante marcador na diferenciação de B19 das amostras selvagens (EWALT; BRICKER, 2000).

A amostra vacinal B19 sofreu uma mutação espontânea no gene *ery*, com deleção de 702 pares de base (pb), ocorrendo a inibição desta amostra na presença do eritritol (SANGARI et al., 2000; MIYASHIRO et al., 2007). Porém, foram observadas amostras vacinais B19 que não apresentam essa deleção (MUKHERJEE et al., 2005), mostrando a importância da genotipagem do gene *ery* nas vacinas comercializadas no Brasil.

Estudos indicam que organismos de membrana rugosa podem ser usados para induzir resposta imune sem o problema de interferência no diagnóstico sorológico. Consequentemente, vários projetos estão sendo realizados para desenvolver amostras rugosas de *B. abortus* que não possuam o antígeno-O do LPS, componente da parede bacteriana, responsável pela indução de anticorpos que interferem no diagnóstico sorológico da brucelose. O melhor resultado até o momento foi o desenvolvimento da amostra rugosa de *B. abortus* RB51 e que não reverte para morfologia lisa mesmo após sucessivas passagens *in vivo* e *in vitro*. Esta é uma amostra *knockout* derivada da amostra lisa e virulenta S2308 de *B. abortus*, obtida por passagens em meios de cultura contendo doses sub-inibitórias de rifampicina (SCHURIG et al., 1991; POESTER et al., 2002; SAMARTINO, 2002).

A amostra rugosa RB51 de *B. abortus* é utilizada como antígeno vacinal em vários países como: EUA, Chile, Uruguai, e em menor escala, no Brasil (BRASIL, 2007; WHO, 1997; POESTER et al., 2006).

A amostra vacinal RB51 está sendo utilizada como alternativa para a amostra vacinal B19, como uma vacina para prevenção da brucelose e abortos em bovinos, pois os animais vacinados com RB51 mostraram maior resistência à infecção e uma diminuição da incidência de aborto quando foram experimentalmente infectados com a amostra virulenta S2308 de *B. abortus* (SCHURIG, 1991; CHEVILLE et al., 1996). Entretanto, Yazdi e colaboradores (2009) descreveram casos de aborto em vacas de uma fazenda no Irã após a vacinação com a amostra vacinal RB51.

A vacina RB51 quando utilizada em dose única, produz um efeito protetor em bovinos similar à amostra B19, com a vantagem de ser menos patogênica para os seres humanos e poder ser diferenciada de isolados de campo. Porém, esta amostra tem a desvantagem de ser resistente à rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (WHO, 1997).

O elemento de inserção, denominado IS711, é um fragmento de 842 pb delimitado por repetições imperfeitas de 20 pb que interrompe a síntese da cadeia O, quando inserido no gene *wboA*, o qual está envolvido na síntese da cadeia-O de *Brucella* spp. (VEMULAPALLI et al.,

1999). Este elemento está presente em cinco ou mais cópias no genoma de *Brucella* spp., sendo estável em número e posição no cromossomo (HALLING; ZEHR, 1990; BRICKER; HALLING, 1994; BRICKER; HALLING, 1995). Entretanto, diferenças no número de elementos foram relatadas, como o biovar 1 de *B. abortus* que possui sete cópias (OUAHRANI et al., 1993).

Como a vacina RB51 é destituída da cadeia O, esta amostra usualmente não induz a produção de anticorpos anti-cadeia O, que são detectados em testes sorológicos convencionais usados no diagnóstico de brucelose, porém, alguns estudos verificaram a presença desta cadeia em baixos níveis, indicando desta forma que pode estar havendo uma reversão da mutação espontânea (SCHURIG et al., 1991; SHURIG et al., 2002). Além disso, a avaliação da estabilidade genética é um dos elementos essenciais para garantir a qualidade biológica das vacinas (GARCÍA-YOULDI et al., 2007). Desta forma, objetivou-se com este estudo analisar as amostras vacinais B19 e RB51 comercializadas no Brasil, para verificar possíveis mutações genéticas em relação à amostra referência.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. Histórico**

A brucelose é uma antropozoonose conhecida desde o tempo de Hipócrates. Ao longo do litoral Mediterrâneo em 450 a.C. já havia relatos de doença com características semelhantes à brucelose. Em 1887, o médico militar David Bruce isolou e descreveu a presença do agente no baço de quatro soldados ingleses, da Ilha de Malta, que teriam morrido de brucelose, o qual denominou *Micrococcus melitensis*. Os soldados apresentavam doença crônica debilitante com complicações reumáticas devido à ingestão de leite cru de cabras. Em homenagem a Bruce, a espécie foi renomeada de *Brucella melitensis* (BRUCE, 1887; RUST, 2010; MANTUR et al., 2007; NICOLETTI, 2002).

No ano de 1897, na Dinamarca, Bernhard Bang e Stribolt demonstraram que o aborto epizoótico das vacas era provocado por um bacilo, nominando-o como a doença de Bang (CARVALHO et al., 1995; MURRAY et al., 2005; MANTUR et al., 2007). A designação de Febre Ondulante vigorou desde 1897, proposta por Louis Hughes até o aparecimento definitivo do termo brucelose. Hughes estabeleceu o nome da espécie – *melitensis* – quando isolou *Micrococcus melitensis* de tecido cerebral (RUST, 2010).

O primeiro estudo sobre brucelose bovina no Brasil foi realizado pelo professor Manoel Gonçalves Carneiro, em 1913, que por meio de testes sorológicos relatou um foco de brucelose na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (GUERREIRO et al., 1984). Em 1931, Sílvio Torres verificou a existência de oito animais soropositivos para brucelose e 19 suspeitos em um lote de 51 bovinos importados. Como consequência, em 1933 César Pinto propôs a implementação de um protocolo de testes em animais importados como forma de impedir a disseminação da doença no país (BOLETIM, 1988).

Thiago de Mello, em 1950, relatou a disseminação da brucelose bovina por todo o país apontando para uma prevalência de 10% a 20%, onde os índices mais altos estavam nas regiões leiteiras do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, sendo que apenas em 1975, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou o primeiro inquérito sorológico nacional (GARCIA-CARRÍLLO, 1987 apud PAULIN; FERREIRA NETO, 2002 APUD PAULIN; FERREIRA NETO, 2002; POESTER et al., 2002).

## 1.2. Classificação taxonômica e características do gênero

Reino Monera

Filo Proteobacteria

Classe Alphaproteobacteria

Ordem Rhizobiales

Família Brucellaceae

Gênero *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos Gram-negativos, aeróbicos e imóveis, que não esporulam e não encapsulam (CORBEL; BRINLEY-MORGAN, 1984). Como características deste gênero destaca-se a presença de dois cromossomos circulares de 2,1 Mb e 1,5 Mb e a ausência de plasmídeos (MICHAUX et al., 1993) devido ao fato de ambos *replicons* conterem genes essenciais à sobrevivência destas bactérias (VIZCAÍNO et al., 2000). Apresentam também a ausência de fatores clássicos de virulência da bactéria, tais como exotoxinas, enzimas citolítica, fímbrias, flagelos ou cápsulas (CARDOSO, 2006).

Análises realizadas com o gene 16S rRNA, por hibridização DNA-DNA e provas bioquímicas sugerem que as espécies de *Brucella* constituem um gênero monofilético, além disso, o alto grau de similaridade entre elas suporta a proposta de que as espécies clássicas de

*Brucella* sejam amostras de *B. melitensis*. Verger e colaboradores (1985) propuseram uma única espécie: *Brucella melitensis*, subdividindo-a em biovars, *B. melitensis* biovar Abortus, *B. melitensis* biovar Suis, *B. melitensis* biovar Canis, *B. melitensis* biovar Neotomae e *B. melitensis* biovar Ovis.

Entretanto, esta visão é conflitante com a hipótese clássica evolutiva que denomina as espécies de acordo com os hospedeiros preferenciais. A comum associação entre patógenos-hospedeiros possibilita a divisão do gênero *Brucella* em dez espécies da seguinte forma: *B. melitensis* em caprinos (podendo infectar bovinos, ovinos, canídeos e humanos); *B. abortus* em bovinos (bubalinos, cervídeos, canídeos e humanos); *B. ovis* em ovinos, *B. suis* em suínos, *B. neotomae* em ratos do deserto, *B. canis* em canídeos (humanos) (CORBEL; BRINLEY-MORGAN, 1984); *B. ceti* (golfinhos e baleias); *B. pinnipedialis* (focas e leões marinhos) (FOSTER et al., 2007); *B. microti* (roedor *Microtus arvalis*) (SCHOLZ et al., 2008) e *B. inopinata* em humanos (SCHOLZ et al., 2010).

### 1.3. Prevalência

A brucelose bovina apresenta distribuição mundial, com exceção do Japão, Canadá, Austrália e de vários países europeus onde foi erradicada após adoção de medidas iniciadas há mais de vinte anos (MONTEIRO, 2004).

Atualmente, o Brasil detém o maior rebanho bovino do mundo, com aproximadamente 176 milhões de cabeças, sendo que a maior parte está concentrada na região Centro-Oeste, que possui o maior rebanho nacional com cerca de 52 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2010). As distintas condições geográficas, econômicas e sociais encontradas no país indicam a existência de níveis também variados de sistemas de criações. Estas características exercem uma importante influência na forma de controle da brucelose bovina e gera grandes diferenças na prevalência da patologia entre os Estados e as regiões (BRASIL, 1977; BRASIL, 2000). Dados oficiais sobre notificação da brucelose bovina no Brasil, coletados no período entre 1988 e 1998, indicam que a prevalência média de animais soropositivos oscilou entre 4% e 5%, sendo diagnosticada em todos os Estados da Federação. Contudo, existem diferenças na prevalência da infecção por *B. abortus* entre os Estados. Em estudo sorológico realizado pelo MAPA em 1975, foi observada uma prevalência de 4% na região Sul, 7,5% na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 2% na região Nordeste e 4,1% na região Norte (ANSELMO; PAVEZ, 1977, POESTER et al., 2002).

A presença da brucelose no rebanho brasileiro, tanto de corte como de leite, ainda é muito alta, causando grandes prejuízos aos sistemas de produção. No ano de 2009, foram feitos estudos de prevalência em vários Estados brasileiros, sendo que Mato Grosso do Sul apresentou o maior índice de fazendas que apresentaram pelo menos um animal reagente à prova sorológica, chegando a ser da ordem de 41,5% (CHATE et al., 2009).

A prevalência desta doença no rebanho nacional gera barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal, além de custos diretos e indiretos, por tratar-se de uma doença de extrema importância na área veterinária e para a saúde pública.

#### **1.4. Perdas econômicas**

Do ponto de vista econômico, a brucelose bovina parece ser zoonose a que assume maior importância. As perdas econômicas são causadas por abortos, redução de 15% na produção de bezerros, aumento no intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses, diminuição de 25% na produção de carne e leite, e por complicações reprodutivas, com períodos de esterilidade temporária ou infertilidade, além da desvalorização comercial das propriedades e seus animais considerados infectados (MONTEIRO, 2004; BRASIL, 2006).

No Brasil, não existem estudos recentes sobre os prejuízos econômicos ocasionados pela brucelose bovina. Em 1971 o MAPA estimou um prejuízo de US\$ 32 milhões/ano em decorrência apenas do abortamento e queda da produção leiteira (POESTER et al., 2002). Na Argentina os prejuízos causados pela brucelose chegam a US\$ 60 milhões/ano (SAMARTINO, 2002).

#### **1.5. Transmissão e patogenicidade**

De forma geral, os sinais clínicos, em que se destacam os abortamentos, são consequência de vários fatores, como dose de desafio, as características da amostra, a susceptibilidade do hospedeiro, o período da gestação em que a fêmea foi infectada e as práticas de manejo da propriedade (PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003).

Para os animais, as fontes de transmissão são apresentadas principalmente por pastagens, alimentos e águas contaminados, além de fômites ou sêmen contaminados, sendo também muito importante a via aerógena (ACHA; SZYFRES, 1986).

A infecção por *B. abortus* ocorre quando a bactéria penetra na mucosa nasal, oral ou conjuntival. Após a penetração no organismo, há um curto período de bacteremia, e as bactérias, caso sobrevivam no interior dos linfonodos regionais, disseminam-se por todo organismo, indo para órgãos ou tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como fígado, baço, medula óssea e articulações (MONTEIRO, 2004; THOEN et al., 1993).

As espécies de *Brucella* têm a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas (JONES; WINTER, 1992) e não fagocíticas (DETILLEUX, 1990). No interior de macrófagos, têm a capacidade de inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo e evitar a sua destruição pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (PIZARRO-CERDÁ et al, 1998). Desta forma, a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos facilita a disseminação e a permanência de *B. abortus* no organismo (GORVEL; MORENO, 2002).

Os órgãos de predileção são aqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para seu metabolismo, como eritritol, que está presente no útero gravídico, tecidos mamários e osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

O curso da doença depende do estágio fisiológico do animal. Animais jovens antes da puberdade parecem ser mais resistentes à infecção e, caso o animal não esteja gestante, *B. abortus* geralmente infecta linfonodos e glândula mamária (NICOLETTI, 1980, CRAWFORD et al., 1990). A partir do quarto mês de gestação, a concentração de eritritol no útero eleva-se atingindo níveis máximos próximo ao parto e estimula a multiplicação da bactéria de forma crescente, provocando o aborto (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993; BISHOP et al., 1994).

Na primeira gestação após a infecção o animal aborta, sendo o aborto menos frequente na segunda gestação após infecção e muito raro a partir da terceira gestação (THOEN et al. 1993, CORBEL et al., 2006). Isso se deve ao desenvolvimento de uma resposta imune, principalmente celular que diminui a área e a intensidade das lesões. Dessa forma, a manifestação clínica passa a ser o nascimento de bezerros fracos (NICOLETTI 1990, THOEN et al., 1993).

## **1.6. Resposta imune**

O sistema imune é um complexo de órgãos, células e substâncias bioquímicas que são responsáveis pela defesa do corpo animal contra o ataque de invasores externos, seja

impedindo a entrada deles ou, evitando sua multiplicação e se encarregando de destruí-los (PERRIER, 2008).

A resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *B. abortus* envolve tanto a resposta inata como a adquirida. A imunidade adaptativa é mediada por linfócitos B e T que reconhecem os patógenos por meio de receptores de alta afinidade. No entanto, o estabelecimento da imunidade adaptativa é lento porque depende da ativação de genes, da síntese de proteínas e da proliferação celular. Já a imunidade inata proporciona mecanismos de defesa mais rápidos, pois reconhecem patógenos invasores por meio de receptores específicos, denominados receptores do tipo “TOLL” localizados na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs). A ligação dos receptores a este patógeno induz a produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias com regulação de moléculas co-estimuladoras que desencadeiam a imunidade adaptativa (WERLING; JUNGI, 2003).

No que se refere à resposta imune específica, esta envolve tanto a ativação das células T CD4+ e CD8+, como a resposta humoral (ARAYA et al., 1989; GOLDING et al., 2001). Para entender este tipo de resposta imune envolvido na infecção por *Brucella* spp., a maioria dos estudos utilizam, modelos murinos (camundongos das linhagens BALB/c e CD-1). O critério usado para medir a proteção nos camundongos imunizados é a redução do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Brucella*, recuperadas do baço ou fígado, após o desafio com amostra virulenta (WHO, 1997).

A imunidade adquirida contra a infecção de *B. abortus* em camundongos é mediada principalmente por linfócitos T e suas citocinas. Os anticorpos, por sua vez, têm o papel de opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção (CHEERS; HO, 1983), facilitando a fagocitose pelos macrófagos (WINTER et al., 1989). Porém, os anticorpos não reduzem a taxa de crescimento intracelular de *B. abortus in vivo* e não conferem resistência a camundongos susceptíveis (CHEERS; HO, 1983).

Apesar dos macrófagos serem uma barreira de defesa contra *Brucella* por serem considerados as células mais importantes do sistema imune, encontrados na interface entre a imunidade inata e adaptativa e, destruindo bactérias fagocitadas (ROSENBERGER; FINLAY, 2003), *Brucella* possui a habilidade de sobreviver e replicar dentro do macrófago e outras células do hospedeiro tornando-se inacessível a mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS; HO, 1983).

Apesar dos anticorpos terem a sua função na imunidade adquirida contra *Brucella*, a proteção efetiva contra a infecção é dependente da imunidade mediada por células T (MACKANESS, 1964).

Evidências indicam que anticorpos contra *Brucella* possuem um papel tanto protetor quanto nocivo. Anticorpos IgM, que aparecem inicialmente após infecção, e baixos níveis de IgG irão causar a lise de *Brucella* mediada pelo complemento. Entretanto, níveis elevados de anticorpos IgG parecem agir como anticorpos bloqueadores que modulam negativamente a capacidade do complexo de ataque da membrana do complemento apesar de níveis elevados de anticorpos específicos e da falta de correlação entre proteção e títulos elevados de anticorpos. Anticorpos bloqueadores promovem a opsonização e captação por fagócitos onde *Brucella* desenvolveu mecanismos de sobrevivência e proliferação (WALKER, 2003).

A cronicidade da infecção por *Brucella* depende da capacidade do organismo, pela falta de opsonização, sobreviver e se replicar dentro macrófagos, impedir a fusão fagolisossomo pela remodelagem do compartimento intracelular, e posteriormente se replicar intracelularmente. O componente crucial da imunidade que resulta na sobrevivência do hospedeiro e, portanto, a manutenção do estado crônico infeccioso é o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). A produção de IFN- $\gamma$  resulta da possibilidade dos componentes de *Brucella* interagirem com os receptores *Toll-like* para a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ , embora a regulação da produção de IL-10 também seja produzida e diminua o controle de a infecção. Apesar das células T CD4+ e T CD8+ estarem claramente envolvidas na produção de IFN- $\gamma$ , as células T CD8+ podem ser citotóxicas. Além disso, os anticorpos têm demonstrado ter um papel limitado nos estudos de transferência passiva (BALDWIN; GOENKA, 2006).

### **1.7. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT)**

No Brasil, desde a década de setenta, o controle da brucelose era realizado de forma muito limitada e sem estratégia populacional, ou seja, com enfoque em rebanhos e nos indivíduos e não na população bovina. Desde o ano 2000, o MAPA reconheceu a necessidade de definir uma estratégia de controle da brucelose e da tuberculose e foi constituído um grupo de trabalho que elaborou o PNCEBT. Os objetivos principais deste programa são o aumento da eficácia das medidas de combate à brucelose e à tuberculose, promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor, diminuir os impactos negativos das duas zoonoses na saúde pública, modernizar as cadeias produtivas de leite e de carne para o aumento da produtividade, promover a competitividade da pecuária nacional e, em consequência, ofertar ao mercado internacional produtos de melhor qualidade, gerando divisas para os produtores e para o país (BRASIL, 2000).

Dois focos principais fundamentam o programa com relação à brucelose bovina: o diagnóstico indireto, baseado até o momento em técnicas sorológicas, e a vacinação.

### 1.7.1. Diagnóstico

A brucelose pode ser diagnosticada por diferentes métodos: isoladamente ou em conjunto (OLASCOAGA, 1976; POESTER et al., 2005). Os métodos de diagnóstico para a detecção da brucelose são baseados em aspectos clínicos, nos dados epidemiológicos do rebanho das propriedades e nos métodos laboratoriais pela identificação do agente por métodos diretos, como isolamento e cultura do agente, detecção do DNA genômico por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), ou por métodos indiretos pela detecção de anticorpos contra as espécies de *Brucella* (ACHA; SZYFRES, 1986; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2004).

Os métodos indiretos são utilizados como testes de triagem e são baseados na presença de anticorpos no soro e fluídos corporais. Os testes para diagnóstico indireto reconhecidos como oficiais são: prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-Mercaptoetanol, fixação do Complemento e prova do anel em leite. Já os métodos diretos como isolamento e cultura do agente trazem grandes riscos de infecção para o executor, pois este microrganismo pode se dispersar pelo ar e ser inalado, desta forma se faz necessário a utilização de equipamentos adequados de proteção (NEWBY et al., 2003; PROBERT et al., 2004).

As observações clínicas e epidemiológicas proporcionam apenas uma indicação da provável presença da enfermidade em um rebanho, o que deve ser confirmado pela identificação da bactéria, que é o método mais confiável de diagnóstico. No entanto, a identificação de *B. abortus* é um processo lento, caro e de alto risco para o laboratorista, pois envolve a manipulação de placentas potencialmente contaminadas, exsudatos vaginais, sêmen, tecidos de fetos abortados ou leite contaminado (ALTON et al., 1988; CORBEL et al., 2006), que exige a observação de normas estritas de biossegurança (CHOSEWOOD; WILSON, 2007). O método clássico para a identificação das espécies de *Brucella*, a partir de cultivo em meio bacto-triptose, requer no mínimo uma semana para obtenção de um resultado (OIE, 2009).

Ensaio de PCR têm sido desenvolvidos para diferenciação das espécies e biovars de *Brucella*, baseado no tamanho dos fragmentos amplificados (BRICKER; HALLING, 1994); associados às análises do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) (BARREIRA-SALDANÃ et al., 1996; DA COSTA, 1996) e do polimorfismo por amplificação randômica

(TCHERNEVA et al., 2000). A diferenciação da amostra vacinal B19 das amostras selvagens utilizando o gene *ery*, também tem sido realizada. Em estudo com amostras de queijos de fabricação caseira do Estado de São Paulo e Minas Gerais foi detectado e diferenciado DNA de *B. abortus* (amostra de campo) da amostra selvagem S2308 da amostra vacinal B19 (MIYASHIRO et al., 2007).

A detecção de anticorpos no soro ou leite é o meio mais rápido, econômico e menos laborioso de diagnóstico e é um indicativo confiável de resposta à exposição ao agente *B. abortus* (OLASCOAGA, 1976; NIELSEN, 2002; POESTER et al., 2005), porém umas das principais desvantagens é a impossibilidade de diferenciação dos animais vacinados com B19, e dos infectados com a amostra selvagem, devido à presença da porção imunodominante externa do LPS, chamada antígenos (OIE, 2009).

### **1.7.2. Vacinação**

As fêmeas bovinas, por sua importância na transmissão e na manutenção da brucelose, constituíram o alvo dos inquéritos do PNCEBT animal. Sendo assim, o PNCEBT introduziu a vacinação obrigatória contra a brucelose bovina e bubalina em todo o território nacional e definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas.

Estabeleceu-se um prazo para cada Estado implantar em todo o seu território a obrigatoriedade de vacinação de bezerras contra a brucelose. A vacinação só pode ser realizada sob a responsabilidade de médicos veterinários; estes deverão estar cadastrados no serviço oficial de defesa sanitária animal de seu Estado de atuação. Em regiões onde houver carência de veterinários privados, ou nos casos em que eles não atendam plenamente às necessidades do Programa, o serviço oficial de defesa sanitária animal poderá executar ou supervisionar as atividades de vacinação.

Espera-se que, até dezembro de 2010, ao menos 80% da população de fêmeas adultas tenham sido vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a amostra B19. Quando essa meta for atingida, a prevalência de brucelose deverá situar-se em níveis que permitam passar à fase de erradicação.

No ano de 2007 o MAPA divulgou uma Instrução Normativa que autoriza a vacinação de fêmeas com idade superior a oito meses, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51 (BRASIL, 2006).

### 1.7.2.1. Vacina B19

Dentre as vacinas vivas mais utilizadas, a vacina B19 foi e continua sendo largamente empregada em programas de controle em vários países. Esta amostra foi descrita em 1930 (JONES; HOOPER, 1976), isolada originalmente em 1923 pelo Dr. John Buck a partir do leite de uma vaca Jérsei infectada, sendo esta a sua 19<sup>a</sup> passagem que foi “esquecida” por mais de um ano em meio de cultura à temperatura ambiente e quando foi subcultivada, o Dr. Buck descobriu que o microorganismo não causava mais a doença nos bovinos, embora conferisse imunidade protetora (TIZARD, 1998). A amostra B19 demonstrou ter sofrido mutações que conduziram à sua atenuação permanente, com fisiologia incapaz de crescer em presença de eritritol, embora alguns isolados desta amostra de abortos sejam capazes de crescer em eritritol. Esta amostra demonstrou ser imunogênica para bovinos em vários experimentos e seu grau de proteção é variável em função de fatores como a idade de vacinação, a dose, a via de aplicação e a prevalência da enfermidade. Apesar de sua baixa patogenicidade para bovinos, a vacinação de fêmeas prenhes pode resultar em abortos, os quais podem variar entre 1% a 2,5% em condições de campo (CAVALLERO, 1998).

Adams (1990) refere que, se utilizada de forma correta, a amostra B19. A vacinação é realizada em fêmeas de três a oito meses de idade utilizando a vacina viva atenuada B19, para que a reação vacinal decresça antes da maturidade sexual, pois a resposta imune é difícil de ser distinguida da infecção natural (REDMAN et al., 1967; NIELSEN et al., 1984; RIBEIRO et al., 1997). A vacinação com a amostra B19 é realizada em dose única sob responsabilidade de médicos veterinários cadastrados no serviço oficial de defesa sanitária animal. Esta vacina foi empregada em vários países que erradicaram a doença, como por exemplo, Austrália, Canadá, Dinamarca, Inglaterra, Holanda, Suécia, dentre outros. Foi também a vacina utilizada no programa de controle nos EUA até a primeira metade da década de 90 (BRASIL, 2006).

A B19 é atenuada para fêmeas bovinas, vacinadas até oito meses e pode ser patogênica para machos e quaisquer outras espécies incluindo o homem, devido à virulência residual que conserva. A vacina leva os machos a permanecerem com títulos vacinais por toda a vida, além de haver a possibilidade de desenvolverem orquite com consequente infertilidade por diminuição da qualidade espermática (CAMPERO, 1993; OMS, 1986).

A presença do LPS com a cadeia O na amostra B19, explica o aparecimento e persistência dos anticorpos no soro após a vacinação, os quais são detectados nos testes

sorológicos utilizados para o diagnóstico da brucelose, dificultando a diferenciação entre animais infectados e vacinados, o que se constitui em um importante problema em programas de controle e erradicação da enfermidade. O aparecimento e persistência destes anticorpos dependem da idade, dose e via de aplicação da vacina (CAVALLERO, 1998).

Por ser a fração antigênica mais imunodominante, a cadeia O é a responsável pela resposta de anticorpos na maioria dos animais expostos *Brucella* spp. lisas. Como a maioria dos testes sorológicos é baseada na detecção de anticorpos contra a cadeia O, vacinas elaboradas com amostras lisas, como a B19, são responsáveis pela produção de anticorpos que não podem ser distinguidos dos anticorpos induzidos pela infecção por *B. abortus* selvagem (STEVENS et al., 1995, SCHURIG et al., 2002).

A identificação da amostra vacinal B19 está baseada em um gene ligado ao catabolismo do eritritol (*ery*). Este tem sido descrito na literatura como um importante marcador na diferenciação de B19 das amostras selvagens (EWALT; BRICKER, 2000). As espécies pertencentes ao gênero *Brucella* utilizam preferencialmente a via metabólica do eritritol, promovendo o crescimento das amostras em meios ricos em eritritol. A amostra vacinal atenuada B19 sofreu uma mutação espontânea no gene *ery*, com deleção de 702pb, ocorrendo a inibição da amostra na presença desse álcool (SANGARI et al., 2000). Entretanto foram observadas amostras comerciais da vacina B19 que não possuem esta deleção (MUKHERJEE et al., 2005).

O eritritol é um álcool polihídrico de quatro carbonos, que foi cristalizado a partir do líquido amniótico e alantoidiano bovino (PEARCE et al., 1961). A via bioquímica da transformação do eritritol para 3-ceto-L-eritrose 4-fosfato depende dos genes do operon *ery* que codifica três enzimas responsáveis pela transformação (SPERRY; ROBERTSON, 1975; SANGARI et al., 2000). A eritrose 4-fosfato, o precursor para a biossíntese de compostos aromáticos em bactérias, pode ser facilmente obtido a partir de intermediários do catabolismo do eritritol. Assim, o eritritol pode ser crucial para se obter moléculas como aminoácidos aromáticos e catecóis que desempenham importante papel fisiológico em *Brucella*, proporcionando uma ligação entre o metabolismo do eritritol e a virulência de *Brucella* (SANGARI et al., 2000). Porém, foi reportada a ausência de D-eritrose-1-fosfato desidrogenase, na amostra B19, uma enzima crítica no mecanismo de catabolismo do eritritol, sendo que este defeito causa a acumulação do produto tóxico intermediário D-eritrose 1-fosfato e uma depleção nos níveis de ATP, inibindo o crescimento bacteriano (ADAMS, 1990; SANGARI et al., 2000). No entanto, essa inibição não é completa, pois mutantes espontaneamente tolerantes ao eritritol aparecem regularmente em taxas diferentes, na amostra B19, dependendo da origem e manutenção das culturas (JONES et al., 1965;

CORNER; ALTON, 1981; BECKETT; MACDIARMID, 1985; SANGARI et al., 1996; GRILLÓ et al., 2000).

A base genética e as consequências biológicas para a tolerância ao eritritol ainda não foram completamente elucidadas (SANGARI et al., 1998; SANGARI et al., 2000). Estudos relatam que a existência de mutantes espontâneos de B19 tolerantes ao eritritol crescem na presença desse açúcar, mas são incapazes de oxidá-lo, porém conservam a característica da deleção do gene *ery*, bem como as características de virulência residual nos camundongos (MEYER, 1966; MEYER, 1967; SANGARI et al., 1998), sugerindo uma recuperação fenotípica do defeito no metabolismo do eritritol, onde a acumulação de metabólitos intermediários não é tóxica para estes mutantes.

O metabolismo do eritritol é uma característica marcante do gênero *Brucella*. Experimentos demonstraram que o eritritol é capaz de estimular o crescimento de todas as espécies de *Brucella* em meios de cultura. Altas concentrações de eritritol na placenta e no útero gravídico, juntamente com a estimulação do crescimento, deram origem ao paradigma de que este açúcar é responsável pelo tropismo da bactéria para os tecidos (SMITH; FICHT, 1990).

A amostra vacinal B19 é menos infecciosa e não cresce na presença de eritritol (1 mg / mL) em meios de cultura. Evidência posterior minimizou a importância do metabolismo deste açúcar como mecanismo de virulência, pois nos seres humanos e roedores o eritritol não está presente nos tecidos reprodutivos ou placenta, mas as bactérias estão presentes. Este açúcar também não está presente em macrófagos, onde *Brucella* consegue se replicar de forma eficiente (SANGARI; AGÜERO, 1996).

O eritritol aumenta no terço final da gestação e facilita a multiplicação de *Brucella*, causando necrose e/ou deposição de fibrina na região dos cotilédones placentários (PAULIN, 2003; GUIDO; GRASSO, 2005). Esta substância é produzida pelo feto, que é capaz de estimular o crescimento de *Brucella abortus*, ocorre naturalmente em grande concentração na placenta e fluídos fetais e é provável responsável pela localização da infecção nesses tecidos (RIBEIRO, 2000; PACHECO, 2007). Tais lesões inflamatório-necróticas de placentomas impedem a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, sendo responsáveis pelo aborto (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006; PELLEGRIN et al, 2006).

No Brasil, a vacinação é obrigatória para bezerras com idade entre três e oito meses de idade (BRASIL, 2006), mas como algumas raças de bovinos leiteiros se desenvolvem mais cedo, nesses casos é recomendada a vacinação entre três a seis meses, a fim de diminuir interferência dos anticorpos persistentes no sorodiagnóstico de forma que as novilhas irão

apresentar resultado negativo ou desprezível quando submetidas ao seu primeiro teste (RICHEY; HARRELL, 1997).

A vacina B19, também chamada anabortina, é produzida segundo normas internacionais com amostra viva de *B. abortus* estirpe B19 e tem sido a mais utilizada no mundo contra a brucelose bovina. É estável, sensível ao eritritol e causa mínimas reações locais e sistêmicas após a sua inoculação (ALTON et al., 1988).

O objetivo da utilização da B19 é baixar a taxa de infecção em zonas de alta prevalência, propiciando a erradicação da doença. Quando a imunização é aplicada sistematicamente numa região, existe uma redução gradual da frequência da brucelose. Quando a cobertura vacinal atinge 80%, a prevalência da doença estará em níveis inferiores a 2% (OMS, 1986).

#### **1.7.2.2. Vacina RB51**

As amostras rugosas de *B. abortus* apesar de apresentarem pouca ou nenhuma habilidade para induzir anticorpos contra a cadeia O, são capazes de provocar significativa proteção contra a infecção por *B. abortus*, indicando que estas amostras podem ser utilizadas para conferir uma boa resposta imune evitando os problemas de diagnóstico já referidos (CAVALLERO, 1998).

O lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de *Brucella* spp. está diretamente relacionado com a morfologia colonial das amostras. No geral, as colônias são morfologicamente classificadas, como: lisas e rugosas. Colônias lisas podem se tornar espontaneamente rugosas e amostras rugosas de *Brucella* spp. originalmente lisas, podem reverter à forma lisa (ALTON et al., 1988). Segundo alguns estudos, estas mudanças são mediadas pela modulação ou deleção de genes responsáveis pela síntese da cadeia O ou outros genes responsáveis pela biosíntese do LPS (GORVEL; MORENO, 2002; OLIVEIRA et al., 2002).

A vacina RB51 é uma amostra mutante de *B. abortus* resistente a rifampicina, de morfologia rugosa, e que não converte para morfologia lisa mesmo após sucessivas passagens *in vivo* e *in vitro*. Estudos indicam que organismos de membrana rugosa podem ser usados para induzir resposta imune sem o problema de interferência no diagnóstico sorológico. A vacina RB51 é destituída de cadeia O, apesar de alguns estudos a verificarem em baixos níveis, portanto, usualmente, não induz a produção de anticorpos anti-cadeia O, que são

detectados em testes sorológicos convencionais usados no diagnóstico de brucelose (SCHURIG et al., 1991; SCHURIG et al., 2002).

Experimentos a campo demonstram que tanto em áreas de baixa como de alta prevalência a imunidade induzida pela RB51 é similar ou melhor que da B19. Todas as espécies examinadas se manifestam sorologicamente negativas em testes convencionais após a vacinação com RB51 (SCHURIG et al., 1991; SCHURIG et al., 2002). Em estudo realizado por Parmer e colaboradores (1997), verificou-se que fêmeas gestantes podem com segurança ser vacinadas com RB51, via subcutânea, sem subsequente aborto ou placentite, entretanto, Cavallero (1998) afirmou que apesar da amostra ser bastante atenuada, apresenta uma capacidade reduzida de produzir aborto.

A sigla origina-se do R de rugosa, B de *Brucella* e o número 51 da nomenclatura interna utilizada no laboratório durante o processo de seleção, não relacionado com o número de passagens usadas para selecionar a amostra. Devido à ausência da cadeia O vacinas elaboradas com esta amostra não produzem anticorpos anti-cadeia O capazes de serem detectados nos testes sorológicos utilizados no diagnóstico da brucelose, independente da dose, idade e frequência das inoculações. Seu efeito protetor em uma única dose é similar a da amostra B19, e trabalhos de campo, tanto em áreas de alta como de baixa prevalência indicam que a proteção da amostra RB51 (pelo menos um ano após a vacinação) é similar ou mesmo melhor que a obtida pela amostra B19 (CAVALLERO, 1998), e em fêmeas gestantes, a vacina induz respostas humoral e mediada por células (PALMER et al., 1997)..

Por ser a fração antigênica mais imunodominante, a cadeia O é a responsável pela resposta de anticorpos na maioria dos animais expostos às espécies lisas de *Brucella*. Como a maioria dos testes sorológicos é baseada na detecção de anticorpos contra a cadeia O, vacinas elaboradas com amostras lisas, como a B19, são responsáveis pela produção de anticorpos que não podem ser distinguidos dos anticorpos induzidos pela infecção por *B. abortus* selvagem (STEVENS et al., 1995; SCHURIG et al., 2002).

Após a aprovação da utilização da RB51 nos EUA em 1996, esta se tornou em poucos anos a vacina do programa de controle e erradicação norte-americano, pois a situação epidemiológica da brucelose naquele país, que já estava em fase muito avançada de erradicação, indicava a necessidade de uma vacina que não interferisse com os testes de diagnóstico (SCHURIG et al., 2002; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Desde então, vários países como África do Sul, Argentina, Chile, Espanha, México, Uruguai e Venezuela vêm adotando a vacina RB51 em seus programas de controle, isoladamente ou em conjunto com a utilização da B19 para vacinação em fêmeas jovens e adultas. Os resultados da

utilização da RB51 nestes programas de controle têm sido muito eficazes e promissores (LORD et al., 1998; SCHURIG et al., 2002).

No Brasil, o PNCEBT adotou a vacina B19 para a imunização em massa de bovinos contra a brucelose, porém, a Instrução Normativa DAS-MAPA nº13 (28/08/2007), regulamenta o uso da vacina RB51, restringindo sua administração para fêmeas bovinas com idade acima de oito meses de idade que não foram vacinadas com a amostra B19 e para fêmeas adultas vacinadas com a amostra B19, não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose, isto é, em rebanhos infectados. Esta IN proíbe a vacinação de machos, de fêmeas até oito meses e de fêmeas gestantes, bem como de bezerras entre três e oito meses de idade (BRASIL, 2007).

O uso da RB51 é recomendado somente em regiões de baixa prevalência da doença, de preferência, quando o combate da doença já estiver em fase de erradicação; pois em locais onde a brucelose é endêmica e apresentar alta prevalência, a vacina de escolha deve ser a B19(OLSEN; STOFFREGEN, 2005). Entre o período final de 2007 e início de 2008, foram ofertados ao mercado brasileiro os primeiros lotes de duas vacinas comerciais (Vacina RB51-Laboratório Schering Plough e Brucelina 51-Laboratório Vallé) licenciadas junto à Coordenação de Produtos Veterinários (CPV) do MAPA. Até o presente momento as vacinas com as amostras B19 são as recomendadas pelo MAPA para vacinação de rotina em bezerras de três a oito meses, sendo restrito o uso da amostra RB51.

## REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. **Organización Panamericana de la Salud**. 2. ed. Washington, 1986.
- ADAMS, L. G. Development of live *Brucella* vaccines. In: ADAMS, L.G. (Ed.). **Advances in brucellosis research**. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p. 251-276.
- ALTON, G. et al. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INTRA, 1988. 109 p.
- ANSELMO, F. P.; PAVEZ, M. M. **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1977. 735 p.
- ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2010. 360 p.

- ARAYA, L. M. et al. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. **J Immunol**, v. 143, n. 10, p. 3330-3337. 1989.
- BALDWIN, C.; 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, n. 5, p. 407-442. 2006.
- BARREIRA-SALDANÑA, H. A.; SIFUENTES-RINCÓN, A. M.; REVOL-DE MENDOZA, A. Diagnóstico de brucelosis por la reacción en cadena de la polimerasa. **Gaceta Medica de México**, v. 132, p. 300-302. 1996.
- BECKETT, F.W.; MACDIARMID, S.C. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* Strain-19 vaccination in accredited dairy herds. **British Vet J**, v. 141, p. 507-14, 1985.
- BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine Brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Texas: University Press, College Station. v. 2, p. 1053-1066. 1994.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. Brasília, v. 22, n. 1-4. 1988.
- BOSCHIROLI, M. L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. **Curr Opin Microbiol**. v. 4, p. 58-64. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília, 1977, p. 525-605.
- BRASIL. Brucelose bovina. **Boletim da Defesa Sanitária Animal**, Brasília, v. 29, n.1-4, p. 41-47, 1996. 2000.
- BRASIL. Legislação Agrícola Federal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 06 de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, Página 6 de 12 de janeiro de 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília: MAPA/ DAS/ DAS. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT.**

Brasília , 2006. Disponível em:

[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20obrucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20obrucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf) Acesso em: 18 dez 2008.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 33 de 24 de agosto de 2007. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 6-7, p. 28 de novembro de 2008.

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

BRICKER, B. J; HALLING, S. M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 6, p. 1640–1642, 1995.

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

CAMPERO C. M. Brucelosis en toros: una revisión. **Rev Med Vet**, v.74, p.8-14, 1993.

CARDOSO, P. G. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microb Cell Fact**, v.5, p.13, 2006.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycobiology**. 4 ed. Philadelphia: London, 1991. p. 196-201.

CARVALHO, M. S. et al. Brucelose, alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Int**, v. 2, n. 4, p. 259-261, 1995.

CAVALLERO J. C. M. Enfermidades causadoras de aborto: brucelose. In: LEMOS R. A. A. A. (ed). **Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e diagnóstico**. Campo Grande, 1998. 536 f. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

CHATE, S. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 61, n. 1, p. 46-55, 2009.

CHEERS, C.; HO, M. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. **J Reticuloendothel Soc**, v. 34, n. 4, p. 299-309. 1983.

CHEVILLE et al. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutants strains of *Brucella abortus*. **Am J Vet Res**, v.54, n. 10, p. 1591-1597, 1993.

CHEVILLE, N. F. et al. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. **Am J Vet**, v. 57, n. 8, p. 1881-1888, 1996.

CHOSEWOOD, L.C.; WILSON, D. E. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories**. Washington: US Government Printing Office, 409 p. 2007.

CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus *Brucella*. In: KRIEG, N. R.; HOLD, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins. v. 1, p. 377-388, 1984.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. (Ed) **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: WHO Press, 2006. p. 2006. Disponível em:  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf> Acesso em 23 maio 2010.

CORNER, L. A.; ALTON, G. G. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. **Res Vet Sci**, v. 31, n. 3, p. 342-3444, 1981.

CRAWFORD, R. P; HUBER, J. D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p.131-151.

DA COSTA, M. et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **J Appl Bacteriol**, v. 81, n. 3, p. 267-275, 1996.

DETILLEUX, P. G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. **Infect Immun**, v. 58, n. 7, p. 2320-2328, 1990.

EWALT, D. R.; BRICKER, B. J. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 8, p. 3085–3086, 2000.

FOSTER, G. 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, p. 2688–2693, 2007. DOI 10.1099/ijs.0.65269-0.

GARCIA-CARRÍLLO, C. La brucelosis de los animales en América y su relación com la infección humana. 1987. In. PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. A Experiência Brasileira no Combate à Brucelose Bovina. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 105-112, 2002.

GARCIA-YOULDI, D. ET AL. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev1 vaccine strain by multiple-locus variable number tandem repeat analysis. **Vaccine**, v. 25, n. 15, p. 2858-2862, 2007.

GOLDING, B. et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes Infect**, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2001.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 281-297, 2002.

GRILLÓ, M. J.; BOSSERAY, N.; BLASCO, J. M. *In vitro* markers and biological ativity in mice of seed lot strains and commercial vaccines. **Biologicals**, v. 28, n. 2, p. 119-27, 2000.

GUERREIRO, M. G. et al. **Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública**. 1ª Ed., Porto Alegre, ED. SULINA, 1984.

GUIDO, M. C.; GRASSO, L. M. P. Brucelose. São Paulo, 2005. F. USP. Disponível em: [www.mcguido.vet.br/brucelose.htm](http://www.mcguido.vet.br/brucelose.htm) Acesso em: 12 jan 2011.

HALLING, S. M.; ZEHR, E. S. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. **J Bacteriol**, v. 172, n. 12, p. 6637-6640, 1990.

JONES, F. M.; HOOPER, J. A. *Brucella abortus* strain 19 calfhoo vaccination - a review. **The Southwestern Veterinarians**, v.29, p.219-225, 1976.

JONES, L. M.; MONTGOMERY, V.; WILSON, J. B. Characteristics of carbon dioxide-independent cultures of *Brucella abortus* isolated from cattle vaccinated with strain 19. **J Infect Dis**, v. 115, p. 115: 312-20, 1965.

JONES, S. M.; WINTWR, A. J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. **Infect Immun**, v. 60, n. 7, p. 3011-3014, 1992.

LORD, V. R. et al. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. **Am J Vet Res**, v. 59, n. 8, p.1016-1020, 1998.

MACKANESS, G. B. The immunological basis of acquired cellular resistance. **J. Exp Med**, v. 120, p. 105-120, 1964.

MANTUR, B G.; AMARNATH, S. K.; SHINDE, R. S. Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. **Indian J Med Microbiol**, v. 25, n. 3, p. 188-202, 2007.

MEYER, M. J. Metabolic characterization of the Genus *Brucella*. V. Relationship of strain oxidation rate of *i*-erithritol to strain virulencefor guinea-pigs. **J Bacteriol**, v. 92, n. 3, p. 484-488, 1966.

MEYER, M. J. Metabolic characterization of the Genus *Brucella*. VI. Grown stimulation by *i*-erithritol compared with strain virulence for guinea-pigs. **J Bacteriol**, v. 93, n. 3, p.996-1000. 1967.

MICHAUX, S.ET AL. Presence of two independent chromosomes in *Brucella melitensis* 16M genome. **J Bacteriol**, v. 175, n. 3, p. 701-705, 1993.

MIYASHIRO, S. et al. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). **Braz J Microbial**, v. 38, p. 17-22, 2007.

MONREAL, 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. 3261-3271, 2003.

MONTEIRO, L. A. R. C. Prevalência e fatores de risco associados à brucelose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004, p. 89-90. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

MUKHERJEE, F. et al. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccine strains by bacteriological tests, molecular analysis of *ery* loci and virulence in BALB/c mice. **Biologicals**, v. 33, n. 3, p. 153-160, 2005.

MUKHERJEE, R.; DASH, P.K.; RAM, G.C. Immunotherapeutic potential of Ocimum sanctum in bovine subclinical mastitis. **Res Vet Sci**, v. 71, n. 1, p. 37-43, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. A. **Medical Microbiology**, 5th edition, Elsevier Press, New York, NY, 2005

NEWBY, D. T; HADFIELD, T. L.; ROBERTO, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5' 2'-exonuclease and hybridisation probe assay. **Appl Environ Microbiol**, v.69, n. 8, p.4753–4759, 2003.

NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p.5-9, 2002.

NICOLETTI, P. Bovine abortion caused by *Brucella* sp. In: Kirkbride, CA (Ed.). **Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion**. 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 1990, p. 22-26.

NICOLETTI, P. L. Relationship between animal and human disease. In: YOUNG, E.J.; CORBEL, M.J.(Eds). **Brucellosis: clinical and laboratory aspects**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida, 1989, p. 41-51.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Adv Vet Sci Comp Med**, v.24, p.69-98, 1980.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 447-459, 2002.

NIELSEN, K. et al. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. **Prev Vet Med**, v. 2, n. 1-4, p. 197- 204, 1984.

OIE 2009- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03\\_BOVINE\\_BRUCELL.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf) Acesso em: 28 nov.2009.

OLASCOAGA, C. R. C. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, v. 18, p. 107-141, 1976.

OLIVEIRA, S. C.; SOEURT. N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 417-424, 2002.

OLSEN, S. C., SOFFREGEN, W. S. Essential role of vaccines in brucellosis for livestock. **Expert Rev Vaccines**, v. 4, n. 6, p. 915-928, 2005.

OLSEN, S.; TATUM, F. Bovine Brucellosis. **Vet Clin Food Anim**, v. 26, p. 15–27, 2010.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de expertos em brucellosis. Genebra, OMS, 1986, 149 p. (Série de informes técnicos 740).

OUAHRANI, S. et al. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. **J Gen Microbiol**, v. 139, n. 12, p. 3265-73, 1993.

PACHECO, W. A. Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo. São Paulo, 2007. USP. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-14092007-144915/pt-br.php>

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

PAULIN, L. M. Brucelose – artigo de revisão. **Arq Inst Biol**, v. 70, n. 2, p. 239-249, 2003.

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. A. O combate à brucelose bovina: Situação brasileira. 1 ed. Funep, São Paulo, Brasil, 2003, p. 154.

PEARCE, J. H et al. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. II. Erythritol, a constituent of bovine foetal fluids wich stimulates the grow of *B. abortus* in bovine phagocytes. **Br J Exp Pathol**, v. 43, p. 31-37, 1961.

PELLEGRIN, A. O. et al. Brucelose bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares. Comunicado técnico, 58, Corumbá/MS, dez./2006. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT58.pdf>

PERRIER, J. J. Conceitos básicos – Imunidade e vacinas. 2008. Disponível em: [www.santaelena.com.uy/HNoticia\\_325.html](http://www.santaelena.com.uy/HNoticia_325.html) Acesso: 12 nov 2010.

PIZARRO-CERDÁ, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmatic reticulum of non professionall phagocytes. **Infect Immun**, v. 66, n. 12, p. 5711-5724, 1998.

POESTER, F. P. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine**, v. 24, n. 25, p. 5327-5334, 2006.

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

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

PROBERT, W. S. et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 1290-1293, 2004.

REDMAN, D. R.; DEYOE, B. L.; KING, N. B. Resistance of cattle to *Brucella abortus* following vaccination at two and three months of age. **J Am Vet Med Assoc**, v. 150, n. 4, p. 403-407, 1967.

REIS, R. Brucelose: O que é, suas causas e seus problemas. Curitiba: UFMG. 1977.

RIBEIRO, M. G. ET al. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 49, n. 2, p. 137-150, 1997.

RIBEIRO, V. F. Controle e erradicação da brucelose bovina. Lages, 2000. Universidade do Estado de Santa Catarina. Disponível em:

[http://www.cidasc.sc.gov.br/html/artigos/BRUCELOSE...\(%20VICENTE\).pdf](http://www.cidasc.sc.gov.br/html/artigos/BRUCELOSE...(%20VICENTE).pdf)

RICHEY, E. J.; HARRELL, C. D. *Brucella abortus* disease (Brucellosis) in beef cattle. 1997.

Disponível em: [http://www.floridacattleranch.org/ifas\\_brucellosis.pdf](http://www.floridacattleranch.org/ifas_brucellosis.pdf)

ROSENBERGER, C.M.; FINLAY, B.B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. **Nature Reviews**, v. 4, n. 5, p. 385-396, 2003.

RUST, R. Brucellosis [Online]. 2010 Jan 11. Available from: URL:

<http://emedicine.medscape.com/article/1164632-overview>

SAMARTINO, L. E. Brucellosis in Argentina. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 71-80. 2002.

SAMARTINO, L. E; ENRIGHT, F. M. Patogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 95-101, 1993.

SANGARI, F. J. et al. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus* B19 vaccines is unrelated with its attenuated virulence in mice. **Vaccine**, v. 16, n. 17, p. 1640-5, 1998.

SANGARI, F. J.; AGÜERO, J.; GARCIA-LOBO, J. M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. **Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 487-495, 2000.

SANGARI, F. J.; AGÜERO, J.; GARCIA-LOBO, J. M. Improvement of *brucella abortus* B19 vaccine by its preparation in a glicerol based médium. **Vaccine**, v. 14 n. 4, p. 274-6, 1996.

SANGARI, F.; AGÜERO, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity : an update. **Microbiologia**, v. 12, n. 2. p. 207-218, 1996.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella inopinata* sp. Nov., isolated from a breast implant infection. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. 4, p. 801-808, 2010,

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella microti* sp. Nov., isolated from common vole *Microtus arvalis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, p. 375-382, 2008. DOI 10.1099/ij.s.0.65356-0

SCHURIG, G. G. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Vet Microbiol**, v. 28, n. 2, p. 171-188, 1991;

SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Vet Microbiol**, v. 90, n. 1-4, p. 479-496, 2002.

SMITH, L. D.; FICHT, T. A. Pathogenesis of *Brucella*. **Crit Rev Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 209-229, 1990.

SPERRY, J. F.; ROBERTSON, D. C. Erithritol catabolism by *Brucella abortus*, **J. Bacteriol**, v. 121, n. 2, p. 391-7, 1975.

STEVENS, M. G.; OLSEN, S. C.; CHEVILLE, N. F. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 44, n. 3-4, p.223-235, 1995.

TCHERNEVA, E. et al. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. **J Appl Microbiol**, v. 88, n. 1, p. 69-80, 2000.

THOEN, C. O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N. F.; *Brucella*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C. O. (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1993, p.236-247.

TIZARD, I. R. Vacinação e vacinas. **Imunol Veterinária: Uma introdução**. 5 ed. Roca, São Paulo, 1998, p. 273-293.

VEMULAPALLI, R. et al. Identification of an IS711 Element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 6, n. 5, p. 760-764, 1999.

VERGER, J.-M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **Int J Syst Bacteriol**, v.35, p. 292-295, 1985.

VIZCAÍNO, N. et al. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. **Microbes Infect**, v. 2, n. 9, p. 1089-1100, 2000.

WALKER, R. L. *Brucella*. In: HIRSH, D. C.; EE, Y. C. (Ed.), **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003.

WERLING, D.; JUNGI, W. TOLL-like receptors linking innate and adaptative immune response. **Vet Immunol and Immunopathol**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2003.

WHO - World Health Organization Joint FAO/WHO. Expert Committee on Brucellosis. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of a WHO Meeting, Geneva, 1997.

WINTER, A. J. et al. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. **Infect Immun**, v.57, n. 11, p. 3438-3444, 1989.

YAZDI HS, K. M. et al. Abortions in pregnant dairy cows after vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. **Vet Rec**, v.165, n. 19, p. 570-571, 2009.

***ARTIGO CIENTÍFICO***

## Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil<sup>1</sup>

Renata Bastos<sup>2</sup>, Cleber O. Soares<sup>3</sup>, Carina Elisei<sup>3</sup>, Anna L. R. Munhoz<sup>2</sup>, Nádia L. Bezerra<sup>2</sup>, Marrielen A. B. Caitano<sup>2</sup>, Grácia M. S. Rosinha<sup>3,\*</sup>

**ABSTRACT.-** Bastos R., Soares C.O., Elisei C., Munhoz A.L.R., Bezerra N.L., Caitano M.A.B. & Rosinha, G.M.S. 2011 [**Genetic evaluation of vaccine against bovine brucellosis marketed in Brazil.**] Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx(x):xx-xx. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) Campo Grande, MS, Brazil. \*E-mail: [rosinha@cnpqc.embrapa.br](mailto:rosinha@cnpqc.embrapa.br)

The prevention against infections caused by *Brucella abortus* in cattle is through the administration of the vaccine strains B19 and RB51. There are reports that these vaccines can cause abortions in vaccinated females. This being, abortions in vaccinated animals deserve a thorough study on this question. In Brazil, there is no record about the origin of the samples B19 and RB51 used in the preparation of commercial vaccines, so a study towards the verification of possible mutations in relation to the USDA reference sample of *B. abortus* is needed because they could revert to virulence. The objective of this study is to genotypically characterize vaccine strains B19 and RB51 used in Brazil. The methodology was based on genotyping of marker genes for virulence of these vaccine strains by amplification and persistence of vaccine strains in mice. The results allowed the identification of the genotype of all commercial B19 and RB51 vaccines used for immunization of cattle in Brazil.

INDEX TERMS: *Brucella abortus*, vaccine, B19, RB51, genotyping

**RESUMO.-** A prevenção contra infecções causadas por *Brucella abortus* em bovinos é realizada por meio da administração das amostras vacinais B19 e RB51. Existem relatos de que estas vacinas podem causar aborto às fêmeas vacinadas. Portanto, toda a ocorrência de aborto em animais vacinados merece um estudo aprofundado sobre a causa. No Brasil, não há registro sobre a origem das amostras B19 e RB51 utilizadas na produção das vacinas comerciais. Portanto, um estudo para verificar possíveis mutações em relação às amostras referência USDA B19 e USDA RB51 de *B. abortus* se faz necessário, devido as amostras vacinais poderem reverter a sua virulência. Objetivou-se com este estudo caracterizar genotipicamente as amostras vacinais B19 e RB51 comercializadas no Brasil. A metodologia utilizada foi a genotipagem de genes marcadores destas amostras vacinais, por meio da amplificação pela reação em cadeia da polimerase. Os resultados obtidos permitiram a identificação do genótipo de todas as vacinas comerciais B19 e RB51 utilizadas para a imunização de bovinos no Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Brucella abortus* – vacina - B19 - RB51 - genotipagem

### INTRODUÇÃO

O controle de doenças infecciosas de animais no Brasil requer melhorias para atingir os padrões internacionais e aumentar a produção animal. Algumas dessas doenças, além de colocar em risco a saúde do rebanho, podem representar um problema de saúde pública, como é o caso da brucelose, causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella*.

Uma das principais zoonoses mundiais, a brucelose, pode acometer tanto os animais silvestres quanto os animais domésticos de valores elevados. O gênero *Brucella* contém diversas espécies que são definidas principalmente com base na especificidade ao hospedeiro, sendo que a maioria pode infectar seres humanos e a patologia difere de acordo com a gravidade da infecção (Nicoletti 1989, Boschioli et al. 2001, Walker 2003).

*Brucella abortus* é o agente etiológico da brucelose bovina causador de uma das doenças infecciosas que causam enormes perdas econômicas à cadeia da bovinocultura de corte e leite, devido aos prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos ocasionados nos animais (Poester et al.

<sup>1</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

Normas da revista "Pesquisa Veterinária Brasileira"

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação, mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Felino Muller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS, CEP 79070-900, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Corte, BR262 km 4 – Caixa Postal 154, Campo Grande, MS, CEP 79002-970, Brasil.

\* Autor para correspondência: [rosinha@cnpqc.embrapa.br](mailto:rosinha@cnpqc.embrapa.br)

2002, Monreal et al. 2003). Esta zoonose é responsável por problemas sanitários e econômicos, particularmente nos trópicos e em países com pouco investimento nas áreas de produção de leite e carne, onde a sua incidência é alta (Poester et al. 2002).

Desde a identificação do agente etiológico da brucelose, vários pesquisadores têm procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e não apresentem anticorpos que interfiram no diagnóstico da doença (Brasil 2006). Em decorrência desses estudos, vem sendo desenvolvido um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de subunidades, recombinantes e de DNA, com o intuito de produzir uma vacina que além de prevenir a infecção bacteriana em ambos os sexos, não provoque a doença nos animais vacinados, previna o aborto, promova um longo período de proteção com uma única dose, não interfira nos testes de diagnóstico, seja biologicamente estável e não apresente risco de reverter a virulência, não seja prejudicial aos humanos, não deixe resíduos no leite, e principalmente, que quando produzida em alta escala tenha um baixo custo (Oliveira 2011).

As espécies de *Brucella* apresentam características peculiares de resistência ao hospedeiro, induzindo infecções crônicas e persistentes, sobrevivendo e se multiplicando dentro de células fagocíticas (OLIVEIRA et al., 2002, SEXTON ; VOGEL, 2002). Essas habilidades são determinadas pelos fatores de virulência associados a essa bactéria. O sistema de secreção do tipo IV é um dos cinco principais sistemas que são capazes de exportar moléculas relacionadas à virulência através da membrana de bactérias gram-negativas. *Brucella* spp. possui um sistema de secreção do tipo IV codificado por um operon *virB*, o qual é essencial para a sobrevivência e multiplicação dentro das células hospedeiras (O'Collaghan et al. 1999).

A região *virB* no genoma de *B. abortus* e *B. suis* é constituída por 12 janelas abertas de leitura (ORF, do inglês, *Open Reading Frame*) estruturadas em um *operon*, que é uma unidade genética de expressão coordenada (Boschioli et al. 2002), sendo a proteína VirB5 é um componente essencial para na maioria dos sistemas de secreção tipo IV (Yeo et al. 2003).

Muitas das vacinas testadas até o momento mostraram-se pouco protetoras, como as vacinas de amostras mortas, ou ainda estão em fase de testes, como as vacinas de subunidades, recombinantes e de DNA. As vacinas atenuadas são aquelas que são utilizadas nos programas de controle da brucelose, sendo duas delas recomendadas e empregadas atualmente pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a saber: a B19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, a RB51. Ambas são boas indutoras de imunidade celular (Brasil 2006).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) adotou no ano de 2001 a vacina B19 contra a brucelose para a imunização em massa de fêmeas entre três e oito meses de idade. No ano de 2007 foi aprovada a Instrução Normativa (IN) DAS-MAPA nº13 (28/08/2007) que regulamentou o uso da vacina RB51 restringindo sua administração para fêmeas que não foram vacinadas com a amostra B19 e para fêmeas adultas não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose (Brasil 2007).

Dentre as vacinas vivas, a amostra vacinal B19 é a mais utilizada nos programas de controle em vários países (Lage et al. 2009). Esta é uma amostra lisa, pois expressa a cadeia O em seu lipopolissacarídeo (LPS), induzindo uma resposta sorológica e apresentando um resultado falso positivo em testes de vigilância, devido a estes não distinguir animais vacinados de animais infectados a campo (Cheville et al. 1993, Olsen & Tatum 2010).

A identificação molecular da amostra vacinal B19 está baseada em um gene ligado ao catabolismo do eritritol (*ery*) e este tem sido descrito na literatura como um importante marcador na diferenciação de B19 das amostras de campo (Ewalt & Bricker 2000). As espécies pertencentes ao gênero *Brucella* utilizam preferencialmente a via metabólica do eritritol (álcool polihídrico), promovendo o crescimento das amostras em meios ricos na presença deste álcool. A amostra vacinal atenuada B19 sofreu uma deleção natural de 702 pares de bases (pb) no gene *ery*, ocorrendo a inibição do crescimento dessa amostra na presença desse álcool (Sangari et al. 2000; Miyashiro et al. 2007). Entretanto, foi observado que amostras da vacina B19 comercializadas na Índia, não possuem essa deleção, porém apresentaram redução da virulência em camundongos BALB/c (Mukherjee et al. 2005). Esse dado mostra a importância da genotipagem do gene *ery* em amostras comercializadas, inclusive naquelas utilizadas no Brasil.

A amostra vacinal rugosa RB51 não possui o antígeno-O no LPS, desta forma as amostras rugosas não interferem no diagnóstico sorológico da brucelose por não possuírem este componente responsável pela indução de anticorpos. Esta amostra foi derivada da amostra lisa e virulenta S2308 de *B. abortus*, obtida por passagens em meios de cultura contendo doses sub-inibitórias de rifampicina e penicilina (Schurig et al. 1991, Poester et al. 2002, Samartino 2003).

A vacina RB51 de *B. abortus* é administrada em vários países e vem sendo utilizada como alternativa para a amostra vacinal B19 na prevenção da brucelose. Os animais vacinados com RB51 mostraram maior resistência à infecção e uma diminuição da incidência de aborto (Schurig et al. 1991, Cheville et al. 1996). Entretanto, um relato de caso realizado no Irã mostrou a ocorrência de aborto após a vacinação com RB51 e a presença desta amostra no feto abortado (Yazdi et al. 2009).

A vacina RB51 quando utilizada em dose única produz um efeito protetor em bovinos similar à vacina B19, com a vantagem de ser menos patogênica para os seres humanos e de ser diferenciada de isolados de campo. Porém, esta amostra tem a desvantagem de ser resistente à rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (WHO, 1997).

A amostra vacinal RB51 apresenta no gene *wboA*, envolvido na síntese da cadeia O, um elemento de inserção denominado IS711, que é um fragmento de 842 pb delimitado por repetições *in tandem* de 20 pb, que interrompe a síntese da cadeia O quando inserido no gene *wboA* (Vemulapalli et al. 1999). Este elemento está presente em cinco ou mais cópias no genoma de *Brucella* spp., mostrando ser completamente estável em número e posição no cromossomo (Halling & Zehr 1990, Bricker & Halling 1994, Bricker & Halling 1995). Entretanto, diferenças no número de elementos foram relatadas, como o biovar 1 de *B. abortus* que possui sete cópias (Ouahrani et al. 1993, Bricker & Halling 1995, Ocampo-Sosa & García-Lobo 2008). Estes elementos, por serem segmentos discretos de DNA ligados ao polimorfismo da bactéria, são usados na diferenciação entre amostras de RB51 das demais variações de biovars e espécies de *Brucella* (Ouahrani et al. 1993, Bricker & Halling 1994).

De acordo com o pressuposto, o objetivo neste estudo foi analisar todas as amostras vacinais B19 e RB51 comercializadas no Brasil, a fim de verificar possíveis mutações genéticas em relação às amostras referências.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Obtenção de amostras vacinais e não vacinais** - Foi realizada uma pesquisa junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a obtenção de todas as amostras vacinais B19 e RB51 liberadas para comercialização no Brasil. As amostras de referência USDA B19 (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA), e USDA RB51 foram gentilmente cedidas pelo LANAGRO-MG (MAPA) e a amostra virulenta S2308 foi adquirida de coleção biológica certificada.

As amostras vacinais foram adquiridas em estabelecimentos comerciais autorizados para venda destes produtos e junto ao MAPA. Estas vacinas foram produzidas por empresas brasileiras no período de 2007 a 2009. Um frasco de cada vacina RB51 foi adquirido e denominados A e B, e quatro amostras vacinais de B19 foram adquiridas e denominadas C, D, E e F. As amostras vacinais B19 denominadas G, H, I, J, L e M foram gentilmente cedidas pelo LANAGRO-MG. Todas as vacinas comerciais utilizadas neste estudo foram aprovadas no controle biológico, conforme determinado pelo MAPA. As amostras vacinais foram reidratadas em água destilada estéril, de acordo com as instruções dos fabricantes.

Uma vez reconstituídas, todas as amostras foram cultivadas em meio *Trypic Soy Agar* (TSA) e colônias isoladas foram cultivadas em meio *Trypic Soy Broth* (TSB), estocadas em glicerol 20% e armazenadas a -70 °C para utilização em ensaios subsequentes.

**Meios e condições de cultivo** - Para cada ensaio as amostras vacinais e as amostras de referência foram descongeladas e cultivadas em meio TSA por 72 horas a 37 °C. Posteriormente uma colônia isolada de cada amostra foi crescida em 10 mL de meio TSB a 37 °C sob agitação constante por 72 horas.

**Extração do DNA genômico das amostras** - Para a extração do DNA genômico, as culturas em meio TSB foram centrifugadas por 30 minutos a 3000 xg. O sobrenadante foi descartado e posteriormente foi adicionado ao sedimento 30mL de PBS 1X, pH 7,2, centrifugou-se novamente e em seguida foram adicionados ao sedimento 8mL de SDS (Dodecil Sufato de Sódio) 20% e a amostra foi homogeneizada por vórtex e incubada a 65 °C por 1 hora. Foram adicionados 16 mL de clorofórmio seguido de agitação vigorosa, adicionados 4 mL da solução de precipitação protéica (3M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, 2M CH<sub>3</sub>COOH) e homogeneizado novamente. A amostra foi centrifugada a 3000 xg/30 min. O sobrenadante foi coletado e tratado com 30 mL de etanol P. A. gelado e homogeneizado por inversão até formar um precipitado e em seguida o material foi armazenado à -20 °C por 16 horas. Na etapa seguinte o material foi centrifugado à 3000 xg/15 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento formado foram adicionados 15 mL de etanol 80%. Logo após, a amostra foi centrifugada a 3000 xg/5 min e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco a temperatura ambiente e ressuscitado em 600 µL de água ultra pura e incubado à 65 °C por 5 minutos. Adicionou-se 8µL de solução de RNase (20ng/µL) e incubou-se à 37 °C por 30 minutos. Posteriormente o DNA foi estocado a -20 °C. A concentração e o grau de pureza dos DNAs extraídos foram avaliados em espectrofotômetro (Gene Quant®, Amersham Pharmacia, EUA), sob absorvância de 260 nm e 280 nm. Em seguida todas as amostras de DNA foram concentradas à 100 ng/µL e a qualidade das amostras foi observada em gel de agarose 1%, corado com *Sybr Gold*® (Invitrogen) foi visualizado em transiluminador ultravioleta.

**Escolha dos genes** - A escolha dos genes foi baseada em dados da literatura balizada em estudos para a identificação e caracterização de espécies e biovars de *Brucella*. O par de oligonucleotídeos VIRB5 foi desenhado para confirmação do gênero *Brucella*. A inserção do elemento IS711 foi utilizada para genotipagem das amostras vacinais RB51 (Vemulapalli et al. 1999) e o gene *ery*, essencial para o

catabolismo do eritritol, foi utilizado para a avaliação dos genótipos das amostras vacinais B19 (Miyashiro et al. 2007). Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão listados na tabela 1.

**Amplificação dos genes pela PCR** - As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 µl. Cada reação contendo 100 ng de DNA, 0,03 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 pMol oligonucleotídeos, 0,3 mM dNTP's e 1,5 U de taq DNA polimerase.

A reação foi realizada utilizando-se os DNAs extraídos das amostras vacinais B19 e RB51, das amostras de referência USDA B19 e USDA RB51, e da amostra selvagem S2308 com o par de oligonucleotídeos VIRB5F e VIRB5R específicos do gênero *Brucella*. Para a diferenciação da amostra vacinal B19 a reação foi realizada utilizando os oligonucleotídeos ERY1 e ERY2, relacionados com a deleção dos 702 pb referentes ao gene *ery* (Sangari & Aguero 2000). O ciclo de temperaturas empregado foi de desnaturação a 94 °C por 10 minutos e, ao final, extensão de 72 °C por 10 minutos. Na primeira reação foram empregados 35 ciclos divididos em três fases: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 68 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 2 minutos.

Também foram utilizados os oligonucleotídeos IS711AF, IS711BF e IS711CR relacionados com a inserção do elemento IS711 no gene *wboA* (Vemulapalli et al. 1999).

O ciclo de temperaturas empregado procedeu-se de desnaturação 95 °C por 1 minuto e, ao final, extensão de 72 °C por 10 minutos. Na reação foram empregados 40 ciclos divididos em três fases: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 60,5 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Duas diferentes amplificações de PCR foram realizadas com combinações de oligonucleotídeos IS711AF e IS711CR e oligonucleotídeos IS711BF e IS711CR.

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *Sybr Gold* (Invitrogen) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

## RESULTADOS

Todas as amostras testadas utilizando os oligonucleotídeos VIRBB5 amplificaram um fragmento esperado de 513 pb (figura 1), confirmando que todas as amostras são do gênero *Brucella*.

A característica da deleção de 702 pb referente ao gene *ery* foi encontrada em todas as amostras vacinais B19 e na amostra de referência USDA B19, onde foi possível observar fragmentos de 361 pb amplificados pelos oligonucleotídeos ERY1 e ERY2, diferente da amostra selvagem S2308 que apresentou um fragmento de 1063 pb, que corresponde ao gene *ery* intacto. Os resultados da deleção do gene *ery* utilizados para a análise das amostras vacinais B19 são mostrados na figura 2 e resumidos na tabela 2.

Na reação de PCR realizada com os oligonucleotídeos IS711AF e IS711BF foi possível verificar a inserção do elemento IS711 no gene *wboA*, observado um fragmento de 1300 pb nas amostras vacinais RB51 e na amostra de referência USDA RB51, diferenciando-as da amostra selvagem S2308 que apresentou um fragmento de 400 pb, referente somente a uma região do gene *wboA* (figura 3). Quando os oligonucleotídeos IS711BF e IS711CR foram utilizados para amplificação do elemento IS711, as amostras vacinais RB51, as amostras de referência USDA RB51 e a amostra selvagem S2308 apresentaram um fragmento de aproximadamente 900 pb (Figura 4) referente ao elemento de inserção IS711, pois a presença de um fragmento amplificado na amostra selvagem S2308 esta relacionado à presença deste fragmento em outras regiões do genoma de *Brucella*.

## DISCUSSÃO

O uso de lotes de boa qualidade das amostras vacinais B19 e RB51 é um pré-requisito fundamental para o sucesso das campanhas de vacinação contra a brucelose, pois algumas características *in vitro*, tais como alterações da fase colonial, têm demonstrado ser um elemento importante que afeta a atividade biológica das vacinas (Bossery 1991). Assim, deve-se ter o maior cuidado com a qualidade das vacinas comercializadas. Segundo Milward (1995), uma vacina não é apenas uma linhagem cultivada e testada em animais desafiados, e sim um produto que quando colocado nas mãos do usuário final, tem que ser confiável e fornecer os resultados esperados.

No presente estudo todas as amostras vacinais e controles amplificaram uma região conservada do gene *virB 5*, que está inserido no operon *virB*, presente em todas as espécies de *Brucella*. O operon *virB* é formado por 12 genes (*virB1- virB12*) que codificam proteínas internas e externas de membrana, sendo este um dos principais determinantes de virulência e sobrevivência das bactérias em meio intracelular (Sieira et al. 2000, Rouot et al. 2003).

A sensibilidade ao eritritol é considerada uma característica importante da amostra B19 de *B. abortus*, devido à deleção de 702 pb no gene *ery*. Todas as amostras B19 comercializadas no Brasil e testadas neste estudo mostraram-se com o padrão de deleção no gene *ery*, corroborando com os resultados descritos por Miyashiro e colaboradores (2007), os quais mantiveram o mesmo perfil de fragmento quando diferenciaram as amostras de campo das amostras vacinais B19. Porém, estudos feitos

na Índia constataram que as amostras vacinais HR 19 e IVRI, obtidas de Coleções de Culturas do Tipo Americanas (ATCC # 27565), utilizadas para a fabricação das amostras comercializadas neste país, não apresentaram a deleção do gene *ery*. E que algumas amostras que possuem a deleção de 702 pb no gene *ery*, apresentaram crescimento na presença de eritritol, ainda que baixo (Mukherjee et al. 2005).

O fenótipo rugoso da amostra vacinal RB51 está relacionado com a inserção do elemento IS711 no gene *wboA*, tornando-a menos patogênica (Vemulapalli et al. 1999). As duas amostras vacinais RB51 liberadas para comercialização no Brasil e testadas, apresentaram a característica de inserção do elemento IS711 no gene *wboA*. Apesar da amostra RB51 ser menos patogênica, estudos realizados no Irã relataram casos de aborto em fêmeas vacinadas com esta amostra (Yazdi et al. 2009).

A avaliação da estabilidade genética é um dos elementos essenciais para garantir a qualidade biológica de vacinas vivas contra a brucelose bovina. A genotipagem utilizando a combinação de 15 marcadores genéticos para análise de múltiplos lócus em *tandem* (MLVA), mostrou-se eficiente na identificação da variabilidade genética da amostra vacinal Rev1 de *B. melitensis* (Garcia-Youldi et al. 2007) e da amostra vacinal B19 de *B. abortus* (Miranda 2009).

Os resultados do presente estudo demonstraram que todas as amostras vacinais B19 comercializadas no Brasil apresentam as características da amostra padrão USDA B19, ou seja, a deleção de 702 pb no gene *ery*. As duas amostras vacinais RB51 comercializadas no Brasil apresentam a inserção do fragmento IS711 no gene *wboA*, igualmente à amostra padrão USDA RB51.

## REFERÊNCIAS

- Baldwin C.L. 2002. Immune response overview. *Vet Microbiol* 90: 365-366.
- Boschiroli M.L., Foulongne V. & O'Callaghan D. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4:58-64.
- Bosseray N. 1991. *Brucella melitensis* Rev1 attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals* 19:355e63.
- Bosseray N. & Plommet M. 1976. Transformation normalisant la distribution du nombre de *Brucella* dans la rate de souris inoculées par voie intrapéritonéale. *J Biol Stand.*4:341-351.
- Brasil 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Brasília. [cited 2008 dez 18]. Available from: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf)
- Brasil. 2007. Instrução Normativa Nº 33 de 24 de Agosto de 2007. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina viva não indutora de formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51 (PNCEBT), [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF]. *Diário Oficial da União, Brasília, DF.* 1: 6.
- Bricker B.J. & Halling S.M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 2660-2666.
- Bricker B.J. & Halling S.M. 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 33:1640-1642.
- Cheville N.F., Olsen S.C., Jensen A.E., Stevens M.G. & Palmer M.V. 1996. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res* 57:1153-1156.
- Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen A.E., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutants strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 54:1591-1597.
- Ewalt D.R. & Bricker B.J. 2000. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol* 38:3085-3086.

- García-Youldi D., LeFleche P., Marín C.M., De Miguel M.J., Muñoz P.M., Vergnaud G. & López-Goñi I. 2007. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev1 vaccine strain by multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *Vaccine* 25: 2858-2862.
- Grilló M.J., Bosseray N. & Blasco J.M. 2000. In vitro markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial vaccines. *Biologicals* 28:119-27.
- Halling S.M. & ZEHR E.S. 1990. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. *J Bacterio.* 172:6637-6640.
- Yeo H-J., Yuan Q., Beck M.R., Baron C. & Waksman G. 2003. Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *PNAS* 100: 15947-15952.
- Lage A.P., Poester F.P., Paixão T.A., Silva T.M.A., Xavier M.N., Minharro S., Lage A.P., Poester F.P., Paixão T.A., Silva T.M.A., Xavier M.N., Minharro S., Miranda K.L., Alves C.M., Mol J.P.S. & Santos L.R. 2009. Brucelose bovina: uma atualização. *Rev Bras Reprod Anim* 32:202-212.
- Milward F.W. 1995. Production and quality control of vaccines for brucellosis and a specific emphasis on Rev.1 vaccine. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev.1 vaccine in small ruminants and cattle CNEVA Alfort, France.
- Miranda K.L. 2009. Evaluation of brucellosis vaccines in Brazil, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 77 pp. Available from: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/BUOS-8FXLKT/1/c\\_pia\\_de\\_tese\\_de\\_doutorado\\_de\\_karina\\_leite\\_miranda.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/BUOS-8FXLKT/1/c_pia_de_tese_de_doutorado_de_karina_leite_miranda.pdf)
- Miyashiro S., Scarcelli E., Piatti R.M., Campos F.R., Vialta A., Keid L.B., Dias R.A. & Genovez M.E. 2007. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Braz j microbiol* 38: 17-22.
- Monreal D., Grilló M.J., González D., Marín C.M., De Miguel M.J., López-Goñi I., Blasco J.M., Cloeckert A. & Moriyón I. 2003. 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* 71:3261-3271.
- Mukherjee F., Jain J., Grilló M.J., Blasco J.M. & Nair M. 2005. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccine strains by bacteriological tests, molecular analysis of ery loci and virulence in BALB/c mice. *Biologicals* 33:153-160.
- Nicoletti P.L. 1989. Relationship between animal and human disease. In: YOUNG, EJ, CORBEL MJ (Eds). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida. p. 41-51.
- O'Callaghan D., Cazevielle C., Allardet-Servent A., Boschiroli M.L., Bourg G., Foulongne V., Frutos P., Kulakov Y. & Ramuz M. 1999. 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* 33:1210-1220.
- Ocampo-Sosa A.A. & García-Lobo J.M. 2008. Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol.* 8(17) doi:10.1186/1471-2180-8-17.
- Oliveira S.C., Soeurt N. & Splitter G. 2002. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 90: 417-424.
- Olsen S. & Tatum F. 2010. Bovine Brucellosis. *Vet Clin Food Anim* 26: 15-27.
- Ouahrani S., Michaux S., Sri Widada J., Bourg G., Tournebize R., Ramuz R. & Liutard J.P. 1993. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol* 139:3265-3273.

- Poester F.P., Gonçalves V.S. & Lage A.P. 2002. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol* 90:55-62.
- Pouillot R., Grilló M.J., Alabart J.L., Garin-Bastuj B. & Blasco J.M. 2003. Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strains 19 (S19) and *Brucella melitensis* strains Rev 1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications. *Rev Sci Tech* 22:1051-1063.
- Rouot B., Alvarez-Martinez M.T., Marius C., Menanteau P., Guilloteau L., Boigegrain R.A., Zumbihl R., O'Callaghan D., Domke N. & Baron C. 2003. Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect Immun* 71:1075-1082.
- Samartino L.E. 2003. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 90:71-80.
- Sangari F.J., Agüero J. & Garcia-Lobo J.M. 2000. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology* 146:487-495.
- Schurig G.G., Roop R.M., Bagchi T., Boyle S., Buhrman D. & Sriranganathan N. 1991. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28:171-188.
- Schurig G.G., Sriranganathan N. & Corbel M.J. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90:479-496.
- Sexton J. & Vogel J.P. 2002. Type IVB-secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 3: 178-185.
- Sieira R., Comerci D.J., Sánchez D.O. & Ugalde R.A. 2000. A homologue of a operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* 182: 4849-4855.
- Vemulapalli R., Mcquiston J.R., Schurig G.G., Sriranganathan N., Halling S.M. & Boyle S.M. 1999. Identification of an IS711 Element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:760-764.
- Walker R.L. 2003. *Brucella*. In: Hirsh DC, Zee YC. (Ed.), *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 446 pp.
- WHO 1997. World Health Organization Joint FAO/WHO. Expert Committee on Brucellosis. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of a WHO Meeting, Geneva.
- Yazdi H.S., Kafi M., Haghkhah M., Tamadon A., Behroozikhah A.M. & Ghane M. 2009. Abortions in pregnant dairy cows after vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet Rec* 165:570-571.

### Legenda das Figuras

- Fig.1. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da PCR do gene *virB5*. Resultado da PCR usando os oligonucleotídeos VIRB5F e VIRB5R; (PB) Padrão de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®; (1-2) Amostra vacinal RB51 (A e B); (3-12) Amostra vacinal B19 (C a M); (13-14) Amostra de referência USDA B19; (15-16) Amostras de referência USDA RB51; (17) Amostra selvagem S2308; (18) Controle negativo.
- Fig.2. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da PCR do gene *ery*. Resultado da PCR usando os oligonucleotídeos ERY1 e ERY2; (PB) Padrão de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®; (1-10) Amostra vacinal B19 (C a M); (11-12) Amostra de referência USDA B19; (13) Amostra selvagem S2308; (14) Controle negativo.
- Fig.3. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da PCR do gene *IS711*. Resultado da PCR usando os oligonucleotídeos IS711AF e IS711CR; (PB) Padrão de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder,

Invitrogen®; (1-2) Amostra vacinal RB51(A e B); (3-4) Amostra de referência USDA RB51; (5) Amostra selvagem S2308; (6) Controle negativo.

Fig.4. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da PCR do gene *IS711*. Resultado da PCR usando os oligonucleotídeos IS711BF e IS711CR; (PB) Padrão de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®; (1-2) Amostra vacinal RB51(A e B); (3-4) Amostra de referência USDA RB51; (5) Amostra selvagem S2308; (6) Controle negativo.

## Os Quadros

**Quadro 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para identificação e verificação de possíveis mutações nas vacinas comercializadas**

Oligonucleotídeos	Sequência	Localização no genoma de <i>B. abortus</i> acesso N° CP000888.1	Autor
VIRB5F	5`TCTACGAAGCGGTGATGAGCG3`	62475/62455	Este estudo
VIRB5R	5`GGTGTAGATGATGTGTTGCGTG3`	61987/62008	Este estudo
ERY1	5'TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT3'	365046/365027	Miyashiro et al., 2004
ERY2	5'CCCAGAAGCGAGACGAAACG3'	363981/364000	Miyashiro et al., 2004
IS711AF	5`TTAAGCGCTGATGCCATTTCCCTCAC3`	1039051/1039076	Vemulapalli et al., 1999
IS711BF	5`TTTAGTTTGCCGTAATATAGGTCTAGAACCTGTC3`	966191/966166	Vemulapalli et al., 1999
IS711CR	5`GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA3`	966117/966140	Vemulapalli et al., 1999

**Quadro 2. Resultados das ampliações pela reação de PCR para diferenciação das amostras selvagem S2308, vacinais B19 e RB51 e de referência USDA B19 e USDA RB51**

Amostra	Origem	Oligonucleotídeos			
		virB5F/virB5R	Ery1/Ery2	IS711AF/IS711R	IS711BF/IS711CR
Amostra A	Vacinal RB51	513 pb		1300 pb	900 pb
Amostra B	Vacinal RB51	513 pb		1300 pb	900 pb
Amostra C	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra D	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra E	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra F	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra G	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra H	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra I	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra J	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra L	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
Amostra M	Vacinal B19	513 pb	361 pb		
USDA B19	Referência B19	513 pb	361 pb		
USDA RB51	Referência RB51	513 pb		1300 pb	900 pb
S2308	Selvagem S2308	513 pb	1063 pb	400 pb	900 pb

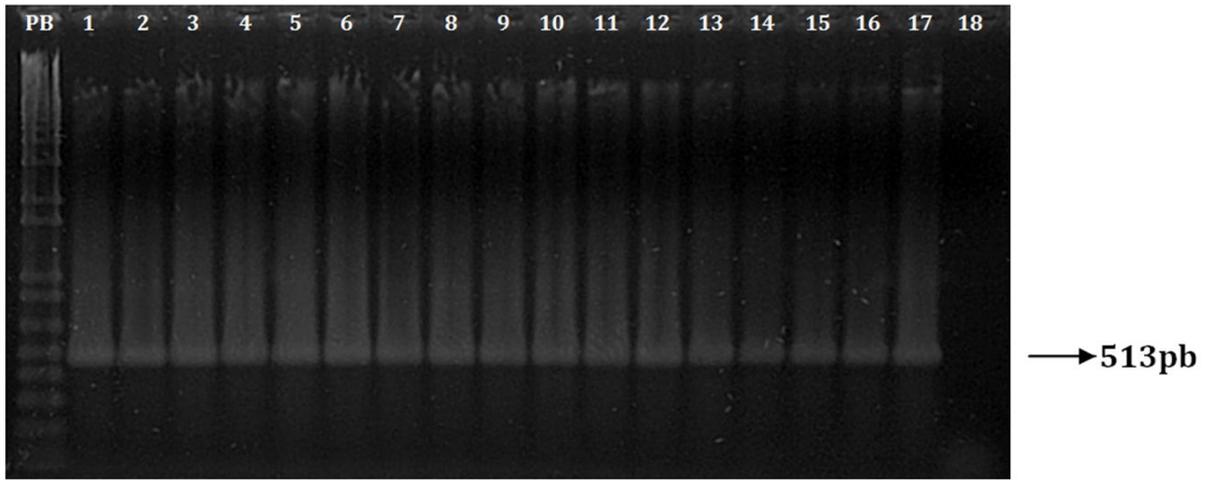


Figura 1

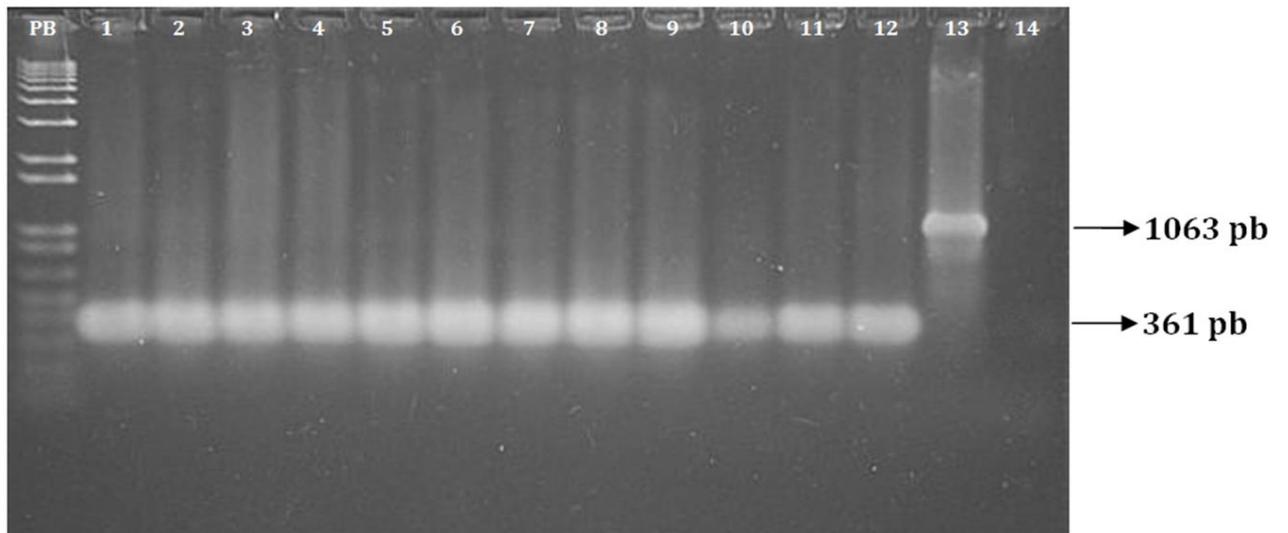


Figura 2

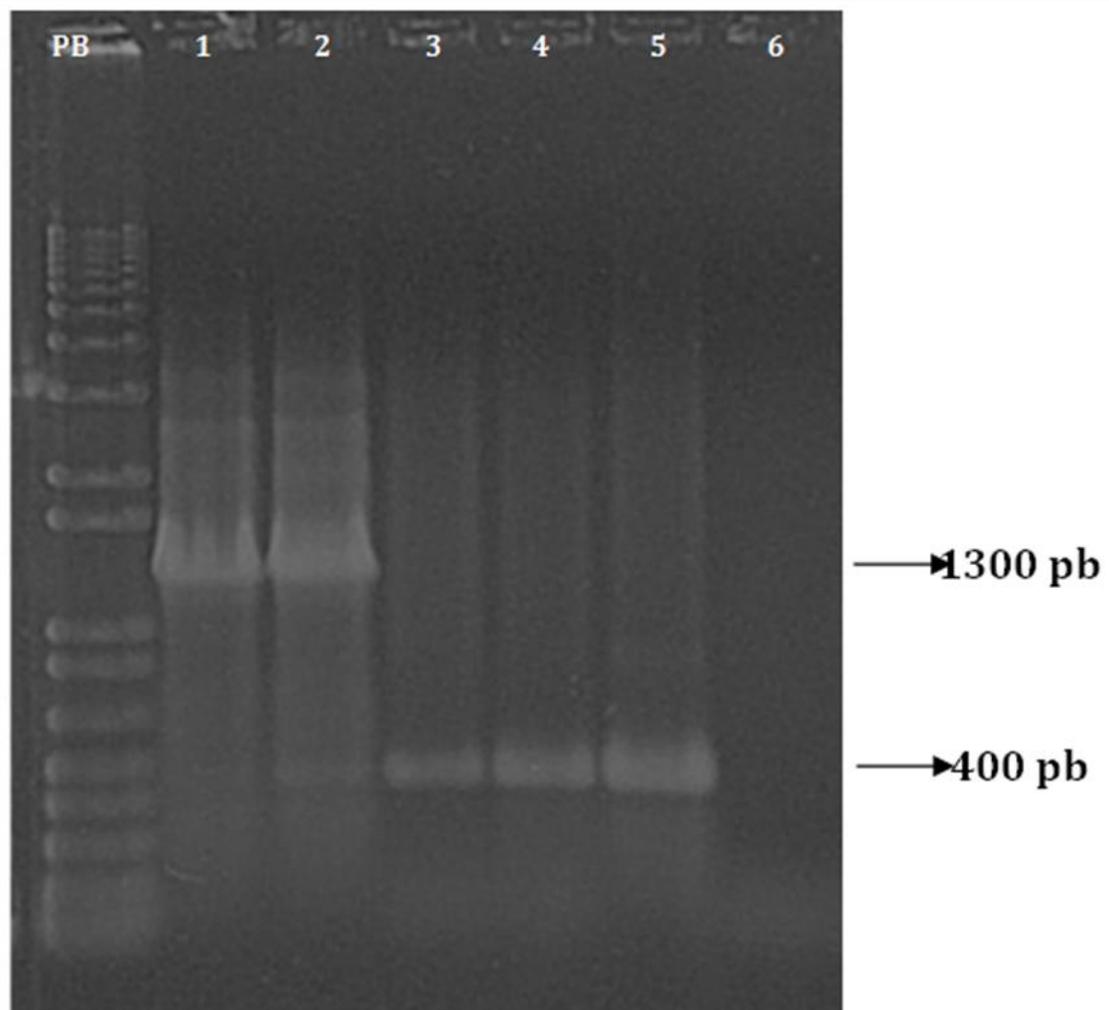


Figura 3

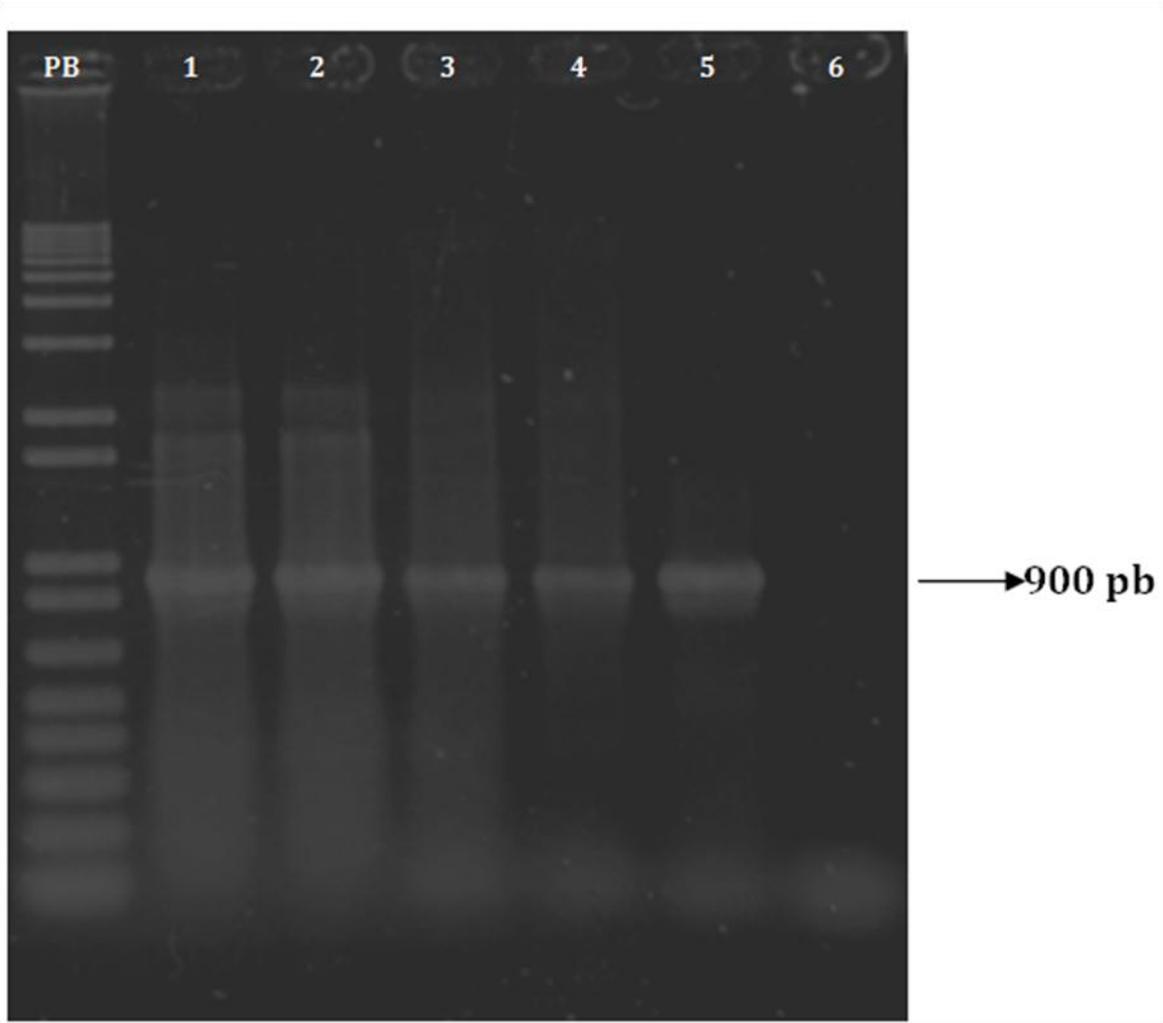


Figura 4