



LORENA BATALHA DE SOUZA

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA PELAS VACINAS
DE *BRUCELLA ABORTUS* B19 E RB51 EM BEZERRAS:
EFEITOS DA IDADE A VACINAÇÃO**

LAVRAS – MG

2020

LORENA BATALHA DE SOUZA

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA PELAS VACINAS DE *BRUCELLA*
ABORTUS B19 E RB51 EM BEZERRAS: EFEITOS DA IDADE A VACINAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em epidemiologia e doenças infecciosas para a obtenção do título de Mestre.

Profª Drª Elaine Maria Seles Dorneles
Orientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Lorena Batalha de.

Resposta imunológica induzida pelas vacinas de *Brucella abortus* B19 e RB51 em bezerras:efeitos da idade a vacinaçãosta
imunológica induzida pelas vacinas de *Brucella abortus* B19 e
RB51 em bezerras:efeitos da idade a vacinação / Lorena Batalha de
Souza. - 2020.

39 p.

Orientador(a): Elaine Maria Seles Dorneles.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Brucelose bovina. 2. Resposta imunológica. 3. Citocinas. I.
Dorneles, Elaine Maria Seles. II. Título.

LORENA BATALHA DE SOUZA

RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA PELAS VACINAS DE *BRUCELLA ABORTUS* B19 E RB51 EM BEZERRAS: EFEITOS DA IDADE A VACINAÇÃO

IMMUNOLOGICAL RESPONSE INDUCED BY THE *BRUCELLA ABORTUS* S19 AND RB51 VACCINES IN CALVES: EFFECTS OF AGE AT VACCINATION

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em epidemiologia e doenças infecciosas para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 6 de março de 2020

Dr^a Elaine Maria Seles Dorneles

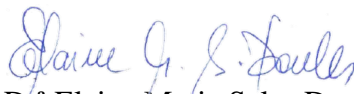
Dr Geraldo Márcio da Costa

Dr^a Lidianie Orlandi

UFLA

UFLA

UNILAVRAS



Prof^a Dr^a Elaine Maria Seles Dorneles
Orientadora

**LAVRAS – MG
2020**

RESUMO

A brucelose é uma das principais zoonoses em saúde pública e animal e em significância econômica no mundo. Os bovinos são os hospedeiros preferenciais da *Brucella abortus* e, em animais sexualmente maduros, a infecção se estabelece no sistema reprodutivo produzindo, tipicamente, placentite seguida de aborto em fêmeas gestantes durante o último trimestre de gestação e epididimite e orquite nos machos. O principal mecanismo para controlar a doença é por meio da vacinação compulsória dos bovinos e bubalinos. As vacinas mais utilizadas para controle da brucelose são a B19 e RB51. Os animais são vacinados, principalmente com B19, entre 3 e 8 meses de idade, mas não há consenso sobre a melhor idade, dentro dessa faixa, para estimular a resposta imune e a geração de células de memória nas novilhas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a melhor idade para vacinação contra brucelose bovina em bezerras de 3 a 8 meses de idade. Para isso, 105 animais foram utilizados e subdivididos em 9 grupos, sendo 3 vacinados com B19, 3 com RB51 e 3 controles, com idades variando de 3-4, 5-6 e 7-8 meses em cada um dos grupos. Após a vacinação no dia 0, os ensaios para avaliação da resposta imunológica induzida pela vacinação foram realizados no 28º e no 56º dia após a vacinação, que foram: ELISA de sobrenadante de cultura para avaliação da produção de IFN- γ ; teste padrão de aglutinação por tubo (STAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME), para verificar a soroconversão dos animais vacinados com B19; I-ELISA para medição de IgG. No ELISA direto, as diferenças na produção de IFN γ foram observadas nos dias 28 e 56, na comparação dos tratamentos (B19, RB51 e controle) para a mesma idade. Os resultados de 2-ME e STAT também mostraram que todos os animais vacinados com B19 foram soroconvertidos no dia 28, enquanto o restante permaneceu negativo. No teste I-ELISA, a média de densidade óptica (OD) nos animais vacinados é mais alta. Os resultados do estudo indicam que os bezerros vacinados com B19 ou RB51 com mais de 5 meses (5-8 meses) têm produção mais precoce de IFN- γ , sugerindo que essa seja a melhor idade para vacinar os animais.

Palavras-chave: brucelose bovina; resposta imunológica, citocinas; IFN- γ ; IgG.

ABSTRACT

Brucellosis is one of the main zoonoses in public and animal health and in economic significance in the world. Cattle are the preferred hosts of *Brucella abortus* and, in sexually mature animals, the infection is established in the reproductive system, typically producing placentitis followed by abortion in pregnant females during the last trimester of pregnancy and epididymitis and orchitis in males. The main mechanism for controlling the disease is through the compulsory vaccination of cattle and buffaloes. The most used vaccines to control brucellosis are S19 and RB51. The animals are vaccinated, mainly with S19, between 3 and 8 months of age, but there is no consensus on the best age, within this range, to stimulate the immune response and the generation of memory cells in heifers. Thus, the aim of this study is to evaluate the best age for vaccination against bovine brucellosis in calves from 3 to 8 months of age. For this, 105 animals were used and subdivided into 9 groups, 3 vaccinated with B19, 3 with RB51 and 3 controls, with ages ranging from 3-4, 5-6 and 7-8 months in each group. After vaccination on day 0, assays to assess the immunological response induced by vaccination were performed on the 28th and 56th day after vaccination, which were: culture supernatant ELISA to assess IFN- γ production; Standard agglutination test by tube and 2-mercaptoethanol, to verify the seroconversion of animals vaccinated with S19; I-ELISA for IgG measurement. In direct ELISA, differences in IFN γ production were observed on days 28 and 56, when treatments were compared (S19, RB51 and control) for the same age. The results of 2ME and STAT also showed that all animals vaccinated with S19 were seroconverted on day 28, while the rest remained negative. In the I-ELISA test, the mean optical density (OD) in vaccinated animals is higher. The study results indicate that calves vaccinated with S19 or RB51 older than 5 months (5-8 months) have earlier IFN- γ production, suggesting that this is the best age to vaccinate animals.

Keywords: bovine brucellosis; immune response, cytokines; IFN- γ ; IgG

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Brucelose bovina	10
2.1.1	Definição e etiologia	10
2.1.2	Importância no mundo	10
2.1.3	Brucelose bovina no Brasil	11
2.1.4	Transmissão e fatores de risco	12
2.1.5	Sinais clínicos	14
2.1.6	Diagnóstico	15
2.1.7	Tratamento	17
2.1.8	Controle e prevenção	18
2.1.8.1	Vacinas e vacinação	19
2.1.9	Resposta imune inata	20
2.1.10	Resposta imune adaptativa	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Local	25
3.2	Desenho experimental	25
3.3	Vacinação	27
3.4	Coleta de sangue	27
3.5	Extração do PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)	27
3.6	Expressão de citocinas no sobrenadante de cultura	28
3.7	Deteção de IgGs séricos por meio do I-ELISA	28
3.8	2-Mercaptoetanol	29
3.9	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Deteção de IFN-γ por ELISA	30
4.2	Ensaio de resposta imune humoral	31
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Brucella* são causadores da brucelose, enfermidade infecto-contagiosa, de curso subagudo ou crônico, que afeta diferentes espécies animais, além do homem (CORBEL *et al.*, 2006; OIE, 2016). A brucelose é uma das principais zoonoses em saúde pública e animal e em significância econômica no mundo (SANTOS *et al.*, 2013). Os bovinos são os hospedeiros preferenciais da *Brucella abortus* (CORBEL *et al.*, 2006) e, em animais sexualmente maduros, a infecção se estabelece no sistema reprodutivo produzindo, tipicamente, placentite seguida de aborto em fêmeas gestantes durante o último trimestre de gestação e epididimite e orquite nos machos (CORBEL *et al.*, 2006). As perdas diretas decorrentes da brucelose bovina são causadas principalmente em função da ocorrência de abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de leite, morte de bezerros, esterilidade, além de levar a desvalorização da atividade (ALVES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2013). Santos e colaboradores, em 2013, estimaram uma perda total devido à brucelose de R\$ 892 milhões para os rebanhos brasileiros e, segundo Alves e pesquisadores (2015), esse número pode ser ainda maior se as diferenças de prevalência entre os estados também são levadas em consideração.

As medidas empregadas no controle da brucelose bovina são classificadas em duas principais categorias gerais: higiene e vacinação (LAGE, 2005a). A higiene, cujo objetivo é limitar a exposição dos animais susceptíveis, inclui todos os processos, como o isolamento do agente, diagnóstico, restrição do comércio e abate dos animais positivos (LAGE, 2005a; DORNELES *et al.*, 2017) e a vacinação de animais susceptíveis, que tem contribuído enormemente para o sucesso de muitos programas, especialmente, na fase de controle da doença (OLSEN E STOFFREGEN, 2005). No Brasil, em 2001, foi implementado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que preconiza a vacinação compulsória de fêmeas bovinas e bubalinas, entre 3 e 8 meses de idade, entre outras medidas de controle.

Os melhores resultados na prevenção da brucelose são observados para vacinas preparadas com amostras vivas atenuadas de *Brucella* spp. (DORNELES, 2015a). A *B. abortus* B19 é um organismo liso atenuado que tem sido utilizado para a prevenção da brucelose bovina por mais de sete décadas, mas possui como desvantagem a persistência de anticorpos detectáveis nos testes de rotina empregados para diagnóstico da brucelose, quando os animais são vacinados em idade superior a 8 meses (BRASIL, 2017; CORBEL *et al.*, 2006).

Outra amostra vacinal introduzida como ferramenta no controle da brucelose é a *B. abortus* RB51, uma amostra mutante deficiente do lipolissacarídeo O, derivada da amostra virulenta *B. abortus* 2308. Usada como uma alternativa à vacinação com B19, a RB51 possui a vantagem de não induzir a produção de anticorpos específico anti-LPS ou anti-O, detectáveis pelos testes sorológicos de rotina (SCHURIG *et al.*, 1991). Esta característica permite que a vacinação com RB51 possa ser realizada em qualquer idade.

Sabe-se que a resposta imune do tipo Th1 mediada pelo interferon gama (IFN- γ) é crucial para a superação da infecção por *B. abortus* (DORNELES *et al.*, 2015b; KIM *et al.*, 2017). Segundo Cheville e colaboradores (1996), o grupo de bezerros vacinados B19 ou RB51 nas idades de 3, 5 e 7 meses tiveram bons resultados de proteção quando desafiados com *B. abortus*. Assim, é necessário estabelecer a idade ideal para a vacinação desses animais.

A caracterização do perfil imunológico associado à resistência à brucelose é essencial para a pesquisa de vacinação. Segundo Manthei (1959) e McDiarmid (1957), a eficácia de uma vacinação é influenciada, entre outros fatores, pela idade da vacinação e pela imunidade adquirida aos bovinos vacinados entre 6 e 8 meses de idade. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar o perfil de resposta imunológica induzido pela vacinação com brucelose (B19 e RB51) em bezerros vacinados em diferentes idades entre 3 e 8 meses, para determinar a idade ideal para a vacinação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Brucelose bovina

2.1.1 Definição e etiologia

A brucelose é uma zoonose, conhecida também como “febre ondulante”, “febre do Mediterrâneo” ou “febre malta”, causada por bactérias do gênero *Brucella*. Este patógeno é Gram-negativo altamente patogênico para seres humanos e pode infectar uma grande variedade de animais, incluindo animais silvestres (DÍAZ-APARICIO, 2013). O gênero *Brucella* foi descoberto por David Bruce, em 1887, e é composto por 12 espécies: *Brucella melitensis* – isolado em 1887 em Malta; *Brucella abortus* – uma das principais causas de aborto em bovinos (doença de Bang); *Brucella suis* – causadora da brucelose, principalmente, em suínos; *Brucella canis* – mais frequentemente isolada de cães; *Brucella neotomae* – isolada de ratos do deserto; *Brucella ovis* - infecta ovinos, sendo responsável pela epididimite ovina; *Brucella papionis* – isolada de babuínos; *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis* - encontradas principalmente em mamíferos marinhos (baleias, focas, golfinhos) no Oceano Atlântico; *Brucella microti* – isolada de roedores e raposas; *Brucella inopinata* - isolado de uma prótese mamária de uma mulher que apresentava sinais clínicos de brucelose; *Brucella vulpis* – isolada de raposa vermelha (GALINSKA; ZAGÓRSKI, 2013; SCHOLZ *et al.*, 2016).

2.1.2 Importância no mundo

A brucelose é considerada a doença zoonótica mais comum em todo o mundo, com mais de 500 000 novos casos anualmente. A epidemiologia da doença mudou, por várias razões, tais como medidas sanitárias, razões socioeconômicas e políticas (PAPPAS *et al.*, 2006).

Considerada um grande problema de saúde pública no mundo, a brucelose animal é endêmica na maior parte das regiões do planeta, especialmente em Países da Bacia mediterrânica, subcontinente indiano, golfo da Arábia e partes do México e da América Central e do Sul (YOUNG, 1995). Países como Austrália, Canadá, Japão, Nova Zelândia e alguns países do norte e centro da Europa, são considerados livres da doença, status alcançado por meio da adoção de rigorosas medidas de higiene veterinária que erradicaram a doença. Embora todos os estados dos Estados Unidos (EUA) sejam classificados como livres de *B. abortus* em bovinos,

a infecção permanece na vida selvagem dentro e ao redor da área de Yellowstone, com ocasional disseminação para bovinos (DÍAZ-APARÍCIO, 2013).

2.1.3 Brucelose bovina no Brasil

No Brasil, a brucelose pode ser encontrada por todo país, interferindo diretamente em toda cadeia produtiva da bovinocultura. Em 1975, foi realizado estudo sorológico da situação da brucelose bovina em nível nacional, estimou-se o percentual de animais soropositivos nas regiões: Sul em 4%, Sudeste 7,5%, Centro-Oeste 6,8%, Nordeste 2,5% e Norte 4,1% (BRASIL PNCEBT, 2006). Outros levantamentos sorológicos por amostragem foram realizados posteriormente em 16 estados, revelando algumas alterações na prevalência de brucelose: Rio Grande do Sul, a prevalência passou de 2,0%, em 1975, para 0,3% em 1986; em Santa Catarina, passou de 0,2% em 1975, para 0,6% em 1996; no Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3%, coincidente ao valor estimado em 1975 para o território mato-grossense; no estado de Minas Gerais, a prevalência foi de 7,6% em 1975, para 6,7% em 1980; no Paraná, passou de 9,6% em 1975, para 4,6% de bovinos soropositivos em 1989. (BRASIL, 2006).

Em 2001, foi criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), o Programa Nacional para o controle e erradicação da Brucelose e Tuberculose animal (PNCEBT), que propõe a vacinação compulsória com a vacina B19, contra brucelose, em bovinos e bubalinos, fêmeas, com idade entre três e oito meses em todo o país, como medida estratégica para reduzir os impactos dessa doença no Brasil (ALVES *et al.*, 2015).

Aproximadamente dez anos após o primeiro estudo sobre o estado epidemiológico da brucelose bovina, os estados de Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, e Rio Grande do Sul realizaram um segundo estudo para determinar se houve uma diminuição na prevalência de acordo com as normas implementadas programas de vacinação (Tabela 1). Podendo ser observado que o programa de vacinação levou à redução da prevalência de rebanhos infectados em Minas Gerais, Rondônia, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (FERREIRA NETO *et al.*, 2016).

Tabela 1: Comparação da prevalência de rebanhos infectados por brucelose bovina (P) entre o primeiro e segundo estudo realizado nos estados brasileiros, com intervalo de aproximadamente 10 anos.

Estado	Ano	P (%)	Ano	P (%)
Minas Gerais	2002	6,04	2011	3,59
Rondônia	2004	35,18	2014	12,3
Mato Grosso	2003	41,2	2014	24
Mato Grosso do Sul	1998	41,5	2009	30,6
Espírito Santo	2002/2003	9,0	2012/2014	9,3
Rio Grande do Sul	2004	2,06	2013	3,54
São Paulo	2001	9,7	2011	10,2
Santa Catarina	2001	0,32	2012	0,91

Fonte: Adaptado de Ferreira Neto *et al.* (2016).

Os estados de São Paulo, Santa Catarina, Espírito Santo e Rio Grande do Sul mostram uma manutenção dos níveis de prevalências de rebanhos soropositivos neste período. Em 2013-2016, também foram divulgados dados que descrevem a situação da brucelose bovina nos estados do Maranhão, Pernambuco e Paraíba, que exibiram prevalências de rebanhos soropositivos de 11.4%, 4.5% e 4.6%, respectivamente (FERREIRA NETO *et al.*, 2016).

O impacto econômico da brucelose no Brasil foi avaliado por meio de vários parâmetros, incluindo taxa de mortalidade perinatal e por aborto, infertilidade temporária, custos de reposição, mortalidade, custos veterinários, perdas de leite e carne. Aproximadamente 90% da população de bovinos no país infectada resultou em perda estimada em R\$ 420,12 e R\$ 226,47 para cada fêmea com mais de 24 meses de idade soropositiva, referente à produção leite e carne bovina, respectivamente. As perdas totais atribuídas à brucelose bovina no Brasil foram estimadas em cerca de R\$ 892 milhões anuais. Espera-se que cada aumento ou redução de 1% na prevalência aumente ou diminua a carga econômica da brucelose em aproximadamente 155 milhões de reais (SANTOS *et al.*, 2013).

2.1.4 Transmissão e fatores de risco

A brucelose é transmitida por meio do contato direto ou indireto com animais infectados ou seus produtos, principalmente restos fetais. As bactérias são eliminadas por esses animais nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias pós-parto ou pós-aborto. A grande quantidade de bactérias eliminadas durante o aborto ou parto dos animais infectados, associada

à grande resistência de *B. abortus* no ambiente, é a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis (CRAWFORD *et al.*, 1990).

As bactérias são frequentemente adquiridas pela ingestão, inalação, inoculação conjuntival, contaminação da pele e inoculação do úbere a partir de equipamentos de ordenha contaminados; a pastagem ou o estábulo onde os animais se encontram também podem funcionar como fonte de infecção. Além disso, o uso de colostro contaminado na alimentação de bezerros é outra forma de transmitir a infecção. A rota venérea geralmente desempenha um papel menos significativo na epidemiologia da brucelose bovina. No entanto, a inseminação artificial pode transmitir a doença e o sêmen deve ser coletado apenas de animais sabidamente livres de infecção (CORBEL *et al.*, 2006).

O trânsito de animais destinados à reprodução, como ocorre em feiras e leilões, pode favorecer a disseminação da doença, já que os animais podem ser infectados e infectar outros animais quando retornarem ao seu rebanho de origem. Por isso, não é aconselhável comprar animais que não são provenientes de rebanhos comprovadamente livres de brucelose ou antes da realização de testes diagnósticos intervalados de pelo menos 21-30 dias (DÍAZ-APARÍCIO, 2013). Outros fatores, como o grande tamanho e alta densidade de alguns rebanhos, bem como a demora na eliminação dos animais infectados e a ausência ou baixa taxa de vacinação podem elevar a taxa de transmissão da brucelose dentro dos rebanhos (LAGE, 2008).

Em relação à brucelose humana, a doença está frequentemente associada ao contato direto com animais e produtos de aborto / parto (caráter ocupacional), ou ao consumo de produtos de origem animal sem tratamento térmico (PAPPAS *et al.*, 2006). As principais vias de transmissão são por meio do contato direto com animais (60 % dos casos) ou o contato com as suas secreções, por meio de soluções de continuidade cutâneas, aerossóis contaminados, inoculação no saco conjuntival ou ingestão de produtos não pasteurizados (25% dos casos). Nos casos de produtos não pasteurizados, a bactéria pode sobreviver de duas semanas até três meses (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA; 2003)

A expansão das indústrias de animais de produção, a urbanização e a falta de medidas de higiene na pecuária e na manipulação de alimentos representam um grande risco à saúde pública. (CORBEL *et al.*, 2006). A enfermidade pode acometer pessoas de qualquer faixa etária ou sexo. Adicionalmente, a crescente demanda por viagens internacionais estimula a ingestão de produtos lácteos exóticos, como por exemplo, queijos frescos, que podem estar contaminados. A importação de tais alimentos também contribui para a crescente preocupação com a brucelose humana (CORBEL *et al.*, 2006).

2.1.5 Sinais clínicos

A infecção por *B. abortus* nos animais se manifesta principalmente por meio de falhas na reprodução, por ter afinidade pelo trato reprodutivo de machos e fêmeas. Ocasionalmente abortos, natimortos, nascimento de crias fracas, sendo responsável pelos principais sintomas clínicos da infecção: aborto e infertilidade. Os casos de aborto em rebanhos com infecção crônica são menos comuns. No entanto, os animais infectados continuam portadores da doença e eliminam o agente em secreções vaginais, sendo uma constante fonte de infecção para os demais animais do rebanho (MANISH *et al.*, 2013).

A invasão do útero bovino é marcada pela placentite necrótica, consequente de uma inflamação da placenta, que pode ser aguda, levando a morte prematura de feto seguida de aborto, subaguda ou crônica, que geralmente conduzem ao aborto de forma tardia ou ao nascimento da cria fraca e infectada, estando frequentemente associada à retenção de placenta com alterações cotiledonárias (MANISH *et al.*, 2013).

Nos machos, os sinais se manifestam por meio de uma fase inflamatória aguda, seguida da fase crônica, geralmente assintomática. As bactérias podem instalar-se nos testículos, epidídimos e vesículas seminais. A orquite uni ou bilateral, é um dos principais sinais, podendo ser transitória ou permanente, com aumento ou diminuição do volume dos testículos. De outra forma, pode ser observado o testículo com aspecto amolecido e repleto de secreção purulenta. Lesões articulares também podem ser encontradas (BRASIL, 2006).

No ser humano, qualquer órgão ou sistema pode ser acometido pela brucelose, sendo esta uma infecção sistêmica de sintomas inespecíficos que ocorrem, geralmente, dentro de 2-3 semanas após a infecção. Queixas como febre, suores, anorexia, fadiga, perda de peso e depressão são comumente relatadas. Os achados físicos são escassos, sendo os mais notáveis: febre, linfadenopatia e, ocasionalmente, hepatoesplenomegalia. A febre é um sinal presente em todos os pacientes em algum momento da doença, podendo aumentar e diminuir durante semanas ou meses, enquanto o tratamento não é implementado (daí o termo "febre ondulante"). Ocasionalmente, sintomas relacionados a um único órgão predominam, caso em que a doença é denominada localizada (YOUNG, 1995).

As formas localizadas são predominantemente crônicas, sendo marcadas por frequentes recidivas. Como qualquer doença sistêmica, a brucelose pode atingir qualquer órgão ou sistema. Em alguns casos, a lesão em algum órgão poderá sobressair ou predominar, correspondendo às

formas mais complicadas. Acometimentos ósteo-articulares ocorrem em 20-60% dos casos, atingindo várias articulações de forma assimétrica, sobretudo as grandes articulações de carga (por ordem de frequência: coluna lombar, articulação sacro-ilíaca, articulação coxo-femural, joelho e articulação tíbio-társica) (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003).

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da brucelose pode ser feito pela identificação do agente por métodos diretos, ou pela detecção de anticorpos contra *B. abortus* por métodos indiretos (BRASIL, 2006).

Os métodos diretos mais utilizados são a cultura e a Reação em Cadeia de polimerase (PCR); a cultura é realizada por meio o isolamento do agente causador é um método diagnóstico altamente específico e o mais conclusivo em qualquer doença infecciosa. A cultura e o isolamento é considerado o "padrão ouro" no diagnóstico da brucelose (Alton *et al.*, 1988). A diferenciação de *Brucella* em espécies, biovar e nível de estirpe por técnicas bacteriológicas e / ou moleculares é normalmente realizada em laboratórios de referência (MANISH *et al.*, 2013). Os testes baseados em PCR são mais sensíveis do que o método de cultura tradicional. A PCR em tempo real foi utilizada para detecção de *Brucella*, oferecendo melhora no tempo de detecção e especificidade. A PCR em tempo real também é útil para quantificar a carga de microrganismos em amostras (MANISH *et al.*, 2013).

O PNCEBT definiu no Brasil, como oficiais, os seguintes métodos indiretos de testes sorológicos, são eles, teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), teste do Anel em Leite (TAL), teste 2-Mercaptoetanol (2-ME) e teste Fixação de Complemento (FC). Os dois primeiros como testes de triagem e os dois últimos como confirmatórios. A escolha dos métodos sorológicos deve considerar o custo, o tamanho e as características da população que será avaliada, a situação epidemiológica da doença, a sensibilidade e a especificidade dos testes, bem como a utilização de vacinas (BRASIL, 2006).

Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) é também chamado de teste de rosa de Bengala. Funciona como um método de rastreio rápido, muito usado em estudos epidemiológicos e triagem do rebanho. Quando os resultados são positivos devem ser confirmados por outros testes. Consiste numa prova de aglutinação e tem o inconveniente de não fornecer resultados quantitativos, o que não indica a titulação de anticorpos testados (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003).

Teste do anel em Leite (TAL) é um teste qualitativo, que detecta a presença de anticorpos no leite. Embora este seja um teste relativamente insensível, sujeito a interpretação incorreta causada por várias condições do leite, como mastite, colostro e leite no final do ciclo de lactação é recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) como um teste de rastreio para brucelose bovina (NIELSEN, 2002).

Testes Confirmatórios: 2- Mercaptoetanol (2-ME), é uma prova qualitativa capaz de detectar a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica (BRASIL, 2006).

Teste de Soroaglutinação em Tubos (SAT) pode também ser chamado de prova lenta, devido ao tempo de leitura dos resultados (48 horas). Comumente associada ao teste do 2-Mercaptoetanol com objetivo de confirmar resultados positivos em provas de rotina (BRASIL, 2006).

Fixação do complemento (FC): se o anticorpo estiver presente no soro, ele se ligará ao antígeno formando o complexo antígeno-anticorpo e o complemento será ativado. O teste FC é tecnicamente desafiador, pois é necessário um grande número de reagentes, além de o tempo e o ensaio poderem configurar resultados subjetivos. Outro problema é a incapacidade de distinguir o anticorpo da vacina da infecção e a ocorrência ocasional de amostras de soro que ativam o complemento na ausência de antígeno. Apesar das deficiências, o FC tem sido um ativo valioso no controle / erradicação programas como teste confirmatório, sendo recomendado pela OIE como um teste prescrito para o comércio internacional (NIELSEN, 2002).

Teste ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas (ELISA): oferece excelente sensibilidade e especificidade, sendo robusto, bastante simples de realizar com o mínimo de equipamento e prontamente disponíveis a partir de várias fontes comerciais em forma de kit. Eles são mais adequados que o FC para uso em laboratórios menores (CORBEL, 2006). Mede IgG, IgM e IgA, o que permite uma melhor interpretação da situação clínica. A especificidade do ELISA, no entanto, parece ser menor que os testes de aglutinação (CHRISTOPHER *et al.*, 2010).

O teste ELISA indireto, usado para detecção de anticorpos, é aplicado no soro bovino. Este é diluído em tampão de diluição, que contém um detergente como Tween 20 e agentes quelantes de cátions divalentes, EDTA e EGTA, para reduzir a ligação não específica de proteínas séricas. Um reagente antiglobulina específico é adicionado, reagindo de forma cruzada com a imunoglobulina da espécie teste, conjugado com uma enzima, geralmente

peroxidase de rábano ou fosfatase alcalina (NIELSEN, 2002). No método de ELISA direto, anticorpos primários específicos são aderidos à placa, procedendo-se em seguida, uma lavagem e adição da solução a pesquisar (amostra) no mesmo local. Após os procedimentos normais de incubação e lavagem a placa é incubada com anticorpo marcado com enzima, que reconhece o antígeno associado ao anticorpo aderido à placa (MOREIRA *et al.*, 2011).

Teste de Polarização de Fluorescência (FPA): é realizado por meio do antígeno preparado com o polissacarídeo O, também denominado cadeia “O”, de *B. abortus*, conjugado com o isotiocianato de fluoresceína. O teste é baseado na comparação de velocidades dos movimentos aleatórios das moléculas em solução. É possível medir a quantidade de anticorpos presente no soro testado, por meio da utilização de controles e de soro pré-titulado. A conclusão do teste é feita em poucos minutos e pode ser realizado em soro e leite. Tem-se mostrado muito promissor para o diagnóstico de brucelose também em outras espécies (BRASIL, 2006).

Teste de Polarização Fluorescente (FPA): é utilizado como teste único ou como teste confirmatório em animais reagentes ao teste do AAT ou inconclusivos ao teste do 2-ME (BRASIL, 2006).

2.1.7 Tratamento

Em bovinos e bubalinos positivos para a brucelose o tratamento não é realizado. Primeiramente, animais reagentes ao teste de diagnóstico para brucelose serão marcados, pelo médico veterinário responsável pelo exame. Animais positivos deverão ser isolados do rebanho, afastados da produção leiteira e abatidos no prazo máximo de trinta dias após o diagnóstico, em estabelecimento sob serviço de inspeção oficial (IN 10, 2017).

Somente profissionais providos de equipamentos de proteção individual são permitidos manipular e abater os animais, sendo as carcaças, órgãos e vísceras encaminhados obrigatoriamente ao Departamento de Inspeção Final; as carcaças que apresentarem lesões, extensas ou localizadas, deverão ser julgadas conforme Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). As carcaças que não apresentarem lesões serão liberadas para consumo em natureza, devendo ser condenados o úbere, o útero, anexos do trato genital, miúdos e sangue (IN 10, 2017).

Na impossibilidade de abate sanitário em estabelecimento sob serviço de inspeção oficial, os animais serão submetidos à eutanásia no estabelecimento de criação, conforme normatizado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (IN 10, 2017).

As bactérias do género *Brucella* sp. são microrganismos intracelulares, por isso se faz necessária boa penetração dos antibióticos e tratamento prolongado (geralmente, seis semanas). As taxas de recidiva com monoterapia são elevadas, portanto, é usada estrategicamente a terapêutica combinada. Os antimicrobianos mais utilizados são as tetraciclinas, os aminoglicosídeos, a rifampicina, o cotrimoxazol, as quinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração. A escolha da associação dos antibióticos depende de vários fatores, como: idade, gravidez, toxicidade potencial e gravidade do quadro clínico (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003).

2.1.8 Controle e prevenção

A vacinação é considerada uma das estratégias mais eficientes para reduzir a prevalência de brucelose bovina, com grande contribuição para o sucesso de muitos programas de controle. As vacinas B19 e RB51, comumente utilizadas no controle da brucelose bovina, são eficazes na prevenção de aborto e infecção. Além disso, conferem proteção duradoura (DORNELES *et al.*, 2015b).

No Brasil, é obrigatória a vacinação de fêmeas das espécies bovina e bubalina, com a vacina de amostra 19 de *Brucella abortus* (B19), respeitando a faixa etária de 3 a 8 meses, utilizando dose única da vacina liofilizada. A vacina B19 pode ser substituída pela vacina RB51, em qualquer idade na espécie bovina, por ser uma vacina não indutora de anticorpos aglutinantes (IN 10, 2017).

A vacinação com a amostra RB51 pode também pode ser realizada de forma estratégica dentro de um programa de controle apenas para fêmeas com idade acima de oito meses, a fim de aumentar a cobertura vacinal e, conseqüentemente, diminuir a proporção de indivíduos susceptíveis da população (LAGE, 2005b).

Outro fator muito importante no controle da doença é a eliminação de animais positivos nos testes diagnósticos do rebanho, o mais breve possível, para se evitar que permaneçam como fontes de infecção para os animais susceptíveis. Além disso, é de grande importância que estes animais sejam separados do rebanho logo após o diagnóstico, evitando-se que abortem ou venham a parir junto aos animais negativos (CRAWFORD *et al.*, 1990).

Associadas a estas duas estratégias, a aquisição criteriosa de animais, sempre com exames negativos para brucelose, é uma medida que deve ser adotada para se evitar a entrada de animais infectados na propriedade (CRAWFORD *et al.*, 1990; LAGE, 2005a).

2.1.8.1 Vacinas e vacinação

Os melhores resultados para a prevenção da brucelose bovina foram encontrados na vacinação com cepas atenuadas de *B. abortus*, provavelmente porque estas vacinas têm capacidade de se multiplicar dentro de animais por um curto período de tempo e induzir uma resposta imune celular forte e protetora. A vacinação maciça contra a brucelose em bovinos foi realizada empregando poucas cepas vacinais, B19, RB51, 45/20 e SR82. Entretanto, muitas vacinas candidatas contra *B. abortus* tenham sido desenvolvidas nos últimos anos, como DNA, subunidade, *B. abortus* recombinante e vacinas de vetores recombinantes. A maioria dessas vacinas geneticamente modificadas foi desenvolvida e testada usando modelos de camundongos e não foram testadas ou não foram protetoras em bovinos. Entre as vacinas vivas de *B. abortus* modificadas, B19 e RB51, são as cepas mais amplamente utilizadas em todo o mundo (DORNELES *et al.*, 2017).

As vacinas B19 e RB51, obtidas a partir de uma amostra de LPS liso e rugoso, respectivamente, de *B. abortus*, têm sido empregadas mundialmente para o controle da brucelose bovina. No Brasil, a vacinação contra brucelose com B19 é obrigatória para bezerras de três a oito meses de idade, e facultativamente acima de oito meses com RB51, sendo a vacinação a forma mais eficaz de reduzir a prevalência da doença (BRASIL, 2016).

A vacina B19 possui características altamente desejáveis em uma vacina contra a brucelose, entre as quais: vacinação em dose única em bezerras, com idade entre três a oito meses, conferindo imunidade prolongada; é atenuada para bovinos, causando reações mínimas após a sua aplicação; e confere proteção em 70-80% dos animais vacinados (JONES; HOOPER, 1976; NICOLETTI, 1980). Proveniente de uma amostra lisa de *B. abortus* biovar 1, a B19 também tem como característica imunogenicidade relativamente alta e antigenicidade moderada, induzindo uma resposta de anticorpos que não se distingue da resposta de anticorpos induzida pela infecção por linhagens de campo. Esse caráter está associado ao lado O cadeia, um antígeno imunodominante no lipopolissacarídeo (LPS), a qual a maioria dos anticorpos resultantes da imunização B19 ou a infecção natural dirige-se (DORNELES *et al.*, 2017). Os testes sorológicos baseiam-se na detecção dos anticorpos contra a cadeia O, impossibilitando a distinção da resposta vacinal da resposta contra o agente (SCHURIG *et al.*, 2002).

Proveniente de uma amostra rugosa de *B. abortus*, a vacina RB51 é derivada da estirpe virulenta 2308, por passagens em série em meios contendo concentrações subinibitória de

rifampicina ou penicilina, por isso são resistentes a tais antibióticos. É considerada um mutante bruto de ocorrência natural. Induz anticorpos específicos para antígenos de *B. abortus*, porém é deficiente da cadeia O do LPS, não detectável em testes sorológicos. Dessa forma, essa vacina pode ser utilizada em animais com idade superior a 8 meses (DORNELES *et al.*, 2017; SCHURIG *et al.*, 1991).

A eficácia da vacina é alta, em condições de alta ou baixa prevalência da doença. Assim como a B19, a RB51 não é uma vacina segura para animais prenhes, sendo também patogênica para seres humanos e, devido à sua resistência à rifampicina, antibiótico de eleição durante o tratamento, a contaminação pode agravar o quadro, fazendo-se necessário o uso equipamentos de proteção, que devem ser utilizados durante sua manipulação (DORNELES; SRIRANGANATHAN; LAGE; 2015a).

A vacina RB51 induz uma forte resposta imune celular Th1 com resposta citolítica e atividade citotóxica exercida principalmente por células T CD8⁺, enquanto as células CD4⁺ são responsáveis principalmente pela secreção de IFN γ e exibindo algum nível de atividade lítica (DORNELES *et al.*, 2015c). Em relação a B19, a resposta imune predominante também é Th1, com produção de IL-2, TNF α e IFN γ e níveis elevados de células T CD4⁺ antígeno específico e T CD8⁺ secretoras de granzima B. As informações sobre a resposta vacinal à *B. abortus* em bovinos é limitada, pois grande parte dos estudos é realizada em camundongos, porém dados indicam que o padrão de células e citocinas é muito semelhante entre camundongos e bovinos. Algumas evidências indicam que componentes imunológicos mediadores de células específicas são estimulados após a vacinação com B19 e RB51 com produção de IFN γ e aumento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (DORNELES *et al.*, 2015c).

Considerando a resposta imune humoral, após a vacinação com a estirpe B19, os anticorpos de maior titulação são IgG1, IgG2 e IgM, e baixa concentração de IgA. Já na estirpe RB51, a predominância foi de anticorpos IgG2a específica, associada a resposta imune Th1, sendo a imunoglobulina G2 importante na opsonização e subsequente fagocitose do organismo (DORNELES *et al.*, 2015).

2.1.9 Resposta imune inata

A defesa do organismo contra microrganismos é mediada, inicialmente, pela imunidade inata. Essa fornece a primeira linha de defesa contra o agente infeccioso, atuando com mecanismos de defesa celulares e bioquímicos, que respondem rapidamente à infecção. Seus

mecanismos atuam em estruturas comuns aos diversos organismos invasores por meio de barreiras como o epitélio; a ativação de células fagocitárias como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e *Natural Killer* (NK); e por proteínas sanguíneas de fase aguda, como as do sistema complemento. Posteriormente, os produtos da imunidade inata vão estimular a imunidade adaptativa, que é, de fato, a responsável pela eliminação do agente infeccioso do organismo (ABBAS; LICHTMAN; 2008).

Padrões moleculares associados a patógenos na superfície de microrganismos são reconhecidos pela primeira vez por receptores *Toll-like*, que transmitem sinais para ativar células que apresentam antígenos (APCs) e facilitam a fagocitose de bactérias. Esta reação inicial não é antígeno específica e é denominada imunidade inata (GOLDIN *et al.*, 2001).

As células NK são ativadas pela infecção por *B. abortus* ou suas frações antigênicas e são as principais células que ativam os linfócitos B e, conseqüentemente, a produção de anticorpos. Porém, em estudos com camundongos, as células NK parecem não ser importantes na resposta à infecção por brucelose. Em seres humanos, essas células não expressam IFN- γ e TNF- α em resposta à *B. abortus*, além de possuir menor citotoxicidade nos casos de infecção aguda. Dessa forma, sugere-se que sua presença não representa um fator crítico para a resposta imune contra esse agente (DORNELES *et al.*, 2015d).

Os neutrófilos são as células mais numerosas, importantes e de curta duração da resposta imune inata. Alguns estudos relatam que os neutrófilos não desempenham papel significativo na resposta à infecção por *B. abortus*, pois durante a fase crônica da infecção, em camundongos, a *B. abortus* é eliminada de forma mais efetiva na ausência de neutrófilos. Sugerindo-se que os neutrófilos limitam e regulam a ativação da resposta imune contra a infecção intracelular pela bactéria. Além disso, há um perfil de ativação, com aumento na expressão de CD35, CD11b, IL-8 e diminuição de CD62, observada em neutrófilos humanos, estando associadas à patogênese da brucelose, cooperando para lesão tecidual localizada e inflamação (DORNELES *et al.*, 2015d). Os neutrófilos humanos também foram associados a mecanismos de dano tecidual no decorrer da brucelose hepática, visto que a apoptose celular hepática teve aumento significativo de sobrenadante de neutrófilos infectados por *B. abortus* (DORNELES *et al.*, 2015d).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) consistem em macrófagos e células dendríticas (DCs). Juntamente com as células NK, são as primeiras células que reagem contra patógenos invasores e estão posicionados de forma estratégica sob a pele e em mucosas. Paredes celulares bacterianas e LPS são reconhecidas por APCs usando receptores Toll-like, resultando

na ativação da célula e internalização da bactéria, com consequente liberação de citocinas, tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6, que podem ativar APCs e fazendo parte do sistema imune inato (GOLDING *et al.*, 2001).

Os macrófagos são fundamentais para a eliminação de *B. abortus* em camundongos. Nos momentos iniciais da infecção os macrófagos permitem a replicação do agente no seu interior. Posteriormente, após a consolidação da imunidade adaptativa, os macrófagos ativados são os principais responsáveis pela eliminação do agente. Esse fato ocorre graças às espécies reativas de nitrogênio (RNI) e oxigênio (ROS), que são induzidos pelo IFN- γ e TNF- α . Uma pequena parcela das bactérias pode sobreviver, levando a recorrência da doença em sua forma crônica (Dorneles *et al.*, 2015d). Em seres humanos, os macrófagos ativados por TNF- α inibem a replicação da *Brucella*, em estudos *in vitro*. Já em camundongos, a presença de TNF- α e IL-12 estão envolvidos no aumento da resistência à doença, considerando que um dos mecanismos básicos de defesa desse microorganismo é impedir a liberação de TNF- α (CARON *et al.*, 1994).

As DC's representam um importante elo entre a imunidade inata e a adaptativa. Em camundongos a presença de *B. abortus* prejudica a maturação das DC's por meio da redução da sinalização por receptores Toll-like 2. Em bovinos, as DC's são parcialmente resistentes à infecção por esse agente. As cepas rugosas de *B. abortus* são capazes de induzir maior maturação das DC's, pois secretam IL-12 e TNF- α estimuladas pela presença de linfócitos T CD4⁺. As diferenças nas susceptibilidades dos hospedeiros podem estar relacionadas às diferenças na progressão da doença, sendo os bovinos mais capazes de controlar a infecção, mostrando menos sinais do que humanos e a maior parte dos camundongos. (DORNELES *et al.*, 2015d).

A imunidade inata não é suficiente para eliminar a infecção por *B. abortus*, mas é essencial para o adequado desenvolvimento da imunidade adaptativa, que controla a doença. A *B. abortus* escapa dos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro, o que permite sua replicação intracelular antes do estabelecimento da imunidade adaptativa (BARQUERO-CALVO *et al.*, 2007).

2.1.10 Resposta imune adaptativa

A capacidade de *B. abortus* persistir no corpo e causar infecção crônica está relacionada à sua capacidade de sobreviver em macrófagos por interferir com a fusão fagolisossômica. Além disso, a *Brucella* pode inibir a apoptose de células infectadas. No entanto, a ativação de

macrófagos pode promover a morte das bactérias por indução de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. A resposta Th1, mediada pela citocina, IFN- γ , desempenha um papel importante na ativação macrófagos e na limitação de infecções por *Brucella* tanto em in vitro e in vivo. Por outro lado, resposta Th2, mediada pela citocina IL-10, pode suprimir a função macrofágica e aumentar a suscetibilidade de infecção. O balanço de citocinas provavelmente explica diferenças na suscetibilidade à infecção em várias linhagens de camundongos (GOLDING, 2001).

Os IFN são proteínas solúveis com potente atividade antiviral. Pode ser produzido, na resposta imune inata, pelas NK, após a estimulação delas pela IL-12 e, na adaptativa, pelos linfócitos T. Também pode ser produzido pelo subgrupo de linfócitos Th1, proveniente das células efectoras TCD4⁺. O IFN- γ ativa os macrófagos M1 para que eles destruam os microrganismos que foram fagocitados. Os macrófagos produzem IL-12 e lisam os microrganismos intracelulares por meio da fagócito-oxidase. Isso permite que essa interação controle uma infecção bacteriana intracelular, como a brucelose, por várias semanas ou por tempo o suficiente para que a resposta imunológica mediada por células T esteja madura o suficiente para erradicar a infecção. A produção em larga escala de IFN γ pode provocar problemas vasculares (como coagulação intravascular disseminada e colapso vascular), gerando a morte do indivíduo (ABBAS; LITCHMAN, 2008).

Em bovinos, a resposta imune celular contra a brucelose inclui a predominância da resposta Th1, por meio da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺, CD8⁺ e de anticorpo IgG2 originado dos linfócitos B, e T CD8⁺ citotóxicas (O'SHEA; PAUL, 2010). Enquanto Th2, células secretoras de IL-4 promovem a produção de IgG1 e IgE (GOLDING *et al.*, 2001). Os antígenos de *B. abortus* são apresentados aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pelo MHC-II e MHC-I, respectivamente. As células T CD4⁺ secretam citocinas que modulam a resposta de outras células, a exemplo do IFN- γ pós-vacinação em bovinos (DORNELES *et al.*, 2015a). Os linfócitos T CD8⁺ são cruciais para a resistência à brucelose em camundongos e, associados aos linfócitos T CD4⁺, ocorre a indução da morte de células infectadas (WYCOFF; POTTS, 2007). Em camundongos infectados por *B. abortus* há o aumento da produção de IL-12 por macrófagos, diferenciando a resposta de linfócitos *naïve* Th0 na resposta efectora Th1 e células de memória (PASQUALI *et al.*, 2001).

A cepa lisa de *B. abortus*, utilizada na vacina B19, expressa o lipopolissacarídeo de cadeia O, altamente imunogênico, esse é capaz de se ligar ao MHC de classe II, ativando as células B de forma independente dos linfócitos T. A imunidade humoral representa um papel

secundário na depuração da infecção por *Brucella*, sendo a imunidade adaptativa celular a de maior importância (LI; HE, 2012).

A expressão das moléculas de MHC é aumentada na presença de IFN- γ . Sendo essa a principal citocina envolvida no estímulo de MHC de classe II nas APCs (DCs e macrófagos). Essa é uma das formas pela qual a resposta imune inata dá início à resposta imune adaptativa. Após o reconhecimento de antígenos e citocinas produzidos pelas células T, os linfócitos B expressam mais moléculas de classe II, aumentando a apresentação de antígenos para as células auxiliares (linfócitos TCD4⁺). Ademais, associado à IL-12, o IFN- γ estimula a diferenciação da resposta Th0 para a Th1, pela presença de microrganismos que ativam DC, macrófagos e NK. Ativada a resposta Th1, ela gera mais IFN- γ , estimulando ainda mais os macrófagos e aumentando a fagocitose e a destruição de microrganismos invasores. Embora seja um antiviral potente, o IFN- γ funciona como um ativador de células efetoras do sistema imune, sendo produzido nas mais diversas situações (LI; HE, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras, protocolo 069/2018. O experimento foi conduzido em propriedade leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, negativa para brucelose, sem histórico da doença no rebanho e com número mínimo de 105 bezerras jovens com idades entre três e oito meses. Os ensaios de avaliação da resposta imunológica celular (cultivo de células, citometria de fluxo e ELISA) foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biologia Celular da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Desenho experimental

Para avaliar e comparar a resposta imunológica celular induzida em fêmeas bovinas vacinadas com as amostras de *B. abortus* B19 e RB51 de três a 8 meses de idade, 105 bezerras foram divididas entre 9 grupos experimentais, como segue:

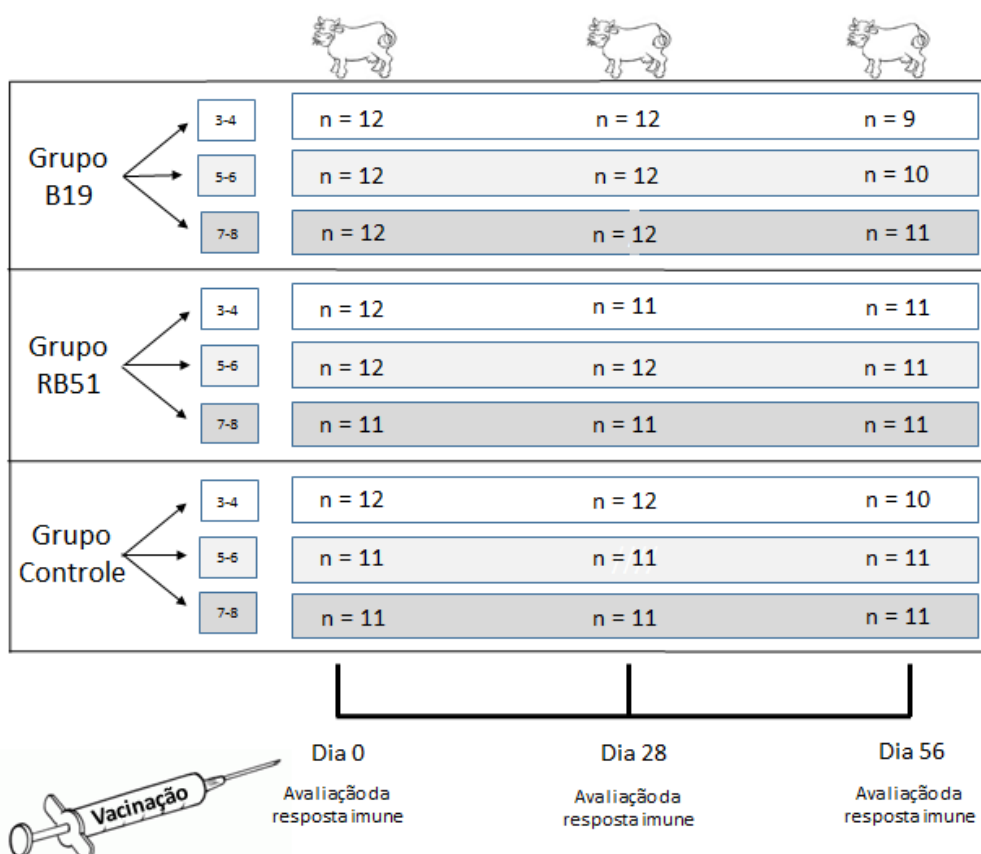
1. Grupo B19 / 3 a 4 meses – 12 bezerras de 3 a 4 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com a vacina viva de *B. abortus* amostra B19.
2. Grupo RB51 / 3 a 4 meses – 12 bezerras de 3 a 4 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com a vacina viva de *B. abortus* amostra RB51.
3. Grupo controle / 3 a 4 meses – 12 bezerras de 3 a 4 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com tampão fosfato salina 0,01 M (PBS 1X) (150 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 9 mM Na₂HPO₄.12H₂O; pH 7,2).
4. Grupo B19 / 5 a 6 meses – 12 bezerras de 5 a 6 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com a vacina viva de *B. abortus* amostra B19.
5. Grupo RB51 / 5 a 6 meses – 12 bezerras de 5 a 6 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com a vacina viva de *B. abortus* amostra RB51.
6. Grupo controle / 5 a 6 meses – 11 bezerras de 5 a 6 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com PBS 1X.
7. Grupo B19 / 7 a 8 meses – 12 bezerras de 7 a 8 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com a vacina viva de *B. abortus* amostra B19.
8. Grupo RB51 / 7 a 8 meses – 11 bezerras de 7 a 8 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com a vacina viva de *B. abortus* amostra RB51.

9. Grupo controle / 7 a 8 meses – 11 bezerras de 7 a 8 meses de idade imunizadas no dia 0 do experimento com PBS 1X.

A vacinação de todos os grupos ocorreu no dia 0 do experimento e os ensaios para avaliar a resposta imunológica induzida por ambas as vacinas foram realizados nos tempos 0, 28 e 56 após a vacinação. Esses dados são apresentados na Figura 1.

A distribuição dos animais de diferentes idades entre os grupos foi aleatória. Os animais de todos os grupos experimentais estiveram sujeitos ao mesmo manejo empregado aos demais animais da propriedade. Para a caracterização da resposta imunológica foram realizados os ensaios de ELISA sanduíche para avaliação da expressão de IFN- γ a partir do sobrenadante de cultura de células e ELISA indireto e 2ME para avaliação da produção de anticorpos anti-*B. abortus* induzidos pela vacinação.

Figura 1 – Desenho experimental



Legenda: Cento e cinco bezerras mestiças com idades entre 3 e 8 meses foram divididos em nove grupos experimentais: três grupos S19, vacinados no dia 0 do experimento (3-4, 5-6 e 7-8 meses); três grupos RB51 vacinados no dia 0 do experimento (3-4, 5-6 e 7-8 meses) e três grupos controle, inoculados com solução salina (0,85%) no dia 0 do experimento (3-4, 5 6 e 7-8 meses). A resposta imune de todos os animais foi avaliada nos dias 0, 28 e 56 do experimento. O número de animais por grupo e em cada dia é mostrado na figura.

3.3 Vacinação

A imunização com B19 foi realizada com a vacina disponível comercialmente, a dose utilizada foi a recomendada pelo PNCEBT de $6,0 \times 10^{10}$ UFC em 2 mL por via subcutânea. Para vacinação com RB51 foi utilizada uma suspensão bacteriana também de uma vacina comercial com $2,1$ a $3,4 \times 10^{10}$ UFC em 2 mL por via subcutânea. Os animais do grupo controle foram inoculados com solução salina a 0,85%. No final do experimento todos os animais do grupo controle foram vacinados com RB51.

3.4 Coleta de sangue

As coletas de sangue periférico para a realização dos ensaios imunológicos foram realizadas por punção venosa da jugular de todos os animais em experimentação. Para avaliação dos efeitos da idade a vacinação a coleta de sangue foi realizada nos dias 0, 28 e 56 após a vacinação. Foram colhidos de cada animal em todos os tempos 21 mL de sangue total em tubos com vácuo contendo heparina sódica e 18 mL em tubos com vácuo para coleta de soro.

3.5 Extração do PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

A partir do sangue periférico foram extraídos os leucócitos mononucleares por centrifugação em gradiente de Ficoll® segundo descrito por Palmer et al. (1997) com algumas modificações. Brevemente, 10 mL do sangue periférico colhido em heparina sódica foram diluídos na proporção 1 : 2 em meio RPMI 1640® e então adicionado lentamente a um tubo de 50 mL de prolipropileno previamente adicionado de 10 mL de Ficoll®. Em seguida, foi realizada a etapa de centrifugação a 2300 rotações por minuto (rpm) por 40 minutos a 18 °C. O anel de células mononucleares formado após a centrifugação foi retirado e lavado três vezes em meio RPMI 1640®, centrifugando a 1400 rpm por 10 minutos a 4 °C entre as lavagens. Após as lavagens a suspensão celular foi ajustada para 1×10^7 células/mL, através da contagem em câmara de Neubauer com solução de Turck na proporção 1 : 20. Para avaliar a expressão de marcadores de superfície em cultura de longa duração de PBMC bovino, as células obtidas na etapa anterior foram cultivadas por 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em placas de 48 poços de fundo chato foi acrescentado 600 µL de meio CMBlast [RPMI 1640® contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 3% de antibiótico e antimicótico (Sigma)], 100 µL da suspensão celular a

1×10^7 células/mL e ainda 100 μ L de *B. abortus* amostra 2308 γ -irradiada ($1,4 \times 10^6$ rads) a $2,24 \times 10^9$ UFC / mL em RPMI 1640[®] contendo 10% de SFB ou 100 μ L de *Phytohemagglutinin A* (PHA) a 40 μ g / mL em RPMI 1640[®] contendo 10% de SFB. O PHA foi usado como controle positivo para o ensaio, para controle negativo os poços foram acrescidos de mais 100 μ L de RPMI 1640[®]. Foram cultivados quatro poços controle e quatro com estimulação antigênica específica para cada animal, e três poços com estímulo PHA por placa, estes com células de animais escolhidos aleatoriamente.

3.6 Expressão de citocinas no sobrenadante de cultura

O sobrenadante recolhido após as 72 horas de cultivo foi utilizado para a dosagem de IFN- γ por kit de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, Fisher Scientific, EUA).

3.7 Detecção de IgGs séricos por meio do I-ELISA

Para detectar anticorpos anti-B19 e anti-RB51, foram utilizados dois tipos de antígenos fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia Aplicada Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os antígenos de *B. abortus* B19 foram usados para testar amostras de soro do grupo B19 e grupo controle e os antígenos RB51 de *B. abortus* foram utilizados para testar amostras de soro do grupo RB51 e controle. A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo Método de Bradford, utilizando-se uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) (BRADFORD, 1976). Todos os ensaios de I-ELISA foram realizados de forma semelhante. Resumidamente, os antígenos foram adsorvidos em placas de poliestireno (Nunc Maxisorp, Thermo Fisher, EUA) a uma concentração de 1,0 μ g / poço em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6, Sigma Aldrich, EUA) a 4 - 8 °C durante a noite. Após cada incubação, as placas foram lavadas três vezes com Tampão fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) pH 7,4 (todos da Merck, Alemanha). As placas foram bloqueadas com PBS-T com 5% de leite em pó desnatado a 37 °C por 1 h. As amostras de soro na diluição 1:50 foram adicionadas aos poços e m duplicata e incubado a 37 °C por 1 h. Após a incubação a 37 °C por 1h com 100 μ L de anticorpo secundário espécie-específico (anti-IgG bovino conjugado com peroxidase – KPL[®]) na diluição 1:5000 em PBS-T, as placas foram novamente lavadas para receber 100 μ L da solução reveladora, KPL SureBlue[™] TMB Microwell

Peroxidase Substrate (SERACARE™ -3,3', 5,5'- Tetrametilbenzidinaperoxidase substrate) por poço. Nesta etapa, a microplaca foi mantida ao abrigo da luz por 5 minutos. Posteriormente, a reação foi bloqueada com 100 µL de KPL TMB Stop Solution (SERACARE™) e a intensidade da cor da reação foi determinada por absorvância em leitor de microplacas (Epoch), com comprimento de onda de 450 nm.

3.8 2-Mercaptoetanol

O teste 2-Mercaptoetanol foi realizado e interpretado de acordo com o manual do PNCEBT (BRASIL, 2006).

3.9 Análise estatística

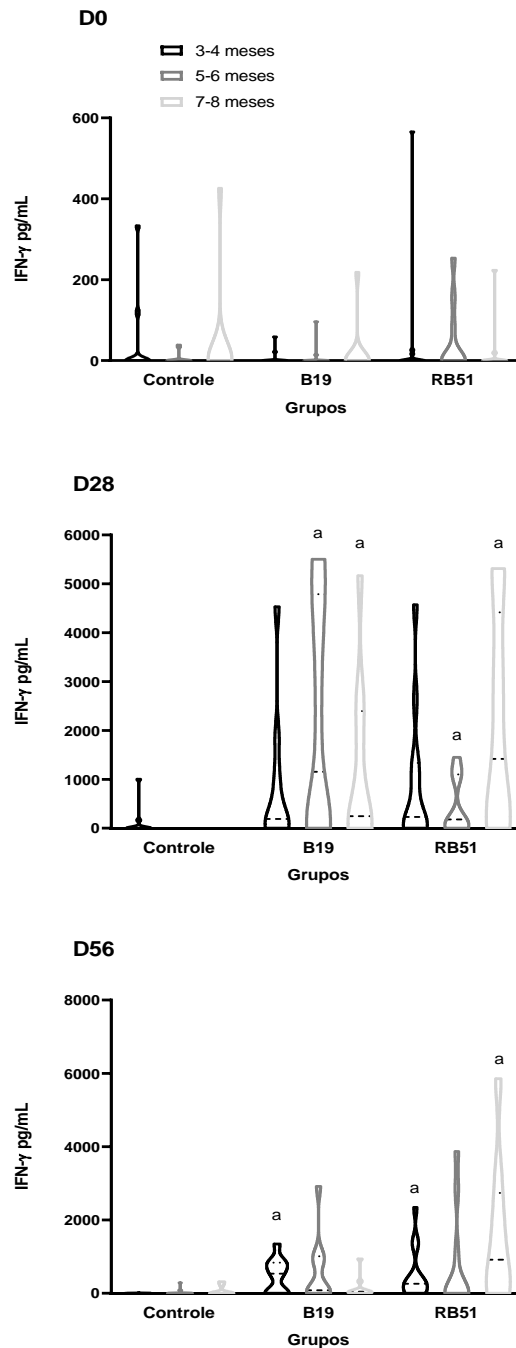
Os dados foram primeiramente testados quanto à normalidade e variância de conjuntos de dados pelo teste Shapiro-Wilk usando o software GraphPad Prism versão 8.1. As diferenças na expressão de citocinas e produção de anticorpos entre os grupos experimentais nos diferentes tempos foram avaliadas por Skillings-Mack seguido por Wilcoxon, enquanto as diferenças entre as idades e vacinas dentro do mesmo dia foram avaliados por Kruskal Wallis seguido por Dunn (Siegel e Castellan, 1988). As análises foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 8.1 (GraphPad Software, EUA). A significância foi definida em todos os casos em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Detecção de IFN- γ por ELISA

Os resultados da produção de IFN- γ pelo PBMC estimulada com *B. abortus* irradiado para os nove grupos nos três períodos analisados estão resumidos na Figura 2. Não houve diferença na produção de IFN- γ na comparação entre os tratamentos (B19, RB51 e controle) ou as idades no dia 0. Da mesma forma, não houve diferença na produção de IFN- γ comparando as idades dentro do mesmo regime de vacinação nos dias 28 e 56. No entanto, no dia 28, na comparação dos tratamentos (B19, RB51 e controle) para a mesma idade, houve diferenças estatísticas para a produção de IFN- γ entre os animais vacinados com B19 e RB51 aos 5-6 e 7-8 meses e os do grupo controle nas mesmas idades. Pelo contrário, no dia 56, a produção de IFN- γ foi significativamente maior apenas nos animais vacinados aos 3-4 meses de idade em comparação com os vacinados com bezerros B19 e RB51 e não vacinados.

Figura 2 – Gráficos *violin plot* mostrando a produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com *B. abortus* 2308 γ -irradiada de bezerros vacinados com animais B19, RB51 ou não vacinados, com idade entre 3 a 8 meses.



Legenda: As diferenças entre as idades dentro do mesmo regime de vacinação foram indicadas em maiúsculas, enquanto as comparações entre os tratamentos (B19, RB51 e controle) na mesma idade foram indicadas em minúsculas. Nos dois casos, as diferenças foram avaliadas por Kruskal Wallis, seguidas pelo pós-teste de Dunn, e a significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

4.2 Ensaio de resposta imune humoral

Os resultados dos testes sorológicos realizados estão resumidos na Tabela 1. Os dados do 2 mercaptoetanol (2-ME) mostraram que todos os animais, independentemente do grupo, eram soronegativos no início do experimento. Além disso, os resultados de 2ME também mostraram que todos os animais vacinados com B19 soroconverteram no dia 28, enquanto o restante permaneceu negativo. No dia 56, apenas os animais dos grupos B19 ainda tinham títulos remanescentes da vacinação.

Os achados do I-ELISA usando antígenos B19 revelaram que apenas os animais vacinados com B19 tiveram aumento nos valores de OD em comparação entre o dia 0 e o dia 28. Da mesma forma, os dados de I-ELISA usando antígenos RB51 mostraram um aumento nos valores de OD apenas para RB51 animais vacinados em comparação com os outros dias com o dia 0, enquanto os bezerros controle exibiram valores OD semelhantes no I-ELISA, usando os antígenos B19 ou RB51 em todos os dias avaliados.

Tabela 2 – Resultados dos testes sorológicos de brucelose realizados nos nove grupos experimentais nos dias 0, 28 e 56.

Tratamento	Idade	OD ^a valores (±) ELISA - antígeno B19			OD valores (±) ELISA - antígeno RB51			2-ME ^b		
		Dia 0	Dia 28	Dia 56	Dia 0	Dia 28	Dia 56	Dia	Dia 28	Dia 56
Controle	3-4	0.00 (± 0)	0.00 (± 0.017)	0.023 (± 0.004)	0.035 (± 0.051)	0.015 (± 0.017)	0.024 (± 0.021)	0	0	0
	5-6	0.00 (± 0.001)	0.003 (± 0.024)	0.002 (± 0.005)	0.015 (± 0.023)	0.031 (± 0.025)	0.038 (± 0.029)	0	0	0
	7-8	0.00 (± 0)	0.001 (± 0.012)	0.002 (± 0.005)	0.007 (± 0.010)	0.022 (± 0.012)	0.004 (± 0.008)	0	0	0
B19	3-4	0 (± 0)	0.0052 (± 0.008)	0.0057 (± 0.009)	NT	NT	NT	0	11/11 (100%)	2/9 (22.22%)
	5-6	0.0016 (± 0.004)	0.0154 (± 0.03)	0.0461 (± 0.054)	NT	NT	NT	0	12/12 (100%)	5/10 (50%)
	7-8	0.0017 (± 0.004)	0.0124 (± 0.021)	0.1359 (± 0.056)	NT	NT	NT	0	11/11 (100%)	8/11 (72.72%)
RB51	3-4	NT ^c	NT	NT	0.0155 (±0.042)	0.0781 (± 0.058)	0.0548 (± 0.051)	0	0	0
	5-6	NT	NT	NT	0 (± 0)	0.0892 (± 0.038)	0.0894 (± 0.052)	0	0	0
	7-8	NT	NT	NT	0 (± 0)	0.0951 (± 0.041)	0.0219 (± 0.016)	0	0	0

^aDensidade optica; ^bTeste 2 mercaptoetanol (2-ME); ^c Não testado

5 DISCUSSÃO

O estado de saúde do rebanho e a criação adequada de novilhas depende em grande parte da condução adequada de um programa de vacinação, o que é especialmente verdadeiro em rebanhos em que as novilhas entram em reprodução ao redor dos 15 meses. Nesse contexto, a determinação da melhor idade para realizar a vacinação contra a brucelose é uma medida importante, tanto para melhorar o controle dessa doença quanto para permitir a otimização das práticas de manejo em rebanhos bovinos, porque, embora a vacinação com RB51 possa ser realizada em qualquer idade, a vacinação de vacas no início da lactação pode levar a excreção da amostra vacinal no leite (MIRANDA *et al.*, 2016). No presente estudo, comparamos a resposta imune celular e humoral de bezerras jovens vacinadas contra brucelose (B19, RB51 e controle) em três idades diferentes, entre 3 a 8 meses. Nossos resultados, parecem indicar que os animais mais velhos respondem mais prontamente à vacinação, enquanto os animais mais jovens levam mais tempo para desenvolver uma resposta caracterizada pela produção de IFN- γ .

A avaliação da produção de IFN- γ por células de bezerros vacinados contra brucelose em diferentes faixas etárias mostrou um resultado muito interessante em relação à cinética de produção dessa citocina, que é fundamental para o controle da brucelose em diferentes espécies (MURPHY *et al.*, 2001; DORNELES *et al.*, 2015a). Animais vacinados aos 5-6 ou 7-8 meses de idade apresentaram uma produção de IFN- γ significativamente maior na comparação do dia 0 com o dia 28, enquanto os bezerros vacinados nos dias 3-4 apresentaram produção tardia significativa dessa citocina, apenas no dia 56, independentemente da vacina contra brucelose utilizada (Figura 2). Esse resultado nos leva a inferir que a produção de IFN- γ estimulada pela vacinação contra brucelose é mais precoce em animais a partir dos 5 meses de idade e que os bezerros vacinados aos 3-4 meses de idade precisam de mais tempo para atingir o pico de produção de IFN- γ em resposta à vacinação. Os animais vacinados jovens podem ter interferências de anticorpos maternos, segundo Plackett e colaboradores (1980), ou ter um sistema imunológico muito imaturo, especialmente células dendríticas, que provavelmente interferem na resposta vacinal adequada (CHASE, 2008). Isso pode levar a uma resposta lenta ou até prejudicada, reduzindo a eficácia vacinal e prejudicando a saúde animal e do rebanho. No total, esses resultados sugerem que a resposta imune celular desencadeada pela vacinação com brucelose ocorre em todas as idades avaliadas, no entanto, a precocidade dessa aquisição

é importante, pois quanto menos tempo o animal estiver desprotegido contra a brucelose, apesar de já ser considerado vacinado, melhor para o animal e para a imunidade do rebanho.

Curiosamente, apenas os animais vacinados com RB51 aos 7-8 meses de idade mantiveram altos níveis de IFN- γ acumulados no sobrenadante celular no dia 56 em comparação com outros tratamentos na mesma idade, o que pode ter ocorrido devido à maior intensidade de resposta a vacinação observada em mais animais da puberdade, explicando a manutenção da produção dessa citocina por mais tempo. De fato, para B19, observa-se que quanto mais velhos os animais são vacinados, maior a intensidade da retenção de anticorpos da vacinação na idade adulta (HERR *et al.*, 1986). Outro fator que ajuda a explicar a produção prolongada de IFN- γ no grupo RB51 é a longa persistência dessa amostra vacinal (até 14 semanas) no linfonodo cervical superficial de animais vacinados (OLSEN, 1999). Além disso, é importante considerar que Manthei (1959) e McDiarmid (1957) constataram que o sucesso da imunização é influenciado por, entre outros fatores, a idade da vacinação, embora tenham observado que a proteção conferida por B19 em bovinos vacinados entre 6 e 8 meses de idade não diminuiu da primeira à quinta gestação.

Os achados da produção de IFN- γ após a vacinação com brucelose do presente estudo são corroborados pelos observados por Tabyenov *et al.* (2014), que encontraram acúmulo significativo de IFN- γ no sobrenadante de células de animais vacinados com B19 quando comparados ao grupo controle, no dia 28 e 56 pós-vacinação. Da mesma forma, Dorneles *et al.* 2015b também demonstrou uma produção significativa de IFN- γ após a vacinação B19 e RB51 em bezerros 28 dias após a imunização.

Em relação aos testes sorológicos, como esperado, todos os animais vacinados com B19 foram positivos no 2ME no dia 28 (Tabela 2), o que mostra soroconversão nesse grupo e valida os demais ensaios imunes realizados neste estudo. No dia 56, a proporção de bezerros positivos no 2ME foi maior nos animais vacinados com B19 aos 7-8 meses de idade, indicando uma resposta mais persistente de anticorpos nos animais vacinados nessa idade. Como os animais vacinados com RB51 não exibem anticorpos detectáveis pelos testes de rotina utilizados para diagnosticar a brucelose bovina, um I-ELISA usando antígenos de RB51 foi usado para verificar a soroconversão dos animais. Este teste também revelou um aumento nos valores de DO (densidade óptica) para todos os bezerros vacinados com RB51, confirmando a soroconversão dos vacinados. Em contraste, nenhum dos bezerros do grupo controle exibiu resposta de anticorpos para *B. abortus*.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que os bezerros vacinados com B19 ou RB51 com mais de 5 meses (5-8 meses) têm produção mais precoce de IFN- γ , em resposta à vacinação, em comparação com os vacinados mais jovens (3-4 meses) e dessa forma, que a vacinação contra brucelose deveria ser preferencialmente realizada em animais acima de 5 meses de idade.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 6^a ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008.
- ALVES, A.J.S. *et al.* Economic analysis of vaccination to control bovine brucellosis in the States of Sao Paulo and Mato Grosso, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 188. p. 351-358, 2015.
- ALTON, G.G. *et al.* Temporal development of protective cell mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. **Journal of Immunology**., v. 143, n. 10, p. 3330-3337, 1989.
- BARQUERO-CALVO, E. *Brucella abortus* uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the Innate Immune System during the Onset of Infection. **PLoS One**. v. 2, n. 7, p. 631, 2007.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, pp. 248-254, 1976.
- BRASIL. Instrução normativa nº 6, de 08 de Janeiro de 2004. Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF]. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: **Protocolo testes diagnósticos para Brucelose**, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/tb-7-diagnostico.pdf>>. Acesso em: 5 de julho de 2019.
- CARON, E. *et al.* Live *Brucella spp.* Fail to Induce Tumor Necrosis Factor Alpha Excretion upon Infection of U937-Derived Fagocytes. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5267-5274, 1994.
- CHASE, C.C.L. *et al.* Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice Special Issues**. v. 24, n. 1, pp. 87-104; 2008.
- CHEVILLE, N.F. *et al.* Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n. 1, p. 1591-1597, 1993.
- CHRISTOPHER, S. *et al.* Brucellosis: Review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. **Journal of Laboratory Physicians**. v.2, n. 1, pp. 55-62. 2010.
- CORBEL, M. J. *et al.* Brucellosis in humans and animals. **World Health Organization. WHO**. Suíça, 2006

CRAWFORD, R.P. *et al.* Epidemiology and surveillance. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, p.131-151, 1990.

DÍAZ-APARÍCIO, E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v. 32, n. 1, pp. 53-60, 2013.

DORNELES, E.M.S. *et al.* Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. **Vaccine**. v.33, n. 1, pp. 3659-3666, 2015a.

DORNELES, E.M.S. *et al.*, Immune Response of Calves Vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and Revaccinated with RB51. **PLoS ONE**. v. 10, n. 9, 2015b.

DORNELES, E.M.S.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A. P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. **Veterinary Research**. v. 46, n. 76, 2015c.

DORNELES, E.M.S. *et al.* T lymphocytes subsets and cytokine pattern induced by vaccination against bovine brucellosis employing S19 calfhood vaccination and adult RB51 revaccination. **Vaccine**. v.32, n. 1, pp. 6034-6038, 2015d.

DORNELES, E.M.S. *et al.* *Brucella abortus* Vaccines: use in control programs and immune response. **Journal of Bacteriology and Mycology**. v.4, n. 1, pp. 1044, 2017.

FERREIRA NETO, J. S. *et al.* Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, pp. 3385, 2016.

GALINSKA, E. M.; ZAGÓRSKI, J. Brucellosis in human – etiology, diagnostics, clinical forms. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 20, n. 2, pp. 233-238, 2013
GOLDING, B. *et al.* Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microb. Infect.**, v. 3, n. 1, pp. 43-48, 2001.

HERR S. *et al.* Brucellosis serology: reduced dose S19 vaccination of yearling heifers versus the use of the standard dose at 5-7 months of age in a clean herd. **Journal of South America Veterinary Association**. v. 5, n. 1, pp.215-9; 1986.

JONES, F.M.; HOOPER, J.A. *Brucella abortus* strain 19 calfhood vaccination – a review. **Southwestern Veterinarian**, v.29, n. 1, p.219-225, 1976.

LAGE, A.P. Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.47, n. 1, pp.99-110, 2005a.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P. Controle da Brucelose Bovina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v.47, n. 1, pp.30-41, 2005b.

LAGE, A.P. *et al.* Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212. 2008.

LI, X.; HE, Y. Caspase-2-dependent dendritic cell death, maturation, and priming of T cells in response to *Brucella abortus* infection. **PlosOne**. v. 7, n. 8, pp. 183-201, 2012.

MANISH, K. *et al.* Brucellosis: an updated review of the disease. **Indian Journal of Animal Science**. v. 83, n. 1, pp. 3-16, 2013.

MANTHEI, C.A. Summary of controlled research with strain 19. **Proceedings of the 63rd Annual Meeting**. USA. v. 1, n. 1, pp. 91-97, 1959.

McDIARMID, A. The degree and duration of immunity in cattle resulting from vaccination with S19 *B. abortus* vaccine and its implication in the future control and eventual eradication of brucellosis. **Veterinary Record**. v. 69, n. 1, pp. 877-879, 1957.

MIRANDA, K.L. *et al.* *Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle. **Acta Tropica**. v. 160, n. 1, pp. 58-61. 2016.

MOREIRA, R. *et al.* Método de Elisa e as suas aplicações em diagnóstico. **Anais do 2 Congresso Internacional de Enfermagem Veterinária**. Viana do Castelo, 2011.

MURPHY, E. A. *et al.* Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. **Immunology**. v. 4, n. 1, pp.511-518, 2001.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances Veterinary Science Comparative Medicine**, v.24, n. 1, p.69-98, 1980.

NIELSEN, K.; Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**. v.90, n. 1, pp.447-459, 2002.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. **Science**. v. 327, n. 1, pp. 1098-1102, 2010

O.I.E. World Organisation for Animal Health. 2016. **Bovine Brucellosis**. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Disponível em: <www.oie.int>. Acessado em 8 de agosto 2018.

OLSEN S. C. *et al.* Response of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. **Research of Veterinary Sciences**. v. 66, n. 1, pp 101-105, 1999.

OLSEN, S.C.; STOFFREGEN, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. **Expert Reviews of Vaccines**. v.4, n. 1, pp. 915-928, 2005.

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

PAPPAS, G. *et al.* The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 6, n. 2, pp. 91-99, 2006.

PASQUALI, P. *et al.* Mouse Cytokine Profiles Associated with *Brucella abortus* RB51 Vaccination or *B. abortus* 2308. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 10, p. 6542-6544, 2001.

PLACKETT, P. *et al.* Failure of a single dose of *Brucella abortus* strain 19 vaccine to protect cattle when given early in calfhood. **Australian Veterinary Journal**. v. 56, n. 1, pp. 409-412, 1980.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucellosis – a systematic revision. **Medicina Interna**. v.10, n.2, 2003.

SANTOS, R.L. *et al.* Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 6, pp. 759-764, 2013.

SCHOLZ, H.C. *et al.* *Brucella vulpis* sp. isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.66, n. 1, pp.2090-2098, 2016.

SCHURIG, G.G. *et al.* Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**. v.28, n. 1, pp.171-188, 1991.

TABYNOV, K. Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins in cattle induced a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection. **Vaccine**. v.32, n. 1, pp.2034-2041. 2014.

WYCOFF, J. H.; POTTS, R. D. Killing of *Brucella* antigen-sensitized macrophages by T lymphocytes in bovine brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 120, n. 3-4, pp. 148-159, 2007.

YOUNG, E. J. An overview of human brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 21, n. 1, pp. 283-290, 1995.