



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba

AVALIAÇÃO DE FRAÇÕES HIDROFÓBICAS E HIDROFÍLICAS DE

***Brucella abortus* EM ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS PARA**

CARACTERIZAR O PERFIL DE ANTICORPOS PRODUZIDOS POR

BOVINOS VACINADOS E NÃO-VACINADOS

UBERLÂNDIA-MG

2006

Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba

**AVALIAÇÃO DE FRAÇÕES HIDROFÓBICAS E HIDROFÍLICAS DE
Brucella abortus EM ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS PARA
CARACTERIZAR O PERFIL DE ANTICORPOS PRODUZIDOS POR
BOVINOS VACINADOS E NÃO-VACINADOS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA-MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

- P151a Pajuaba, Ana Cláudia Arantes Marquez, 1967-
 Avaliação de frações hidrofóbicas e hidrofílicas de *Brucella abortus*
 em ensaios imunoenzimáticos para caracterizar o perfil de anticorpos pro-
 duzidos por bovinos vacinados e não-vacinados / Ana Cláudia Arantes
 Marques Pajuaba. - Uberlândia, 2006.
 64 f. : il.
 Orientador: José Roberto Mineo.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
 ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
 1. Brucelose em bovino - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Univer-
 sidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunolo-
 gia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 619:616.981.42

Aos meus pais, *Vasco Marquez de Andrade e Edna Arantes Marquez*,
pelo exemplo de vida, de dignidade, de respeito e de amor extremo dedicado
em cada dia de suas vidas aos filhos, netos, e estendido à todos os membros da
nossa família.

Ao meu esposo, companheiro, amigo, *Adalberto de A. Pajuaba Neto*,
pelo carinho, incentivo, pela paciência e confiança nos momentos mais
importantes.

Aos meus filhos, *Ana Júlia, João Pedro e Maria Clara*,
que representam o meu grande tesouro, justifico as minhas ausências e a
pouca atenção nesta etapa final.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS,
pelo dom da vida, pela LUZ que está sempre a nos guiar,
pelo AMOR SUPREMO que une todo o universo.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo,
meu orientador e incentivador na área científica, pela confiança, por ter me
recebido acreditando na minha capacidade.

À Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva,
minha amiga e companheira de trabalho, pela amizade, paciência e pelos
ensinamentos valiosos.

Aos meus irmãos, Mônica, Ondina, Maria Vanessa e Alexandre,
pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do Grupo *Apicomplexa*: Janaína, Fernando, Cristina, Celene, Carolina, Taísa, Bellisa, Gabriele, Samantha, Renan, pelo convívio, oportunidade de trabalho em equipe e a aquisição de novos conhecimentos.

Aos colegas da Pós-Graduação: *Camila, Pricilla, Núbia, Rafael, Leandro, Cristiane, Lourenço*, pela amizade e solicitude no transcorrer do curso de Pós-Graduação.

Aos técnicos do laboratório de Imunologia, *Andréa e Júnior*, pela atenção e auxílio na rotina laboratorial.

Aos secretários do curso da Graduação e Pós-graduação de Imunologia e Parasitologia, pela colaboração, atenção e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia, presentes ou ausentes no momento, pela convivência e colaboração.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora.

Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho e a ação.

E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse, um segredo. O de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída”.

(Mahatma Ghandi)

RESUMO

Frações hidrofóbicas e hidrofílicas de *Brucella abortus*, obtidas a partir da extração de lipopolissacarídeos de formas lisas (S-LPS) e por detergente não-aniônico (Triton X-114), respectivamente, foram avaliadas em ensaios imunoenzimáticos com o objetivo de caracterizar o perfil de anticorpos produzidos por bovinos vacinados com *B. abortus* S19 e animais soropositivos não-vacinados. Foram empregados o teste imunoenzimático indireto (iELISA), utilizando-se Proteína A ou anti-IgG bovina marcadas com peroxidase como conjugados, bem como os testes *immunoblot* e *immunoblot*-avidez. Quatro grupos de 15 amostras de soros bovinos previamente analisados por testes tradicionais de aglutinação foram estudados: (I) bovinos soropositivos não vacinados procedentes de área endêmica para *Brucella*; (II) bovinos soropositivos não vacinados procedentes de área não endêmica para *Brucella*; (III) novilhas vacinadas com *B. abortus* S19 e procedentes de área endêmica; e (IV) bovinos soronegativos não vacinados procedentes de área não endêmica. O valor limiar do índice ELISA (IE) para ser considerado como um resultado positivo foi selecionado mediante a análise TG-ROC (*two-graph receiver operating characteristic*). Os testes iELISA foram mais capazes de identificar novilhas vacinadas como animais negativos (87%) em relação aos testes clássicos de aglutinação (13%). Níveis de anticorpos IgG anti-S-LPS de *B. abortus* foram maiores em bovinos não vacinados soropositivos (grupos I e II) quando Proteína A/peroxidase foi empregada, refletindo uma predominância de anticorpos da subclasse IgG2. *Immunoblot*-avidez utilizando a fração hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus* revelou uma significativa queda de reatividade para bandas antigênicas imunodominantes (57, 43 e 35 kDa) reconhecidas por amostras de soros de novilhas vacinadas, refletindo a presença de anticorpos vacinais de baixa avidez para estes marcadores antigênicos. Pode-se concluir que o teste iELISA com S-LPS de *B. abortus* utilizando Proteína A/peroxidase como conjugado demonstrou ser uma importante ferramenta para diferenciar a síntese de anticorpos induzida pela resposta à vacina S19 em comparação com a síntese induzida pela infecção natural, devido à detecção preferencial da subclasse IgG2. Além disso, o perfil de reatividade de anticorpos IgG específicos para *B. abortus* por *immunoblot*-avidez demonstrou que anticorpos vacinais apresentaram baixa avidez para componentes com massa molecular aparente de 57, 43 e 35 kDa, constituindo-se em potenciais marcadores antigênicos para diferenciar bovinos vacinados dos animais com infecção natural.

Palavras-chaves: *Brucella abortus*. iELISA. *Immunoblot*-avidez. Triton X-114. S-LPS. Bovinos.

ABSTRACT

Brucella abortus hydrophobic and hydrophilic fractions obtained from smooth lipopolysaccharide (S-LPS) and Triton X-114 extractions, respectively, were evaluated in immunoassays in order to characterize the antibody response of *B. abortus* S19 vaccinated heifers and non-vaccinated seropositive cows. Indirect enzyme immunoassays (iELISAs) using Protein A or anti-bovine IgG as peroxidase conjugates as well as immunoblot and avidity-immunoblot were used. Four groups with 15 cattle sera each were analyzed: (I) non-vaccinated seropositive cows from *Brucella*-endemic areas; (II) non-vaccinated seropositive cows from *Brucella* non-endemic areas; (III) S19 vaccinated heifers from *Brucella*-endemic areas; and (IV) non-vaccinated seronegative cows from *Brucella* non-endemic areas. Traditional agglutination tests were compared to iELISAs. A threshold ELISA index (EI) value for a result to be considered positive was selected through two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. iELISAs were more able to identify vaccinated heifers as negative animals (87%) in relation to classical agglutination tests (13%). Levels of IgG antibodies to *B. abortus* S-LPS were higher in non-vaccinated seropositive cows (groups I and II) when Protein A/peroxidase was used, reflecting in predominance of IgG2 antibodies. Avidity-immunoblot with *B. abortus* Triton X-114 hydrophilic fraction showed significant reactivity impairment for the immunodominant antigenic bands (57, 43 and 35 kDa) recognized by sera of vaccinated heifers, reflecting in lower vaccinal antibody avidity for such antigenic markers. In conclusion, iELISAs with *B. abortus* S-LPS using Protein A/peroxidase showed to be a potential tool for discriminating S19 vaccinal responses from *B. abortus* infection due to a preferential detection of IgG2 subclasses. Also, *B. abortus*-specific IgG reactivity profile in avidity-immunoblot demonstrated that vaccinal antibodies showed a lower avidity for antigenic components with apparent molecular masses of 57, 43 and 35 kDa, thus representing potential antigenic markers to differentiate vaccinated from naturally infected cattle.

Keywords: *Brucella abortus*. iELISA. Avidity-Immunoblot. Triton X-114. S-LPS. Cattle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Brucelose	11
1.2 Etiologia.....	11
1.3 Composição antigênica de <i>Brucella</i> spp.....	15
1.4 Epidemiologia.....	16
1.5 Aspectos clínico-patológicos	18
1.6 Resposta imune.....	20
1.6.1 Invasão celular.....	20
1.6.2 Resposta imune inata.....	21
1.6.3 Resposta imune adaptativa	22
1.7 Diagnóstico	23
1.7.1 Métodos diretos.....	23
1.7.2 Métodos sorológicos.....	24
1.8 Proteínas ligantes de imunoglobulinas	27
1.9 Avidéz de anticorpos.....	29
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Soros bovinos.....	31
3.2 Antígenos de <i>Brucella abortus</i>	31
3.2.1 Extração de S-LPS de <i>B. abortus</i>	31
3.2.2 Extração de <i>B. abortus</i> por Triton X-114	32
3.3 Dosagem de proteína e de polissacáride dos antígenos de <i>B. abortus</i>	33
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de dodecil de sódio (SDS-PAGE)	33
3.5 Testes sorológicos	34
3.5.1 Testes clássicos de aglutinação	34
3.5.2 Teste imunoenzimático indireto (iELISA).....	35
3.5.3. <i>Immunoblot</i>	35
3.5.4. <i>Immunoblot</i> -avidez.....	36
3.6 Análise estatística	37
3.7 Normas de biossegurança	37

4. RESULTADOS	38
4.1 Dosagem de proteína e de polissacáride dos antígenos de <i>B. abortus</i>	38
4.2 Análise TG-ROC	38
4.3 Testes clássicos de aglutinação e iELISA	40
4.4 iELISAs com conjugados anti-IgG bovina ou Proteína A marcados com peroxidase.....	42
4.5 SDS-PAGE	44
4.6 Immunoblot das frações antigênicas S-LPS e hidrofílica Triton X-114 de <i>B. abortus</i>	46
4.7 Immunoblot-avidez da fração hidrofílica Triton X-114 de <i>B. abortus</i>	48
5. DISCUSSÃO	52
6.CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Brucelose

Brucelose é uma das principais zoonoses de caráter global, sendo considerada uma doença emergente ou re-emergente desde o descobrimento da *Brucella* por Sir Bruce em 1887 (CORBEL, 1997). *Brucella* spp pode infectar uma variedade de mamíferos, causando aborto e infertilidade em animais domésticos e doença debilitante em humanos, podendo persistir intermitentemente por anos (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES-OIE, 2000; GOLDING et al., 2001; LAPAQUE et al., 2005). Por apresentar-se de forma multi-sistêmica em animais e no homem, a infecção inaparente constitui uma importante fonte de transmissão da doença (ACHA; SZYIFRES, 1980), o que acarreta sérios problemas de saúde pública e prejuízos econômicos, tornando os produtos e subprodutos de origem animal vulnerável às barreiras sanitárias e comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (BRASIL, 2004)

A infecção em bovinos, também denominada de aborto infeccioso, é caracterizada por uma resposta inflamatória envolvendo células do sistema monocítico fagocitário e da placenta durante a gestação, resultando em morte e expulsão fetal entre o sexto e oitavo mês de gestação (McGIVEN et al., 2003). Em fêmeas não gestantes, a doença é geralmente assintomática (OIE, 2000). No homem, manifesta-se como uma doença aguda febril (febre ondulante ou febre de Malta) podendo progredir para a forma crônica, produzindo complicações severas em diversos órgãos (OIE, 2000), como também incapacidade parcial ou total para o trabalho (BRASIL, 2004).

Devido ao seu potencial epidêmico, ausência de vacinas para humanos, alguns inconvenientes das vacinas animais disponíveis em termos de segurança e a sua transmissão via aerossol, o gênero *Brucella* é classificado como um patógeno de nível 3 em relação à biossegurança, sendo considerado um potencial agente bioterrorista (KAUFMANN; MELTZER; SCHIMID, 1997).

1.2 Etiologia

Microorganismos do gênero *Brucella*, agente etiológico da brucelose, são alpha-Proteobacteria filogeneticamente relacionados com patógenos de plantas e simbiontes como

Rhizobium e *Agrobacterium*, parasitas intracelulares de animais como *Bartonella* e também com bactérias oportunistas e de vida livre como *Ochrobactrum* e *Caulobacter* (MORENO et al., 1990; VELASCO et al., 2000). Durante as últimas décadas, taxonomistas desenvolveram um sistema de classificação baseado principalmente nas diferenças em patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas, consistindo em seis espécies: *B. melitensis* (cabras e carneiros), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovinos) e *B. canis* (cães), as quais são ainda subdivididas em biovars ou biótipos (MORENO, CLOECKAERT, MORIYÓN, 2002; RAJASHEKARA, 2004). Dentre estes, sete biovars são conhecidos para *B. abortus*, três para *B. melitensis* e cinco para *B. suis*. As outras espécies não foram diferenciadas em biovars, apesar de existirem variantes dentro das cepas (CORBEL, 1997). Recentemente, biótipos que infectam mamíferos marinhos têm sido alocados em um grupo separado designado não oficialmente de *B. maris* (CORBEL, 1997).

Características genéticas e moleculares têm indicado que todos os membros do gênero *Brucella* estão intimamente relacionados e tem sido proposto (mas não aceito pelo Subcomitê de Taxonomia) a classificação de *Brucella* como um gênero mono-específico (*B. melitensis*), no qual as espécies clássicas (*B. abortus*, *B. melitensis*, etc.) seriam biovars (CORBEL, 1997; OIE, 2000; MORENO, CLOECKAERT, MORIYÓN, 2002.). Pelo fato desta nomenclatura não estar totalmente aceita, a classificação tradicional será adotada durante todo o texto (Tabela 1).

Brucella é uma bactéria cocobacilar Gram-negativo, intracelular facultativa ou mais apropriadamente descrita como um patógeno intracelular facultativamente extracelular (GORVEL; MORENO, 2002). É uma bactéria imóvel, não capsulada, medindo 0,6 a 1,5 µm de comprimento por 0,5 a 0,7 µm de largura, catalase e oxidase positivos, não fermentadora de carboidratos e possui variada atividade urease, sendo considerado um microorganismo aeróbico, apesar de algumas espécies necessitarem de atmosfera com CO₂ (5-10%) para seu crescimento (YOUNG, 1995; OIE, 2000). A multiplicação é lenta em temperatura ótima de 37°C e meios enriquecidos são necessários para o seu crescimento (ALTON; FORSYTH, 1996). Em cultivos primários a morfologia da colônia pode ser lisa, na qual o componente de membrana dominante da bactéria é constituído pelo lipopolissacáride (LPS) com a cadeia-O de polissacáride (PS-O), como pode ser observada nas espécies de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae*, ou rugosa (estrita ou variantes mucóides), onde ocorrem poucas unidades da cadeia de PS-O, sendo característica de *B. canis* e *B. ovis* (ALTON; FORSYTH, 1996; CLOECKAERT et al., 1998; OIE, 2000).

As espécies de *Brucella* e seus biovars são diferenciadas por testes de acordo com a sorotipagem, tipificação de fagos, sensibilidade a corantes, requerimentos de CO₂, produção de H₂S e propriedades metabólicas (ALTON et al., 1988; MEYER, 1990; OIE, 2000) como demonstrado na Tabela 1.

As principais espécies patogênicas para os animais são *B. melitensis* (brucelose caprina e ovina), *B. abortus* (brucelose bovina) e *B. suis* (brucelose suína) que causam aborto nos seus hospedeiros, resultando em grandes perdas econômicas (CLOECKAERT et al., 1998). Apesar da relativa adaptação da *Brucella* spp aos seus hospedeiros, este microorganismo possui um potencial zoonótico importante, sendo que as principais espécies que infectam o homem, em ordem crescente de patogenia, são *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis* (HARTIGAN, 1997).

As bactérias do gênero *Brucella*, apesar de permanecerem no ambiente, não se multiplicam nele, sendo moderadamente sensíveis aos fatores ambientais. Entretanto, a sua resistência diminui com o aumento da temperatura e a luz solar direta ou diminuição da umidade relativa do ar. A pasteurização é um método eficiente de destruição de *Brucella* sp, assim como as radiações ionizantes (BRASIL, 2004).

Tabela 1. Características bioquímicas para identificação das espécies e biovars de *Brucella*.

Espécies	Biovar	Requerimento CO ₂	Produção H ₂ S	Crescimento em corantes ^a		Aglutinação em soros ^b		
				Tionina	Fucsina Básica	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^c	+	-	+	+	-	-
	2	+ ^c	+	-	-	+	-	-
	3	+ ^c	+	+		+	-	-
	4	+ ^c	+	-	+	-	+	-
	5	-	-	+	+ ^d	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	±	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	+	+	-	-
	2	-	-	+	- ^e		-	-
	3	-	-	+	-	+	-	-
	4	-	-	+	+	+	+	-
	5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>		-	+	- ^g	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>		+	-	+	- ^e	-	-	+
<i>B. canis</i>		-	-	+	- ^e	-	-	+

^a Concentração do corante, 20 µg/ml em meio dextrose soro (1:50.000).

^b A, antisoro monoespecífico A; M, antisoro monoespecífico M; R, antisoro *Brucella* cepa rugosa.

^c Usualmente positivo em isolamento primário.

^d Algumas cepas isoladas no Canadá, Inglaterra e Estados Unidos não crescem em corantes.

^e Algumas cepas resistentes à fucsina básica foram isoladas na América do Sul e sudeste da Ásia.

^f Negativo para muitas cepas.

^g Crescimento ocorre em 10 µg de tionina (1:100.000)/ml.

Fonte: Modificado de Alton e Forsyth (1996); OIE (2000).

1.3 Composição antigênica de *Brucella* spp

Vários componentes antigênicos de *Brucella* já foram bem caracterizados, sendo que o antígeno imunodominante de superfície é o LPS (CORBEL, 1997), estando relacionado com a morfologia das colônias lisas (S-LPS) como os biovars de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, ou colônias rugosas (R-LPS) características de *B. ovis* e *B. canis* (ALTON et al., 1988; MEYER, 1990; ALTON; FORSYTH, 1996). *B. abortus* possui um LPS peculiar com propriedades e estrutura distintas do LPS de outras enterobactérias, incluindo uma baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação pelos macrófagos e evasão da resposta imune, o que constitui um dos principais mecanismos de virulência e replicação de *Brucella*. (LAPAQUE et al., 2005). Em espécies de fase lisa (S), o S-LPS compreende um lipídeo bifosforilado (lipídeo A) contendo dois tipos de aminoglicoses, formando a matriz da membrana externa e um polissacaríde hidrofílico (PS), mais externamente na bactéria (FREER et al., 1995; CAROFF et al., 2002; CAROFF; KARIBIAN, 2003). O PS consiste de duas regiões distintas: uma cadeia de oligossacarídeo contendo glicose; manose; 2-amino-2,6-dideoxiglicose (quinovosamina); 2-amino-2-deoxiglicose (GlcN); 3-deoxi-D-manose-2-ácido octulosônico (KDO) e açúcares não identificados; e uma cadeia-O compreendendo um homopolímero de aproximadamente 100 resíduos de 4-formamido-4,6-dideoxi-D-manopiranosil (N-formilperosamine), no qual a ligação de cada cinco resíduos na posição α -1,2 caracteriza cepas com epítipo dominante A e na posição α -1,3 cepas com epítipo dominante M (PERRY; BUNDLE, 1990; ROJAS et al., 1994). Esta cadeia está associada ao lipídeo A, o que contrasta com muitos LPS estudados, pois contêm GlcN e 2,3-diamino-2,3-dideoxiglicose (GlcGlcN3N) como cadeias de açúcares, amido e éster ligados à longa cadeia saturada e ácidos graxos hidroxilados (MORENO et al., 1981; CAROFF et al., 1984; ROJAS et al., 1994; CORBEL, 1997).

Cepas que reagem com antisoro para epítipos A e M produzem LPS dos dois tipos em proporções iguais (MINNICK; STIEGLER, 1993). A presença de 4-amino-4,6-dideoximanose no LPS é responsável pela reação antigênica cruzada com *Escherichia hermani* e *Escherichia coli* O:157; *Salmonella* O:30; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Vibrio cholerae* O:31 e *Yersinia enterocolitica* O (PERRY; BUNDLE, 1990). A estrutura do R-LPS é similar ao do S-LPS exceto que a cadeia O está ausente ou reduzida a poucos resíduos na forma R-LPS. A especificidade do R-LPS é determinada pelo seu core de polissacarídeos (CORBEL, 1997).

B. melitensis, *B. abortus* e *B. suis* possuem LPS do tipo liso (S-LPS), com variações na cadeia O, representadas pelos biovars 1 da *B. abortus* e *B. melitensis* que possuem epítomos do tipo A e M, respectivamente (DOUGLAS; PALMER, 1988; BUNDLE et al., 1989; ROJAS et al., 1994). O epítomo comum C é restrito a cepas lisas de *Brucella* e um outro epítomo em comum (C/Y) com *Yersinia enterocolitica* O:9 (DOUGLAS; PALMER, 1988.). Os epítomos AC ou MC não são espécie-específicos, sendo que *B. abortus* sorovares 4, 5 e 9 são sorologicamente MC; *B. melitensis* sorovar 2 possui epítomos AC e *B. melitensis* sorovar 3 é AMC (ALTON et al., 1988).

Proteínas da membrana externa (OMPs) de *Brucella* spp foram identificadas a partir da década de 1980 e classificadas de acordo com a sua massa molecular aparente de 36-28 kDa como proteínas tipo porina do grupo 2, de 31-34 e 25-27 kDa como proteínas do grupo 3 (CLOECKAERT et al., 2002). OMPs e outras proteínas da membrana interna, citoplasmáticas e periplasmáticas têm sido bem caracterizadas durante a infecção, podendo ser utilizadas em testes de diagnóstico (CORBEL, 1997; AL DAHOUK et al., 2006). A análise de proteínas integrais de membranas de *B. melitensis* utilizando o detergente não iônico Triton X-114 confirmou que OMPs de baixo peso molecular como as OMP10, OMP16 e OMP19 são lipoproteínas (TIBOR; DECELLE; LETESSON et al., 1999). Recentemente, as proteínas ribossomais L7/L12 estão sendo pesquisadas como importantes componentes imunológicos por estimularem respostas humoral e celular, conferindo proteção contra *Brucella* (CORBEL, 1997; OLIVEIRA; SOEURT; SPLITTER, 2002).

1.4 Epidemiologia

A brucelose é uma doença infecciosa tanto para animais domésticos como para o homem, mundialmente distribuída, sendo considerada uma das principais zoonoses do mundo, ainda que já tenha sido erradicada em países nórdicos ou esteja controlada como nos EUA, Canadá e vários países da Europa (CORBEL, 1997; OIE, 2000; POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002).

A epidemiologia da brucelose humana tem alterado na última década em decorrência de vários programas sanitários, sócio-econômicos e acordos internacionais, sendo que áreas como a França, Israel, e vários países da América Latina, considerados tradicionalmente como endêmicos, conseguiram controlar a doença, embora novos focos da doença foram confirmados na Ásia Central (PAPPAS et al., 2006). Apesar da brucelose em humana ser uma zoonose antiga com baixa mortalidade como relatada em estudos arqueológicos há mais de

dois mil anos na Antiga Roma (CAPASSO, 2002), mais de 500.000 novos casos anualmente são notificados no mundo (PAPPAS et al., 2006). A verdadeira incidência da brucelose humana permanece desconhecida, refletindo uma vigilância sanitária e epidemiológica ineficaz associada com métodos inadequados de processamento de produtos lácteos e o contato direto ou indireto com animais infectados, assim contribuindo para o risco de contaminação da população (CORBEL, 1997).

A incidência e prevalência da brucelose bovina causada principalmente por *B. abortus* é muito variável entre as diversas regiões geográficas, porém, constitui em um sério problema para as populações rurais dos países do Mediterrâneo, Centro-Oeste da Ásia Ocidental e parte da África e América Latina, onde é considerada endêmica (CORBEL, 1997; YAGUPSKY, 1999). Sua re-emergência em Malta e Oman indica a dificuldade de erradicação desta infecção (AMATO, 1995).

A brucelose bovina causada por *B. abortus* está disseminada por todo o território do Brasil, apesar da escassez de dados relativos à prevalência e distribuição regional, afetando rebanhos leiteiros, de corte e bubalinos (BRASIL, 2004). A estimativa do impacto econômico da doença, realizado em 1971 (BRASIL, 1975), revelou perdas de 32 bilhões anualmente. O último diagnóstico da situação da brucelose bovina no Brasil demonstrou a seguinte soropositividade: 4,1% na Região Norte, 2,5% na Região Nordeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 7,5% na Região Sudeste e 4,0% na Região Sul (BRASIL, 1977). Levantamentos sorológicos realizados por amostragens em alguns estados da Federação revelaram pequenas alterações na prevalência da brucelose, sendo que os dados de notificação oficiais indicam que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% no período entre 1989 e 1998 (BRASIL, 2004).

Dentre os fatores relevantes na prevalência da brucelose, a idade se destaca, sendo mais susceptíveis os animais púberes não vacinados, que podem abortar durante a primeira gestação. As fontes de infecção mais comuns são: água, alimentos, fômites contaminados por material procedente de aborto, podendo também ocorrer transmissão venérea em algumas espécies como cães e suínos (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Não há transmissores nem vetores especiais, sendo os animais doentes os principais reservatórios, eliminando a bactéria pelos fluídos e anexos fetais desprendidos durante o parto ou abortamento e durante todo o puerpério, pelo leite e sêmen (BRASIL, 2004).

Humanos geralmente adquirem a brucelose pelo consumo de leite não pasteurizado e derivado lácteos, sendo a mucosa digestiva a principal via de acesso para *Brucella* spp (OIE, 2000). Pode ocorrer também a penetração percutânea, pelas mucosa nasal e conjuntival ou

pelo contato direto com animais infectados (YOUNG, 1995). Em adição, a brucelose apresenta-se como uma doença de caráter ocupacional, afetando principalmente trabalhadores rurais, veterinários, laboratoristas, manipuladores de carnes, podendo ser veiculada por aerosol (YAGUPSKY, 1999; AL DAHOUK et al., 2006).

1.5 Aspectos clínico-patológicos

Membros do gênero *Brucella* estão muito bem adaptado em seus hospedeiros, possuindo mecanismos patogênicos semelhantes aos dos parasitos intracelulares, ainda que a via de exposição natural varia da orofaringe (*B. abortus* e *B. melitensis*) ao trato genital (*B. suis* e *B. canis*) (ALTON; FORSYTH, 1996; ADAMS, 2002). A origem da diversidade das manifestações clínicas ocasionadas pela infecção por *Brucella* spp, tanto em animais como no homem, não está totalmente esclarecida, sendo os sintomas atribuídos à replicação do patógeno (KO; SPLITTER, 2003).

B. abortus apresenta um tropismo por trofoblastos, pulmão fetal, fagócitos profissionais do sistema monocítico-fagocitário, fagócitos não profissionais, tratos reprodutivos feminino e masculino (OIE, 2000; ADAMS, 2002), sobrevivendo no interior das células do hospedeiro causando uma infecção crônica que pode persistir por toda a vida do animal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION-FAO, 2004). Assim como outros agentes patogênicos intracelulares, bactérias do gênero *Brucella* necessitam de quatro fatores para garantir seu sucesso como microorganismo infeccioso: aderência, invasão, estabelecimento e disseminação dentro do hospedeiro (KO; SPLITTER, 2003). *Brucella*, opsonizada ou não, infecta macrófagos sugerindo que a fagocitose mediada por anticorpos ou complemento, ou mesmo o contato direto do microorganismo com a célula hospedeira permite a aderência e invasão (KO; SPLITTER, 2003).

A diversidade das lesões patológicas em animais domésticos é influenciada por vários fatores: (1) espécie e biovar de *Brucella* spp; (2) imunidade inata e adquirida do hospedeiro em prevenir o estabelecimento da infecção na mucosa através da destruição do agente infectante; (3) via de infecção; (4) dose do inóculo; (5) maturidade sexual; e (6) estágio da gestação (ELBERG et al., 1977; TEMPLETON, 1990). O estabelecimento e a persistência da infecção estão relacionados com a habilidade da bactéria em sobreviver no interior dos fagócitos e na evasão da resposta imune (FAO/WHO, 2000).

Após a invasão da mucosa, no estágio inicial da infecção, a bactéria geralmente se localiza nos linfonodos regionais que drenam o sítio, resultando em hiperplasia do centro

germinativo e hipertrofia acompanhada de linfadenite com infiltração de células inflamatórias (ADAMS, 2002). A bacteremia é caracterizada pela passagem da *Brucella* spp para a circulação sanguínea, podendo variar entre duas a oito semanas, com a disseminação da infecção para outros tecidos como medula óssea, baço, fígado, articulações, cérebro e olhos, sendo freqüentemente isolada nos linfonodos supramamários, ilíacos, útero e leite (BRASIL, 2004). No estágio tardio da infecção, é observada uma linfadenite granulomatosa crônica nos gânglios linfáticos que drenam a glândula mamária e trato reprodutivo (ADAMS, 2002). A glândula mamária geralmente apresenta uma acentuada mastite linfoplasmática (PALMER; CHEVILLE; JENSEN, 1996). Durante os estágios da brucelose, a infecção da glândula mamária tem sido reportada pela transmigração de leucócitos fagocíticos infectados pela *Brucella* da circulação para os sítios de replicação nos alvéolos e ductos mamários (MEADOR; DEYOE; CHEVILLE, 1989), com subsequente migração da glândula mamária para os vasos linfáticos e linfonodos supramamários (ADAMS, 2002).

O tropismo de *Brucella* para os tratos reprodutivos masculino e feminino pode estar relacionado com a produção do eritritol que é um fator estimulante para o crescimento da bactéria, mas não é limitante, visto que *Brucella* também é encontrada no trato reprodutivo de animais com baixo nível deste açúcar (FAO/WHO, 2004).

Na fase aguda da infecção o aborto é observado no último trimestre da gestação. Em bovinos, o aborto ocorre geralmente uma só vez, sendo que a eliminação de *Brucella* pode persistir por meses ou anos, podendo re-ocorrer após um parto normal. Vacas infectadas podem eliminar a bactéria através do colostro e leite (FAO/WHO, 2004). O aborto e expulsão do feto são resultantes da placentite causada por *Brucella*, que após invadir e proliferar nos tecidos uterinos, induz uma reação inflamatória necrosante (endometrite purulenta) e vasculite necrosante caruncular, onde a placenta encontra-se colonizada pela bactéria sofrendo alterações patológicas que culminam com o desprendimento das membranas fetais e resultando na morte e expulsão do feto (ADAMS, 2002). As lesões fetais consistem em broncopneumonia fibrinopurulenta e necrosante, alveolite, linfangite, pleurite, granulomas no fígado, baço, rins e linfonodos (LOPEZ et al., 1984; PALMER; CHEVILLE; JENSEN, 1993). Apesar destas descrições patológicas, o mecanismo preciso do aborto não está completamente elucidado (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993), pois a placenta além de concentrar a bactéria oriunda da circulação materna, também é considerada um sítio privilegiado para a sua multiplicação, o que leva a questionamentos sobre o verdadeiro tropismo de *Brucella* para a placenta (ADAMS, 2002). *B. abortus* pode induzir a produção de altas concentrações de

cortisol com decréscimo nas concentrações de progestágenos e aumento na liberação de estrógeno que ocasiona o parto prematuro (ENRIGH et al., 1984).

Em machos, o sítio de infecção preferencial é o trato reprodutivo e linfonodos associados (ADAMS, 2002). Os achados incluem orquite, epididimite granulomatosa uni ou bilateral e infecção das glândulas sexuais acessórias. Durante a fase aguda da infecção, o sêmen contém elevado número de bactérias e, com a evolução para a fase crônica, diminui a concentração de bactérias excretadas, podendo cessar completamente ou a eliminação torna-se intermitente por vários anos (FAO/WHO, 2004).

O sistema músculo-esquelético pode ser afetado em ambos os sexos, com desenvolvimento de sinovite fibrino-granulomatosa, artrites com erosão articular podendo estar associada com bursite granulomatosa supurativa (BRACEWELL; CORBEL, 1980; JOHNSON et al., 1994).

1.6 Resposta Imune

A imunidade contra *B. abortus* envolve a ativação antígeno-específica de células T CD4⁺ e CD8⁺ em adição à resposta humoral (GOLDING et al., 2001; OLIVEIRA; SOEURT; SPLITTER, 2002), sendo mediada primariamente pela resposta imune do tipo Th1 (ZAHAN; YANG; CHEERS, 1993).

1.6.1 Invasão celular

Durante o curso da infecção, *Brucella* se localiza preferencialmente no nicho intracelular das células hospedeiras, o qual sustenta sua extensiva replicação e subsequente expansão para outras células e órgãos (GORVEL; MORENO, 2002). Em contraste com outras bactérias patogênicas intracelulares, vários fatores de virulência clássicos como exotoxinas, citolisinas, cápsulas, fímbrias, flagelo, plasmídeo, formas de resistência, variações antigênicas, endotoxicidade do LPS ou indutores de apoptose estão ausentes em microorganismos do gênero *Brucella* (MORENO; MORIYÓN, 2001; KO; SPLITTER, 2003). *Brucella* possui genes de virulência que são importantes para a interação patógeno-hospedeiro e produção de fatores de virulência que modificam a fagocitose, a fusão do fagolisossoma, secreção de citocinas e apoptose (GORVEL; MORENO, 2002; MARIA-PILAR et al., 2005), como também para o componente externo da membrana, o LPS (LAPAQUE et al., 2005).

Os principais eventos realizados pela *Brucella* durante sua biogênese na célula infectada iniciam com a sua ligação à membrana da célula hospedeira, invasão e culmina com a

replicação dentro de compartimentos vacuolares (GORVEL; MORENO, 2002). Uma vez que a *Brucella* invade a mucosa, fagócitos profissionais localizados no sítio da infecção realizam a fagocitose tipo *zipper* (GORVEL; MORENO, 2002). Bactérias opsonizadas são internalizadas via receptores para complemento e para Fc de anticorpos presentes em células mononucleares, enquanto que bactérias não opsonizadas penetram em macrófagos via receptores de lectina ou fibronectina (CAMPBELL; ADAMS; SOWA, 1994), receptores tipo Toll-4 que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), mais especificamente o LPS e o lipídeo A (DUÊNAS et al., 2004) ou também como recentemente descrito por Lapaque e colaboradores (2005 e 2006) através de estruturas especiais, encontradas em células eucarióticas, os macrodomínios de membrana para LPS, resistentes a detergente, que segregam vários componentes de *lipid-raft*, proteínas ligantes de LPS e moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo II (MHC-II).

Após a internalização de *Brucella* pelos fagócitos, ocorre um redirecionamento da bactéria para compartimentos membranosos, definido como via endocítica clássica, determinada em parte pela cadeia-O e pelo Lipídeo A do LPS, sendo primeiramente localizada nos endossomos primários, onde a fusão com lisossomos é inibida pela rápida acidificação do fagossomo. Deste modo, *Brucella* se multiplica no autofagossomo e no retículo endoplasmático (KO; SPLITTER, 2003; MARIA-PILAR et al., 2005).

1.6.2 Resposta imune inata

A resposta imune inata representa uma resposta não específica durante o estágio inicial da infecção, com a participação de células *natural killer* (NK), sistema complemento, fagócitos profissionais (macrófagos) e não profissionais (neutrófilos) (KO; SPLITTER, 2003).

B. abortus tem uma habilidade particular para resistir à atividade bactericida do soro não imune, em particular pela ativação deficiente da via alternativa do complemento pelo S-LPS (MORENO; BERMAN; BOETTCHER, 1981). A longa cadeia-O presente no S-LPS bloqueia a deposição de moléculas do sistema complemento na superfície da *Brucella*, limitando a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (LAPAQUE et al., 2005). Em adição ao bloqueio da ativação do complemento, o S-LPS contribui para a sobrevivência da bactéria através da eficiente proteção contra peptídeos catiônicos bactericidas, incluindo defensina NP-2, lactoferrina, lisozimas, polimixina B e ao extrato lisossomal cru extraído de leucócitos polimorfonucleares (LAPAQUE et al., 2005). Durante a infecção, a resistência ao

complemento e à degradação mediada por peptídeos catiônicos, além da proteção contra o reconhecimento de PAMPs pelo hospedeiro, aumenta a sobrevivência da *Brucella* antes de sua localização no nicho intracelular (LAPAQUE et al., 2005).

A citotoxicidade mediada pelas células NK é decorrente da sua ativação em virtude da liberação de citocinas como a interleucina 12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos (APC), ou seja, macrófagos e células dendríticas previamente sensibilizadas com a bactéria. A liberação de IFN- γ pelas células NK e macrófagos efetores influencia o direcionamento da resposta imune adaptativa protetora, ou seja, do tipo Th1 (GOLDING et al., 2001; MARIA-PILAR et al., 2005).

A infecção dos macrófagos gera perturbações na sua fisiologia, estando relacionada com uma estratégia de evasão da ativação do macrófago e da resposta imune pela inibição da secreção de uma das principais citocinas pró-inflamatórias, o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), prevenindo a ativação autócrina e parácrina da atividade microbicida pelos macrófagos infectados (MARIA-PILAR et al., 2005).

1.6.3 Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa é crítica, pois promove uma memória funcional, que é a estratégia utilizada na vacinação. Os mecanismos funcionais da resposta imune adaptativa podem ser classificados resumidamente em: (1) produção de IFN- γ pelos linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e T $\gamma\delta$ que ativa as funções efetoras dos macrófagos e promove a diferenciação da célula Th0 em células Th1; (2) destruição de macrófagos infectados pela citotoxicidade mediada por células TCD8⁺; (3) direcionamento da produção de isotipos de anticorpos do tipo Th1 que são preferencialmente produzidos na resposta humoral contra microorganismos intracelulares e a subsequente opsonização do patógeno, facilitando a fagocitose (GOLDING et al., 2001; BALDWIN, 2002; KO; SPLITTER, 2003).

A maioria das imunoglobulinas presentes no soro de bovinos e bubalinos pertencem ao isotipo IgG (IgG1 e IgG2), seguidas das classes M (IgM) e A (IgA) (BRASIL, 2004). A resposta humoral de bovinos infectados por *B. abortus* ou vacinados com a cepa S19, caracteriza-se pela síntese dos quatro isotipos principais de imunoglobulinas. A resposta sorológica pós-infecção ou vacinação produz uma resposta precoce do isotipo IgM a partir da primeira semana, sendo influenciada pela via de exposição, a dose do inóculo e a resistência do animal (BEH, 1973; ALLAN et al., 1976). A resposta de IgM é imediatamente seguida

pela produção de anticorpos IgG1 e mais tardiamente, pelos isotipos IgG2 e IgA em menor proporção (BEH, 1973; ALLAN et al., 1976; NIELSEN et al., 1984). Anticorpos da classe IgM são menos específicos (SAERGERMAN et al., 2004). Entretanto, outros autores têm relatado que os títulos sorológicos totais de IgG₁ e IgG₂ são aproximadamente iguais e geralmente permanecem altos em ruminantes adultos, apesar de consideráveis variações dependentes de fatores genéticos, patológicos e fisiológicos, como na gestação, onde pode ter uma queda dos títulos imediatamente antes ou após o parto (LEVIEUX, 1990). A meia-vida da IgG total é maior que a da IgA e IgM com valores de 14 dias e 20 dias para IgG₁ e IgG₂, respectivamente (LEVIEUX, 1990). A concentração de IgG₂ aumenta com a idade e com o nível de exposição antigênica, no caso da brucelose (FAO/WHO, 1986). Assim, o monitoramento dos níveis de IgG1 e IgG2 anti-*Brucella* torna-se relevante para a detecção de animais infectados (LAWMAN et al., 1986).

A observação por períodos prolongados da resposta humoral em animais infectados demonstra que há um decréscimo dos níveis de IgM, enquanto que os de IgG1 permanecem altos, praticamente inalterados (BRASIL, 2004). Em fêmeas vacinadas até 8 meses de idade com S19, o nível de anticorpos decresce rapidamente, atingindo títulos inferiores a 25 UI depois de 12 meses. Por outro lado, se a vacinação for realizada acima de 8 meses de idade, os títulos vacinais tendem a permanecer elevados por mais tempo, podendo gerar reações falso-positivas nos testes indiretos de diagnóstico (BRASIL, 2004).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da brucelose em bovinos e humanos é difícil de estabelecer, devido ao tempo de incubação variável e a ausência de sinais clínicos, a não ser o aborto em bovinos (CAROFF et al., 1984; McGIVEN et al., 2003). O largo espectro das manifestações clínicas mimetizando outras condições infecciosas ou não infecciosas (YAGUPSKY, 1999) contribui para a utilização e o aprimoramento das ferramentas de diagnóstico laboratorial, seja pelo emprego de métodos diretos de identificação do agente patogênico ou através de métodos indiretos, como os vários testes sorológicos para pesquisa de anticorpos.

1.7.1 Métodos diretos

A brucelose pode ser diagnosticada definitivamente através do isolamento microbiológico do agente infectante, sendo que o resultado é considerado como padrão ouro

(*Gold Standard*) para o diagnóstico definitivo da brucelose e comparação com outros testes. De acordo com a OIE (2000), as amostras para o exame microbiológico podem ser obtidas a partir de fetos abortados (conteúdo estomacal, fígado, pulmão), cotilédones placentários, secreção vaginal, tecidos fetais, fluidos de artrite ou higromas, leite e colostro. Amostras de tecidos coletadas *post-mortem* devem ser preferencialmente correlacionadas com o sistema retículo-endotelial (baço e linfonodos satélites da região cervical, glândula mamária e aparelho reprodutivo), útero de fêmeas no final da gestação ou pós-parição e úbere.

Em meio de cultura, as colônias típicas de *Brucella* desenvolvem-se lentamente e insidiosamente, possuindo um diâmetro usualmente de 0,5-1,0 mm, são rasas, convexas, com bordas inteiras. As colônias rugosas são brilhantes, com coloração amarelo-pálido. As colônias rugosas possuem tamanho e forma similares às das lisas, sendo menos transparentes (OIE, 2000).

A reação de imunohistoquímica realizada em material de aborto ou secreção vaginal confere uma evidência presuntiva da brucelose, podendo ser confirmada por cultura (OIE, 2000).

A técnica de análise de segmentos do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é baseada em *primers* específicos para *Brucella* e apresenta alta sensibilidade e especificidade na identificação de *B. abortus*. Entretanto, é pouco utilizada, pois requer equipamentos específicos, técnicos capacitados e tem custo elevado (BRASIL, 2004).

1.7.2 Métodos sorológicos

Devido às exigências para o cultivo da *Brucella*, baixa sensibilidade e longo tempo requerido para o isolamento e identificação microbiológica, o diagnóstico da brucelose é baseado principalmente em métodos sorológicos (YAGUPSKY, 1999; OIE, 2000; NIELSEN, 2002; AL DAHOUK et al., 2006). As técnicas sorológicas são o suporte para o diagnóstico e para programas de controle em massa, sendo que os principais testes para diagnóstico sorológico para *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* são baseados na detecção de anticorpos contra o antígeno LPS, direcionados principalmente contra o epítipo imunodominante PS-O de cepas lisas de *Brucella* (McGIVEN et al., 2003). Apesar de o LPS provocar uma forte resposta humoral, as preparações antigênicas obtidas a partir do LPS possuem algumas desvantagens como as reações falso-positivas ocasionadas pela reatividade cruzada com LPS de outras bactérias e reações falso-negativas devido ao efeito pró-zona (OIE, 2000; CASSATARO et al, 2004).

A maioria dos países com programas para controle e erradicação da brucelose, inclusive o Brasil, emprega testes sorológicos com dois objetivos principais: (1) provas de triagem, onde se empregam testes com alta sensibilidade e (2) provas comprobatórias buscando uma melhor especificidade (BRASIL, 2004).

As técnicas tradicionais e bem documentadas para o diagnóstico sorológico incluem os testes de aglutinação, fixação de complemento e ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) que utilizam preparações com células totais, extratos sonicados ou frações de LPS, sendo que proteínas de membrana externa e proteínas citoplasmáticas são alvo de pesquisas como ferramentas de diagnóstico (CORBEL, 1997; NIELSEN, 2002; MCGIVEN et al., 2003; AL DAHOUK et al, 2006). Estas preparações antigênicas são freqüentemente obtidas a partir de cepas lisas (S) de *B. abortus* ricas em S-LPS (AL DAHOUK et al., 2003).

Desde 1887, um número considerável de testes para o diagnóstico sorológico da brucelose tem sido desenvolvido, sendo que vários sofreram alterações para uma melhor aplicabilidade (NIELSEN, 2002). Dentre os testes padronizados e utilizados mundialmente, destacam-se:

a) Testes de Aglutinação:

► **Teste de aglutinação do soro em tubos (SAT):** é a prova mais antiga, sendo ainda utilizada em muitos países como teste de monitoramento ou triagem e em programas de controle da brucelose bovina, apesar de não ser recomendada como teste de diagnóstico para trânsito internacional de bovinos devido à grande ocorrência de resultados falso-positivos por reações cruzadas (OIE, 2000). O teste pode ser realizado em tubos ou em microplacas, consistindo da adição do antígeno (suspensão bacteriana em salina fenolada) em diferentes diluições de amostras de soros. A mistura é incubada, sendo um grau de aglutinação acima de 30 UI é considerado um resultado positivo (OIE, 2000).

► **Teste do Antígeno Acidificado Tamponado:** dentre as provas que empregam antígenos acidificados tamponados (pH 3,65) que previnem a aglutinação de anticorpos do isotipo IgM, reduzindo as reações inespecíficas, dois testes são comumente utilizados: o teste rosa bengala/card test (RBT/CT) e o teste de aglutinação em placa com antígeno tamponado (BPAT). Ambos os testes empregam *B. abortus* S1119-3 e para o RBT pode-se utilizar também a cepa S99. Os testes com antígeno acidificado são muito sensíveis e de fácil realização sendo empregados para a triagem de animais. Reações positivas devem ser investigadas com testes confirmatórios mais

específicos. Podem ocorrer reações falso-negativas devido ao efeito prozona como também reações falso-positivas pela reatividade cruzada com LPS de outras bactérias Gram negativas e anticorpos residuais vacinais S19.

► **Prova do Anel em Leite:** é um teste de aglutinação adaptado, utilizado em animais em lactação, onde a suspensão de antígeno corada com hematoxilina pode ser aplicada em amostras de leite, sendo um teste recomendado para triagem de rebanho (OIE, 2000). Este teste está sujeito a interpretações duvidosas visto que alterações na composição normal do leite, como mastite, colostro e início ou fim da lactação interferem com o resultado (NIELSEN, 2002).

► **Prova de aglutinação com agentes redutores (SAT/2-Mercaptoetanol):** o princípio do teste se traduz pelo uso de agentes que reduzem a IgM em unidades monoméricas, diminuindo sua habilidade de aglutinação (NIELSEN, 2002). É uma prova quantitativa seletiva sendo utilizada como teste confirmatório, mas sua principal desvantagem se relaciona à toxicidade do 2-mercaptoetanol (NICOLETTI, 1969).

b) Teste de Fixação do Complemento (CFT): é um teste de diagnóstico mundialmente utilizado e aceito como teste confirmatório, inclusive para trânsito internacional de animais (OIE, 2000). Apesar de ser um teste altamente sensível, vários fatores desencorajam o seu uso, pois é um exame complexo e requer laboratórios bem equipados e adequada equipe técnica para a realização das titulações e manutenção dos reagentes (OIE, 2000). O teste está sujeito à interferência das reações de anti-complementariedade e amostras hemolisadas não podem ser utilizadas (McGIVEN et al., 2003).

c) Ensaios Imunoenzimáticos:

► **Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA):** numerosas variações deste teste, empregando diferentes preparações antigênicas, conjugados enzimáticos e substratos/cromógenos estão descritos na literatura (OIE, 2000), sendo que vários *kits* estão comercialmente disponíveis e validados. Entretanto, os protocolos mais comumente realizados utilizam o antígeno S-LPS como agente sensibilizante para adsorção nas placas de microtitulação de poliestireno (NIELSEN, 2002). Uma das desvantagens deste teste é sua incapacidade em diferenciar anticorpos vacinais

resultantes de *Brucella* S19 dos anticorpos induzidos por cepas patogênicas, apesar de sua alta sensibilidade, sendo portanto, considerado mais um teste de triagem do que confirmatório, principalmente para animais vacinados ou rebanhos afetados por problemas de reações falso-positivas (OIE, 2000).

► **Ensaio Imunoenzimático Competitivo (cELISA):** este ensaio foi desenvolvido com o objetivo de reduzir as reações decorrentes de anticorpos residuais vacinais, já que o iELISA não possui esta especificidade (OIE, 2000; NIELSEN, 2002). O cELISA utiliza anticorpos monoclonais específicos para um dos epítomos da molécula PS-O de *B. abortus*, sendo que o princípio do ensaio se baseia na inibição da ligação de anticorpos vacinais, mas não de anticorpos provenientes de cepas infectantes, através da ligação do anticorpo monoclonal ao antígeno adsorvido na placa de microtitulação (OIE, 2000; NIELSEN, 2002).

d) Teste de Polarização de Fluorescência (FPA): este teste é baseado no fato que uma molécula em solução apresenta uma rotação randômica inversamente proporcional ao seu tamanho (NIELSEN, 2002). Assim, a velocidade de rotação de uma molécula pequena é maior quando comparada a uma molécula de maior peso molecular. Se uma molécula é marcada com um fluorocromo, o tempo de rotação através de um ângulo de 68,5° pode ser determinado pela mensuração da intensidade de polarização da luz em planos vertical e horizontal (OIE, 2000; McGIVEN et al., 2003). Desta forma, a rotação de uma molécula antigênica de PS-O de *Brucella* conjugada com fluorocromo poderá ser mais lenta com a ligação de anticorpos anti-LPS de *Brucella*, determinando assim a quantidade de anticorpos em amostras de soro, sangue ou leite (McGIVEN et al., 2003).

1.8 Proteínas ligantes de imunoglobulinas

Bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* do grupo Cowan e *Streptococcus* spp dos grupos C e G sintetizam proteínas com diferentes capacidades de ligação não-específica ao domínio constante 3 (CH3) da cadeia pesada de moléculas de imunoglobulinas de várias espécies (NIELSEN et al., 2004). Proteína A é uma molécula com peso molecular de 42 kDa, produzida naturalmente por *S. aureus*, e foi encontrada associada a anticorpos no soro humano (JENSEN, 1958). Devido à grande quantidade de IgG no soro

humano capaz de se ligar a esta proteína, foi demonstrado que o tipo de ligação existente no complexo Proteína A-IgG era uma interação não-específica e não uma reação antígeno-anticorpo (FORSGREN; SJOQUEST, 1966). Por outro lado, Proteína G é também uma molécula ligante de imunoglobulinas, de peso molecular de 30 kDa, mas possui algumas particularidades de ligações diferentes da Proteína A. A atividade de ligação de imunoglobulinas de diferentes espécies às proteínas bacterianas A e G estão sumarizadas na Tabela 2.

As proteínas ligantes de imunoglobulinas como Proteína A, Proteína G ou proteína recombinante A/G marcadas com peroxidase têm sido utilizadas como importantes ferramentas nos ensaios de ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Brucella* em várias espécies de animais (NIELSEN et al., 2004). Enquanto Proteína G reage com ambas as subclasses de IgG bovinas (IgG1 e IgG2), Proteína A reage mais especificamente com a subclasse IgG2, sendo que durante a infecção por *B. abortus* a concentração total de IgG2 anti-*Brucella* aumenta com o nível de exposição antigênica (SAEGERMAN et al., 2004). Assim, o monitoramento dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 anti-*Brucella* é relevante para a detecção de bovinos infectados por *Brucella* (LAWMAN et al., 1986).

Tabela 2. Reatividade da Proteína A, Proteína G e Proteína recombinante A/G com a porção Fc da imunoglobulina IgG de várias espécies.

Espécies		Proteína A	Proteína G	Proteína A/G
Homem		+	+	+
Camundongo		+	Fraco	+
Rato		-	-	-
Galinha		-	-	-
Macaco		+	+	+
Coelho		+	+	+
Cobaio		+	+	+
Porco		+	+	+
Bovino	IgG1	-	+	+
	IgG2	+	+	+
Cão		+	-	+
Gato		+	-	+
Cavalo		-	+	+
Cabra		-	+	+
Carneiro		-	+	+

Fonte: Adaptado de: Richman et al.(1982) e Sikhema (1989)

1.9 Avidéz de Anticorpos

A força da ligação antígeno-anticorpo é denominada afinidade do anticorpo, sendo resultado da somatória das forças de atração e repulsão intermoleculares. A força com que um anticorpo multivalente liga-se a um antígeno multivalente é conhecida como avidéz, que é dependente da afinidade dos sítios combinatórios individuais para os determinantes antigênicos. Durante uma resposta imune, o processo de maturação de anticorpos IgG é acompanhado pelo aumento de sua afinidade em consequência de mutações ocorridas nas regiões variáveis da molécula (THOMAS; MORGAN-CAPNER, 1991).

As técnicas para a avaliação da avidéz de anticorpos IgG específicos em várias infecções se baseiam na maior ou menor facilidade com que os anticorpos são dissociados de complexos antigênicos específicos, podendo ser realizada através de diferentes métodos, tais como: aglutinação, radioimunoensaio, fixação de complemento, ELISA, imunofluorescência, *immunoblotting*, onde agentes desnaturantes (como uréia, por exemplo) adicionados após a formação do complexo antígeno-anticorpo, são capazes de dissociar anticorpos de baixa avidéz (GUTIERREZ; MAROTO, 1996).

Os anticorpos de baixa avidéz são produzidos durante os estágios iniciais das infecções, e os de alta avidéz, na fase crônica ou latente (THOMAS; MORGAN-CAPNER, 1991). Desta forma, a determinação da avidéz de anticorpos IgG específicos vem sendo proposta com o intuito de investigar o tempo de vigência da infecção primária e distinguir entre infecção recente e crônica em várias doenças, como toxoplasmose (KORHONEN et al., 1999) e neosporose (AGUADO-MARTINEZ et al., 2005), bem como na brucelose humana (GUTIERREZ; MAROTO, 1996; KUTIU et al., 2003), demonstrando que anticorpos com alta avidéz seriam úteis para a eliminação de uma infecção recente. Entretanto, ensaios de avidéz para brucelose bovina, particularmente com ênfase na diferenciação entre bovinos vacinados de bovinos infectados, não foram ainda avaliados, tendo somente sido relatado que anticorpos de menor afinidade podem estar presentes em bovinos vacinados com a cepa *Brucella* S19 (NIELSEN et al., 2004). A vacinação induz anticorpos de menor afinidade devido ao menor tempo de exposição ao antígeno vacinal por eliminação imune durante o processo de vacinação quando comparada à infecção natural, na qual o antígeno é persistente resultando em uma afinidade de anticorpo aumentada (MACMILLAN et al., 1990; NIELSEN et al., 2004). Desta forma, ensaios medindo a avidéz de anticorpos IgG anti-*B. abortus* podem auxiliar no diagnóstico diferencial entre anticorpos vacinais residuais e anticorpos procedentes de infecção natural.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade da fração hidrofóbica enriquecida de S-LPS e da fração hidrofílica obtida pela extração com o detergente aniônico Triton X-114 de *B. abortus* em ensaios imunoenzimáticos (ELISA indireto, *immunoblot* e *immunoblot*-avidez) para caracterização do perfil de anticorpos séricos produzidos por bovinos vacinados com S19 e por animais soropositivos não vacinados.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos antigênicos derivados de *B. abortus* pelo método fenol-água aquecido (fração S-LPS) e pela extração com o detergente aniônico Triton X-114.
- Padronizar ensaios imunoenzimáticos indiretos (iELISA) utilizando como conjugados enzimáticos a Proteína A e anti-IgG bovina marcadas com peroxidase para a detecção de níveis de anticorpos IgG anti-*B. abortus* em soros de bovinos vacinados e não vacinados.
- Identificar frações antigênicas dos diferentes extratos por *Immunoblot* que são reconhecidas por anticorpos IgG anti-*B. abortus* em soros de bovinos vacinados e não vacinados.
- Verificar a avidez de anticorpos IgG anti-*B. abortus* em amostras de soros bovinos vacinados e não vacinados por *immunoblot*-avidez.
- Identificar componentes antigênicos de *B. abortus* como potenciais marcadores antigênicos para diferenciar bovinos vacinados de não vacinados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soros bovinos

Soros de quatro grupos de animais foram obtidos como segue:

- Grupo I: vacas soropositivas não vacinadas (n=15) procedentes de áreas endêmicas para *Brucella* (Estado de Minas Gerais, Brasil);
- Grupo II: vacas soropositivas não vacinadas (n=15) procedentes de área não endêmica para *Brucella*, onde a vacinação com S19 não tem sido praticada (Estado de Santa Catarina, Brasil);
- Grupo III: novilhas vacinadas (n=15) entre 3 e 8 meses de idade e procedentes de áreas endêmicas para *Brucella*, mais sem antecedentes da doença (Estado de Minas Gerais, Brasil);
- Grupo IV: vacas soronegativas não vacinadas (n=15) procedentes de área não endêmica para *Brucella*, onde a vacinação com S19 não tem sido praticada (Estado de Santa Catarina, Brasil).

Todos os soros dos grupos I e II foram positivos para os testes clássicos de diagnóstico, como o teste rosa bengala (RBT) ou teste de aglutinação do soro em tubos com agente redutor 2-mercaptoetanol (SAT/2ME). Soros do grupo III foram coletados 90 dias após a vacinação e foram positivos para os testes RBT ou SAT/2ME. Soros do grupo IV foram negativos para ambos os testes.

Soros do grupo I foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO, Pedro Leopoldo, MG, Brasil) e os soros dos grupos II e IV foram fornecidos pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (Brasil).

3.2 Antígenos de *B. abortus*

3.2.1 Extração de S-LPS

LPS do tipo liso (S-LPS) de *B. abortus* cepa S19 (Vallée S/A Produtos Veterinários, Montes Claros, MG, Brasil), foi extraído pelo método aquecido fenol-água (OIE, 2000). Em resumo, bactérias liofilizadas (1,0 g) foram suspensas em água destilada a 66°C seguido da adição (v/v) de fenol a 90% à mesma temperatura. Após agitação contínua por 30 minutos, a mistura foi resfriada e centrifugada a 10,000 x *g* a 4°C por 10 minutos para obtenção de duas

camadas, uma de água e outra mais amarronzada de fenol. A camada de fenol foi coletada e filtrada em papel de filtro Whatman número 1 para remoção dos restos celulares, sendo então, adicionado 80 mL de solução de metanol fria contendo 1% de acetato de sódio saturado. Após incubação por 2 horas a 4°C, o precipitado foi recuperado por centrifugação (10,000 x *g* a 4°C por 10 minutos), ressuspenso em água destilada e submetido à agitação durante 18 horas a 4°C. Após novo ciclo de centrifugação, o sobrenadante (S-LPS solubilizado) foi coletado e armazenado a 4°C. O sedimento foi novamente ressuspenso em água destilada, sendo realizado um segundo ciclo de solubilização, onde o sobrenadante foi coletado e acrescido do S-LPS obtido no primeiro ciclo (S-LPS). A seguir, 5% de ácido tricloracético foi adicionado ao S-LPS bruto seguido por incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi removido por centrifugação e o sobrenadante translúcido foi dialisado contra água destilada (quatro trocas durante 48 horas a 4°C) e subsequentemente liofilizado. Uma solução estoque de 1 mg/mL (w/v) foi preparada e armazenada a -20°C, sendo analisada quanto à concentração de proteínas e de polissacarídes para posterior utilização como extrato antigênico nas reações de ELISA e *Immunoblot*.

3.2.2 Extração de *B. abortus* por Triton X-114

Frações antigênicas de *B. abortus* S19 foram obtidas mediante extração pelo detergente não iônico Triton X-114 como descrito por Scott e colaboradores (1987,) com as adaptações a seguir. Bactérias liofilizadas (1,0 g) foram suspensas em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M (PBS, pH 7,2) e inativadas pelo calor (66°C por 1 hora). Após três ciclos de lavagens por centrifugação em PBS, o sedimento foi ressuspenso em solução de Tris-EDTA (20 mM Tris-HCl (pH 8.0) e 10 mM ácido etilenodiaminotetraacético [EDTA]). O material foi submetido a dez ciclos de criólise e processado por seis ciclos de sonicação em banho de gelo. O detergente Triton X-114 foi usado na concentração de 2% para solubilizar membranas e células totais (BORDIER, 1981; TIBOR; DECELLE; LETESSON, 1999). Após incubação por 5 minutos a -20°C, os restos celulares foram removidos por centrifugação. O sobrenadante foi aquecido a 37°C durante 5 minutos para permitir a separação de fases seguindo de centrifugação a 13,000 x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente. A camada superior ou sobrenadante representa a fase aquosa (hidrofílica) e a inferior ou o sedimento, a fase detergente (hidrofóbica). A fase aquosa sofreu novo ciclo de purificação pela adição de Triton X-114 na concentração final de 2%, sendo então adicionada à fase detergente. Após a dissolução do surfactante a -20°C, a mistura foi incubada a 37°C por 5 minutos e centrifugada

como anteriormente descrito. A fase detergente foi reservada. A fase aquosa foi separada em outro tubo, sendo então processado o terceiro ciclo de purificação e a fase detergente desta última condensação foi descartada. A seguir, para a concentração de proteínas nas duas fases (aquosa e detergente), 2 volumes de acetona a -20°C foram adicionados e a mistura foi incubada por 18 horas a 4°C (SARKARI; CHANCE; HOMMEL, 2002). Após centrifugação a $1,500 \times g$ a 4°C por 15 minutos, os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de salina tamponada com Tris 20 mM (TBS) e armazenados a -20°C . As frações foram determinadas quanto à concentração de proteínas e de polissacarídes para posterior utilização como extratos antigênicos nas reações de *Immunoblot*.

3.3. Dosagem de proteína e de polissacaríde dos antígenos de *B. abortus*

Após a obtenção da fração rica em S-LPS pelo método fenol-ácido tricloroacético e das frações hidrofílicas e hidrofóbicas por Triton X-114 de *B. abortus*, a concentração protéica destes extratos antigênicos foi determinada de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se a soroalbumina bovina (Sigma Chemical Co., EUA) para a curva de referência. Foi também realizada a dosagem de polissacarídes para todas as frações antigênicas, empregando-se o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de dodecil de sódio (SDS-PAGE)

As frações S-LPS (9,0 μg) e Triton X-114 (6,16 μg) de *B. abortus* foram solubilizadas em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%), aquecidas a 100°C durante 3 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 15% e 12%, respectivamente, com gel de empilhamento a 5%, em condições desnaturantes e não-redutoras segundo Laemmli (1970). Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Sistema Hoefer Mighty Small, San Francisco, EUA).

Volumes de 10 μL de cada fração antigênica foram aplicados em paralelo com padrões de marcadores moleculares (Sigma Chemical Co., EUA) e o gel foi submetido a uma corrente de 20 mA por 1 hora. Após a separação eletroforética, o gel foi corado com nitrato de prata (BLUM et al., 1987) ou eletroforéticamente transferido para membranas de nitrocelulose,

utilizando um sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Suécia) por 2 horas como previamente descrito (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

3.5. Testes sorológicos

3.5.1 Testes clássicos de aglutinação

Os testes clássicos de aglutinação foram realizados como anteriormente descrito (OIE, 2000; BRASIL, 2004), sendo os antígenos produzidos de acordo com os procedimentos padronizados (ALTON et al., 1988) e gentilmente fornecidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), Brasil.

- *Teste de Rosa Bengala (RBT)*: 30 µL de amostras de soro bovino foram dispensados sobre uma área delimitada de 4 cm de placa de vidro e, em seguida, acrescido o mesmo volume de antígeno (*B. abortus* S1119-3) corado com rosa bengala e tamponado (pH 3,63). Após um período de 4 minutos de agitação lenta, foi considerado como resultado positivo, qualquer grau de aglutinação (OIE, 2000; BRASIL, 2004).
- *Teste de aglutinação do soro em tubos com 2-mercaptoetanol (SAT/2ME)*: o antígeno consiste de uma suspensão de *B. abortus* S11193 em solução salina (NaCl 0,85%), sendo que o teste é realizado em duas diferentes séries com diluições duplas seriadas do soro (1:25, 1:50, 1:100 e 1:200): a primeira série é chamada de soroaglutinação lenta em tubos ou SAT, e a segunda de SAT/2ME devido à utilização do agente redutor 2-mercaptoetanol (2ME). Nos tubos correspondendo à primeira série (SAT) contendo os soros previamente diluídos, foram adicionados 2,0 mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de bactérias) em solução salina contendo fenol a 0,5% (v/v). Nos tubos da segunda série (SAT/2ME) adicionou-se 1,0 mL de solução salina contendo 2ME 0,1 M. Os tubos foram agitados e as amostras ficaram em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 1,0 mL do antígeno diluído 1:50 (0,09% de bactérias) em solução salina aos tubos da série SAT/2ME. Procedeu-se à agitação dos tubos e as duas séries foram incubadas a 37°C por 48 horas. Um título de aglutinação ≥ 25 para as séries SAT e SAT/2ME foi consid

3.5.2 Teste imunoenzimático indireto (iELISA)

O teste iELISA foi realizado para detectar anticorpos bovinos da classe IgG anti-S-LPS de *B. abortus* como anteriormente descrito (OIE, 2000), com algumas modificações. A otimização das reações foi estabelecida em experimentos preliminares através da titulação em bloco dos reagentes, utilizando soros controles positivos (grupo I) e negativos (grupo IV).

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar® 3590, NY, EUA) de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µL/poço de S-LPS de *B. abortus* na concentração de 100 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M (pH 9.6) durante 18 horas a 4°C. Após quatro ciclos de lavagens em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST), as placas foram bloqueadas com 1% de soroalbumina bovina (BSA; Sigma Chemical Co., EUA) em PBST (PBST-BSA) por 30 minutos a 37°C. Amostras de soro foram diluídas 1:50 e adicionadas, em duplicata, incubando-se por 1 hora a 37°C. Entre cada etapa da reação, foram realizados ciclos de quatro lavagens com PBST para remoção do excesso de reagentes, usando uma lavadora automática de microplaca. Subseqüentemente, os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase (Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA) ou Proteína A/peroxidase (Sigma Chemical Co., EUA) diluídos 1:1000 em PBST foram adicionados e a reação incubada por 1 hora a 37°C. A atividade enzimática foi avaliada pela adição do substrato enzimático consistindo de H₂O₂ 0,03% e cromógeno 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline ácido sulfônico (ABTS) 0,01M em tampão citrato-fosfato 0.1 M (pH 5,0). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm utilizando um leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Genebra, Suíça). O limite de positividade (*cut off*) foi determinado pela média da densidade óptica (DO) dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Títulos de anticorpos foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO_{amostra} / cut\ off$, como anteriormente descrito (SILVA et al., 2002).

3.5.3 Immunoblot

As membranas de nitrocelulose previamente transferidas com as frações S-LPS ou hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus* foram cortadas em tiras de 3 mm, acondicionadas em canaletas apropriadas para *immunoblot* e bloqueadas com PBST contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) por 2 horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente, as

amostras de soros bovinos foram diluídas 1:50 em PBST contendo 1% de leite desnatado (PBST-M) e incubadas por 18 horas a 4°C. Amostras de soros controles positivos e negativos foram incluídas em cada análise. Após seis lavagens de 5 minutos com PBST, as tiras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase ou Proteína A/peroxidase diluídos 1:2000 em PBST-M. Um novo ciclo de seis lavagens em PBST foi realizado e a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (Sigma FastTM 3,3-diaminobenzidine tablet sets, Sigma Chemical Co., EUA). A reação foi interrompida pela adição de água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas. As bandas foram analisadas utilizando o programa de imagens *Kodak Digital Science 1D* (Kodak, EUA) e comparadas com uma curva de padrões de pesos moleculares (6.500 a 205.000 kDa) para determinar a mobilidade relativa (Rf) e massas moleculares aparentes de cada banda antigênica.

3.5.4 Immunoblot-avidez

Ensaio de *immunoblot*-avidez foram realizados utilizando membranas de nitrocelulose previamente transferidas com a fração hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus* como anteriormente descrito para ELISA-avidez (WIUFF et al., 2002), com algumas modificações. Após bloqueio das tiras de nitrocelulose como descrito para *immunoblot*, amostras de soros foram diluídas 1:50 em PBST-M e adicionadas em duas tiras. Após incubação por 18 horas a 4°C, uma das tiras foi lavada por três vezes com solução de uréia 8 M em PBST por 5 minutos, enquanto a outra tira foi lavada somente com PBST. Subseqüentemente, ambas as tiras foram lavadas por três vezes em PBST por 5 minutos e incubadas com o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase diluído 1:2000 em PBST-M por 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição do substrato como descrito para *immunoblot* convencional. Os perfis de bandas obtidos para as amostras não tratadas (uréia⁻) ou tratadas com uréia 8 M (uréia⁺) foram analisados utilizando o programa de imagens *Kodak Digital Science 1D* que calculou a intensidade das bandas (*Int Band*) expressas em pixels. A porcentagem de queda da reatividade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$[(Int\ Band\ uréia^{-} - Int\ Band\ uréia^{+}) / Int\ Band\ uréia^{-}] \times 100.$$

3.6 Análise estatística

Para determinar o valor limiar do índice ELISA (IE) que poderia ser considerado um resultado positivo no iELISA, foi realizada a análise TG-ROC (*two-graph receiver operating characteristic*) conforme descrito por Greiner e colaboradores (1995). A sensibilidade e especificidade do iELISA foi determinada para cada valor de IE usando 30 soros controles positivos (grupos I e II) e 15 soros negativos (grupo IV), respectivamente.

A análise estatística foi realizada em programas computadorizados específicos (*GraphPad Prism* versão 4.0 – GraphPad Software, Inc., EUA). Como os dados apresentaram distribuição normal, testes paramétricos foram utilizados. A comparação entre os conjugados enzimáticos Proteína A e anti-IgG bovina dentro de cada grupo foi analisada pelo teste *t* de Student e a detecção de anticorpos IgG anti-*B. abortus* entre os grupos foi comparada pelo *one-way* ANOVA usando a comparação múltipla de Newman-Keuls como *post hoc* teste.

As frequências das bandas antigênicas foram analisadas utilizando a diferença entre duas proporções (*Statistic for Windows* – versão 4.5 A - Statesoft Inc., 1993). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.7 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos técnicos foram realizados seguindo as normas de biossegurança (CHAVES-BORGES; MINEO, 1997).

Considerando-se que *Brucella abortus* está classificada, quanto à biossegurança, no Grupo 3 de patógenos de risco para o homem, os seguintes procedimentos foram adotados durante o seu manuseio (OIE, 2000):

- Conhecimento sobre o patógeno;
- Uso de bancadas impermeáveis à água e resistentes a produtos químicos;
- Acesso restrito de pessoas durante o processamento do material contaminado;
- Uso de equipamentos de proteção individual como luvas, máscaras, óculos de proteção, respiratórios oro-nasal;
- Utilização de cabines de biossegurança e de exaustão para vapores
- Produção mínima de aerossóis durante os diversos procedimentos;
- Descontaminação de todo o material utilizado.

4. RESULTADOS

4.1. Dosagem de proteína e de polissacáride dos antígenos de *B. abortus*

As concentrações médias de proteínas e de polissacárides das frações antigênicas de *B. abortus* estão sumarizadas na Tabela 3. Como esperado, a fração S-LPS revelou uma menor concentração protéica em relação à de polissacárides, embora o rendimento de cada extração foi relativamente baixo. Ao contrário, a fração hidrofílica de Triton X-114 mostrou uma maior concentração de proteínas em relação à fração hidrofóbica. A dosagem de polissacárides destas frações não foi determinada devido ao baixo rendimento destas frações e, conseqüentemente, à quantidade insuficiente dos extratos para análises posteriores.

Tabela 3. Concentrações médias de proteínas e de polissacárides das frações antigênicas de *B. abortus*.

Fração Antigênica	Concentração protéica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração de Polissacáride ($\mu\text{g/ml}$)
S-LPS	35,5	140,0
Triton X-114 fração hidrofílica	342,4	ND
Triton X-114 fração hidrofóbica	67,7	ND

ND: não determinado

4.2 Análise TG-ROC

O valor limiar de IE para um resultado positivo em iELISA foi selecionado pelo cálculo dos parâmetros de sensibilidade (Se) e especificidade (Es) utilizando a análise TG-ROC (Figura 1). O ponto de intersecção das duas curvas (Se, Es) indica o valor do IE no qual a sensibilidade e especificidade são equivalentes. Assim, analisando os diferentes conjugados enzimáticos, um valor de IE = 1,5 foi determinado para anti-IgG bovina/peroxidase (Figura 1A) e IE = 1,7 para Proteína A/peroxidase (Figura 1B).

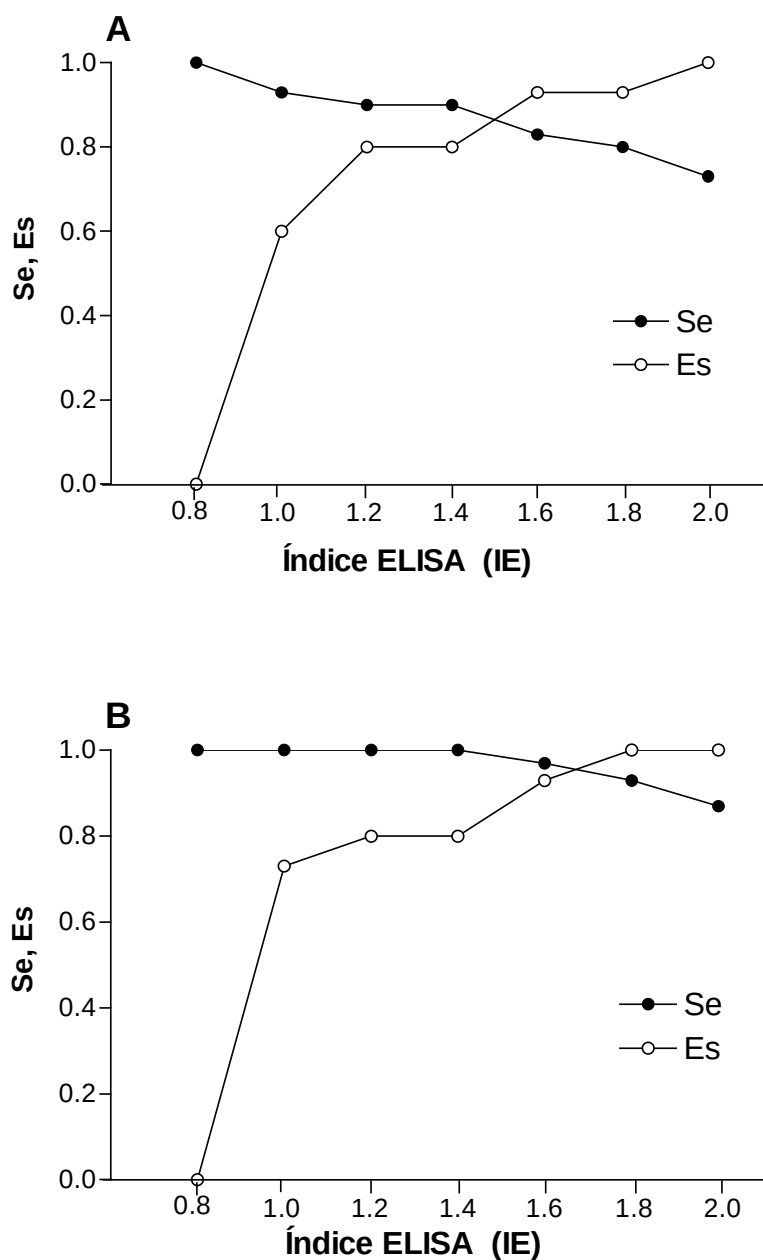


Figura 1. Curva TG-ROC do iELISA para detecção de anticorpos IgG contra a fração enriquecida de S-LPS de *Brucella abortus*, utilizando anti-IgG bovina/peroxidase (**A**) ou Proteína A/peroxidase (**B**) como conjugados. Sensibilidade (Se) e especificidade (Es) para os iELISAs foram determinadas para cada valor de índice ELISA (IE), utilizando-se 30 amostras de soros bovinos controles positivos e 15 negativos. O ponto de intersecção da curva (Se, Es) de cada teste indica o valor do IE onde a sensibilidade e especificidade são equivalentes.

4.3 Testes clássicos de aglutinação e iELISA

Considerando os critérios pré-determinados para positividade nos testes RBT e SAT/2ME e valores de IE estabelecidos nos iELISAs pela análise TG-ROC, as taxas de soropositividade e soronegatividade para anticorpos anti-*B. abortus* em soros de bovinos de diferentes grupos foram calculadas e estão demonstradas na Tabela 4. Altas taxas de soropositividade, variando de 87% a 100%, foram detectadas pelos testes clássicos de aglutinação, tanto em vacas não vacinadas (grupos I e II) quanto em novilhas vacinadas (grupo III). Por outro lado, iELISAs demonstraram taxas de soropositividade variando de 80% a 100% nos animais soropositivos não vacinados, mas uma baixa soropositividade (13%) em novilhas vacinadas (grupo III). Em vacas não vacinadas (grupo IV), os testes de aglutinação e iELISA utilizando Proteína A/peroxidase demonstraram 100% de resultados concordantes negativos, enquanto iELISA utilizando anti-IgG bovina/peroxidase revelou 93% de soronegatividade. Ao comparar os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase em vacas soropositivas não vacinadas, foram encontrados 20% e 7% de resultados negativos, respectivamente. Estes resultados demonstram que um maior número de amostras de soros (87%) de novilhas vacinadas foram negativos pelo iELISA, embora tenham sido caracterizadas como positivos pelos testes clássicos de aglutinação.

Tabela 4- Taxas de soropositividade para os vários testes sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos para *Brucella abortus* em soros de bovinos de diferentes grupos.

Grupos ^a	Soropositividade (%)			
	RBT ^b	SAT/2ME ^c	iELISA IgG/HRPO ^d	iELISA PA/HRPO ^e
I	93	100	80	93
II	100	100	100	100
III	100	87	13	13
IV	0	0	7	0

- ^a (I) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área endêmica para *Brucella* (n=15);
 (II) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área não endêmica para *Brucella* (n=15);
 (III) novilhas vacinadas com *B. abortus* S19 entre 3 e 8 meses de idade e procedentes de área endêmica para *Brucella* (n=15);
 (IV) vacas não vacinadas soronegativas procedentes de área não endêmica para *Brucella* (n=15);
^b Teste Rosa Bengala (RBT) com antígeno tamponado acidificado (pH 3,63);
^c Teste de aglutinação do soro (SAT) com agente redutor 2-Mercaptoetanol (2ME);
^d Ensaio imunoenzimático indireto (iELISA) utilizando anti-IgG bovina marcada com peroxidase (HRPO) como conjugado. Valor de índice ELISA (IE) positivo = 1,5;
^e iELISA utilizando Proteína A/peroxidase como conjugado. Valor de IE positivo = 1,7.

4.4 iELISAs com conjugados anti-IgG bovina ou Proteína A marcados com peroxidase

Níveis de anticorpos IgG contra a fração enriquecida de S-LPS de *B. abortus* foram determinados por iELISAs utilizando anti-IgG bovina ou Proteína A marcados com peroxidase como conjugados de detecção (Figura 2). Ao comparar os dois conjugados dentro de cada grupo de amostras de soros de bovinos (Figura 2A), observou-se níveis maiores de IgG anti-S-LPS de *B. abortus* em vacas soropositivas não vacinadas (grupos I e II) quando Proteína A/peroxidase foi utilizada, embora diferenças significativas ($p < 0,01$) só foram detectadas para animais de áreas endêmicas não vacinados (grupo I).

Quando foram analisados os resultados do iELISA entre os diferentes grupos de soros bovinos (Figura 2B), foram encontrados níveis significativamente altos de IgG anti-S-LPS de *B. abortus* nos grupos de vacas não vacinadas soropositivas (grupos I e II) em relação às novilhas vacinadas (grupo III) ou aos animais soronegativos não vacinados (grupo IV) para os dois conjugados analisados ($p < 0,001$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos I e II e entre os grupos II e IV ($p > 0,05$). Estes resultados demonstraram que iELISA para a detecção de IgG anti-S-LPS de *B. abortus* foi capaz de diferenciar animais soropositivos não vacinados dos animais vacinados ou soronegativos, utilizando-se como reagentes de detecção os conjugados anti-IgG bovina ou Proteína A marcados com peroxidase.

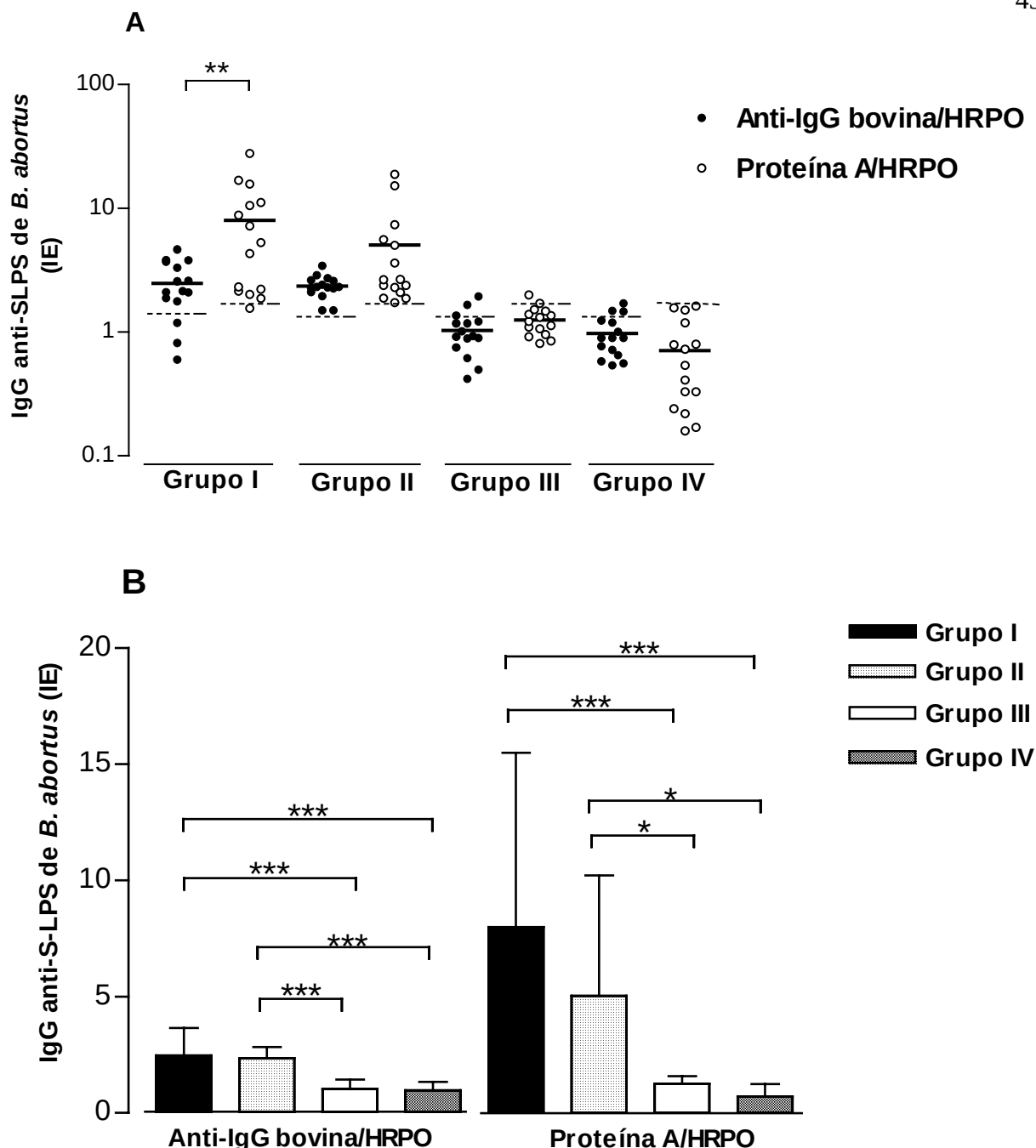


Figura 2. Comparação entre os níveis de IgG anti-S-LPS de *B. abortus* determinados por iELISA e expressos em índice ELISA (IE), utilizando os conjugados anti-IgG bovina/peroxidase (HRPO) ou Proteína A/HRPO dentro de cada grupo (A) e entre os diferentes grupos (B) de soros bovinos. Grupo I: vacas soropositivas não vacinadas procedentes de área endêmica para *Brucella* (n=15); Grupo II: vacas soropositivas não vacinadas procedentes de área não endêmica para *Brucella* (n=15); Grupo III: novilhas vacinadas com S19 entre 3 e 8 meses de idade e procedentes de área endêmica (n=15); Grupo IV: vacas soronegativas não vacinadas procedentes de área não endêmica (n=15). (A) As linhas contínuas representam os valores médios de IE e as linhas tracejadas indicam os valores de *cut off* para cada reação. (B) As barras representam a média e o desvio padrão para cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5 SDS-PAGE

O perfil eletroforético da fração enriquecida de S-LPS e frações hidrofílica e hidrofóbica obtidas pela extração com Triton X-114 de *B. abortus* foi analisado após estas serem submetidas a SDS-PAGE (15% e 12%, respectivamente) e coradas pela prata (Figura 3). A fração enriquecida de S-LPS de *B. abortus* (Figura 3A) demonstrou um complexo típico de bandas com massas moleculares aparentes variando de 11 a 105 kDa, como pode ser observado pelo perfil de bandas demonstrado à esquerda e determinado através do programa de análise de imagens *Kodak Digital Science 1D*. Das bandas analisadas, quatro se mostraram mais fortemente coradas (22, 43, 50 e 85 kDa). Para comparação, foi realizado a análise eletroforética de S-LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 026:B6; Sigma Chemical Co.) em paralelo com a amostra obtida pela extração fenol-água aquecida de S-LPS de *B. abortus* (Figura 3B), demonstrando bandas com perfil eletroforético similar.

O perfil eletroforético das frações hidrofílicas (Figura 3C) e hidrofóbicas (Figura 3D) obtidas pela extração com Triton X-114 de *B. abortus* revelou um padrão distinto de bandas com massas moleculares aparentes variando de 16 a 73 kDa, sendo que cinco bandas demonstraram um perfil de coloração mais intenso (30, 35, 43, 57 e 69 kDa).

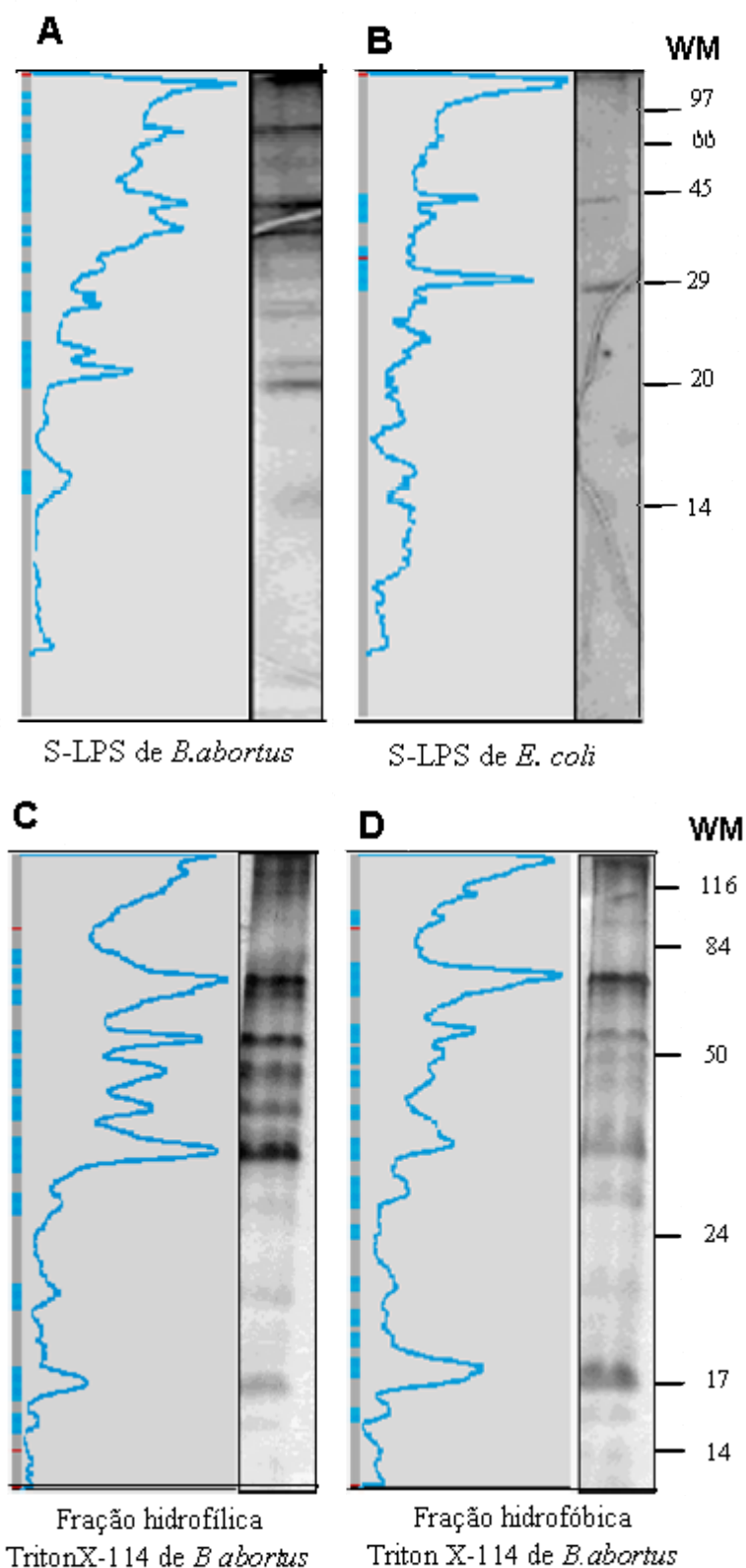


Figura 3. Perfil eletroforético da fração enriquecida de S-LPS de *Brucella abortus* (A) e de S-LPS de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6 (B) e frações hidrofílica (C) e hidrofóbica (D) obtidas pela extração com Triton X-114 de *B. abortus*, coradas pela prata. Massas moleculares (Mr), expressas em kiloDaltons (kDa), estão indicadas à direita e os perfis das bandas, analisadas pelo programa de imagens Kodak Digital Science1D, estão demonstrados à esquerda

4.6 Immunoblot das frações antigênicas S-LPS e hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus*

As análises da reatividade de amostras de soros bovinos dos grupos I, II e III obtidos pelo ensaio *immunoblot* desenvolvido com o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase estão demonstradas na Figura 4. A reatividade dos soros dos animais soropositivos não vacinados (grupos I e II) à fração enriquecida de S-LPS de *B. abortus* foi predominantemente direcionada a um complexo de bandas antigênicas com massas moleculares aparentes variando de 30 a 58 kDa (Figura 4A). Em contraste, a reatividade dos soros de animais vacinados (grupo III) à fração S-LPS de *B. abortus* foi significativamente menor para a maioria das bandas antigênicas, exceto para a banda de 58 kDa ($p < 0,05$). Resultados similares foram encontrados quando a Proteína A/peroxidase foi utilizada como reagente de detecção (dados não demonstrados).

Immunoblots representativos da fração enriquecida de S-LPS de *B. abortus* demonstrando as principais bandas antigênicas reconhecidas por soros bovinos estão ilustradas na Figura 7A. Foi observada uma forte marcação das bandas para a fração S-LPS, visualizada como um perfil típico de migração iniciando do topo até três quartos do gel, evidenciando um amplo padrão de bandas (22 a 105 kDa) para animais soropositivos não vacinados em comparação a um padrão mais restrito de bandas (43 to 58 kDa) observado em vacas vacinadas (Grupo III). Nenhuma coloração foi observada em amostras de soros de vacas não vacinadas soronegativas (grupo IV).

A reatividade dos soros bovinos com a fração hidrofílica de *B. abortus* obtida pelo Triton X-114 (Figura 4B) demonstrou um padrão mais distinto, caracterizado pela detecção de vários antígenos imunodominantes (30, 35, 43, 57 e 73 kDa) em todos os três grupos de bovinos analisados, enquanto uma reatividade significativamente menor foi encontrada para os componentes de 69 e 65 kDa somente em animais vacinados ($p < 0,05$). *Immunoblot* utilizando a fração hidrofóbica de *B. abortus* obtida pelo Triton X-114 não foi realizado porque não foi possível uma clara distinção entre as bandas antigênicas, visualizando somente uma ampla faixa de bandas agregadas.

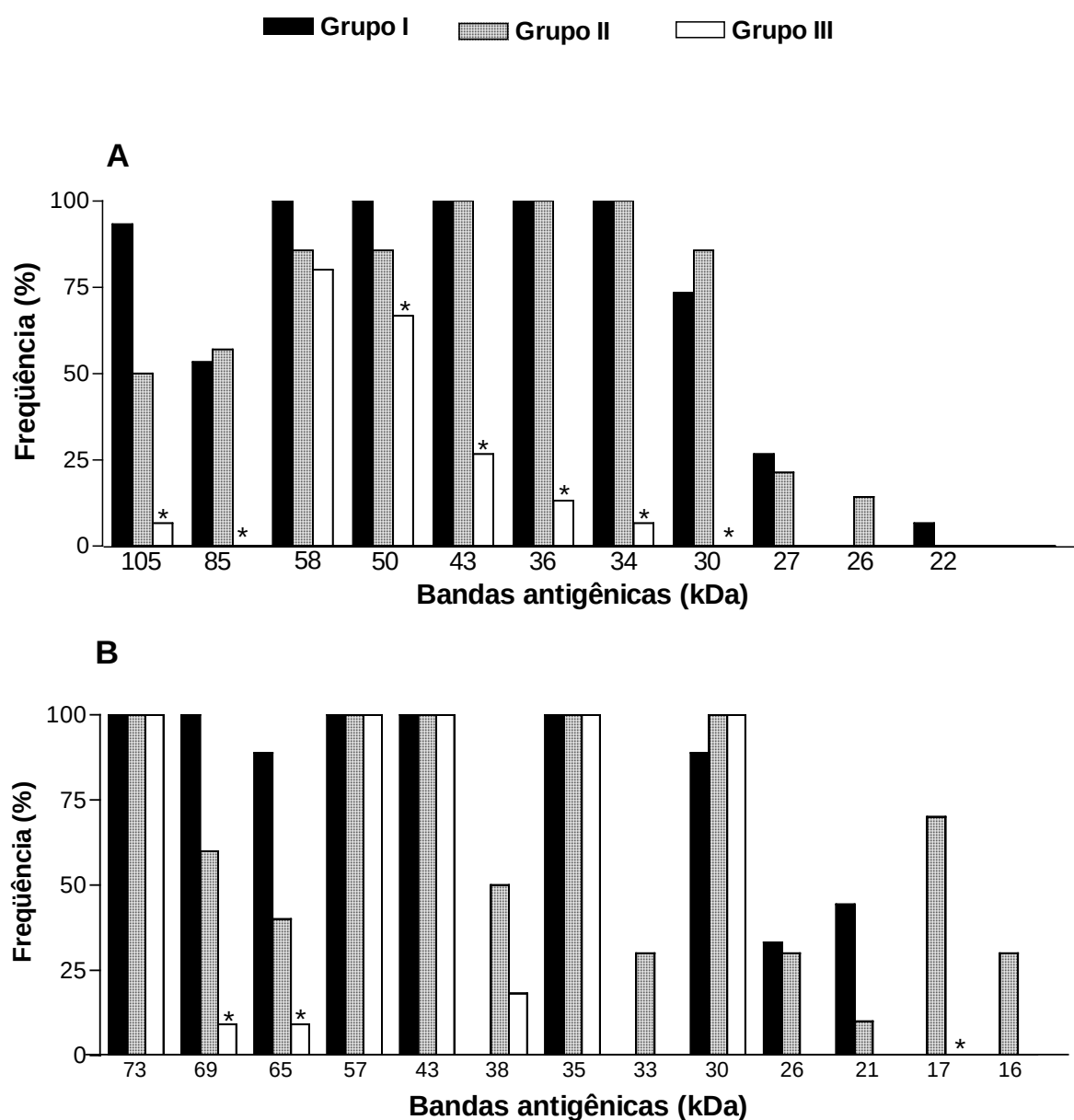


Figura 4. Frequência das bandas antigênicas de frações enriquecidas de S-LPS (**A**) ou fração hidrofílica Triton X-114 (**B**) de *Brucella abortus*, determinadas por *Immunoblot*, reconhecidas por amostras de soros bovinos de diferentes grupos: (I) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área endêmica para *Brucella* (n=15); (II) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área não endêmica para *Brucella* (n=15); (III) novilhas vacinadas com S19 entre 3 e 8 meses de idade e procedentes de área endêmica (n=15); (IV) vacas não vacinadas soronegativas procedentes de área não endêmica (n=15). As bandas antigênicas estão expressas em kiloDaltons (kDa). * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos I e II.

4.7 *Imunoblot*-avidez da fração hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus*

Os resultados do *imunoblot*-avidez utilizando a fração hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus* em soros bovinos dos grupos I, II e III estão demonstrados na Figura 5. Em vacas soropositivas não vacinadas do grupo I (Figura 5A), foi observada uma significativa redução na frequência de algumas bandas antigênicas (26, 30, 65, 69 e 73k Da) após o tratamento dos soros com uréia 8 M ($p < 0,05$), enquanto outras bandas imunodominantes (35, 43 e 57 kDa) não sofreram alteração significativa da reatividade. Em vacas soropositivas não vacinadas do grupo II (Figura 5B), somente a banda de 73 kDa demonstrou uma significativa redução na sua frequência após o tratamento com uréia 8 M ($p < 0,05$). Em novilhas vacinadas do grupo III (Figura 5C), três bandas (30, 43 e 57 kDa) sofreram uma significativa redução na frequência após o tratamento com uréia ($p < 0,05$).

Quando foi analisada a queda da reatividade de cada banda antigênica da fração hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus* após o tratamento com uréia 8 M dos soros bovinos nos diferentes grupos (Figura 6), uma significativa queda de reatividade foi observada para as bandas antigênicas de 35, 43 e 57 kDa reconhecidas pelos soros do grupo III (novilhas vacinadas) quando comparado aos grupos I e II (vacas não vacinadas soropositivas).

Immunoblots representativos da fração hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus* demonstrando as principais bandas antigênicas reconhecidas por soros bovinos antes e após o tratamento com uréia estão ilustrados na Figura 7B. Foi observada uma significativa queda de reatividade de bandas antigênicas imunodominantes reconhecidas por soros de vacas não vacinadas dos grupos I e II (30, 65, 69 e 73 kDa) e novilhas vacinadas do grupo III (30, 43 e 57 kDa).

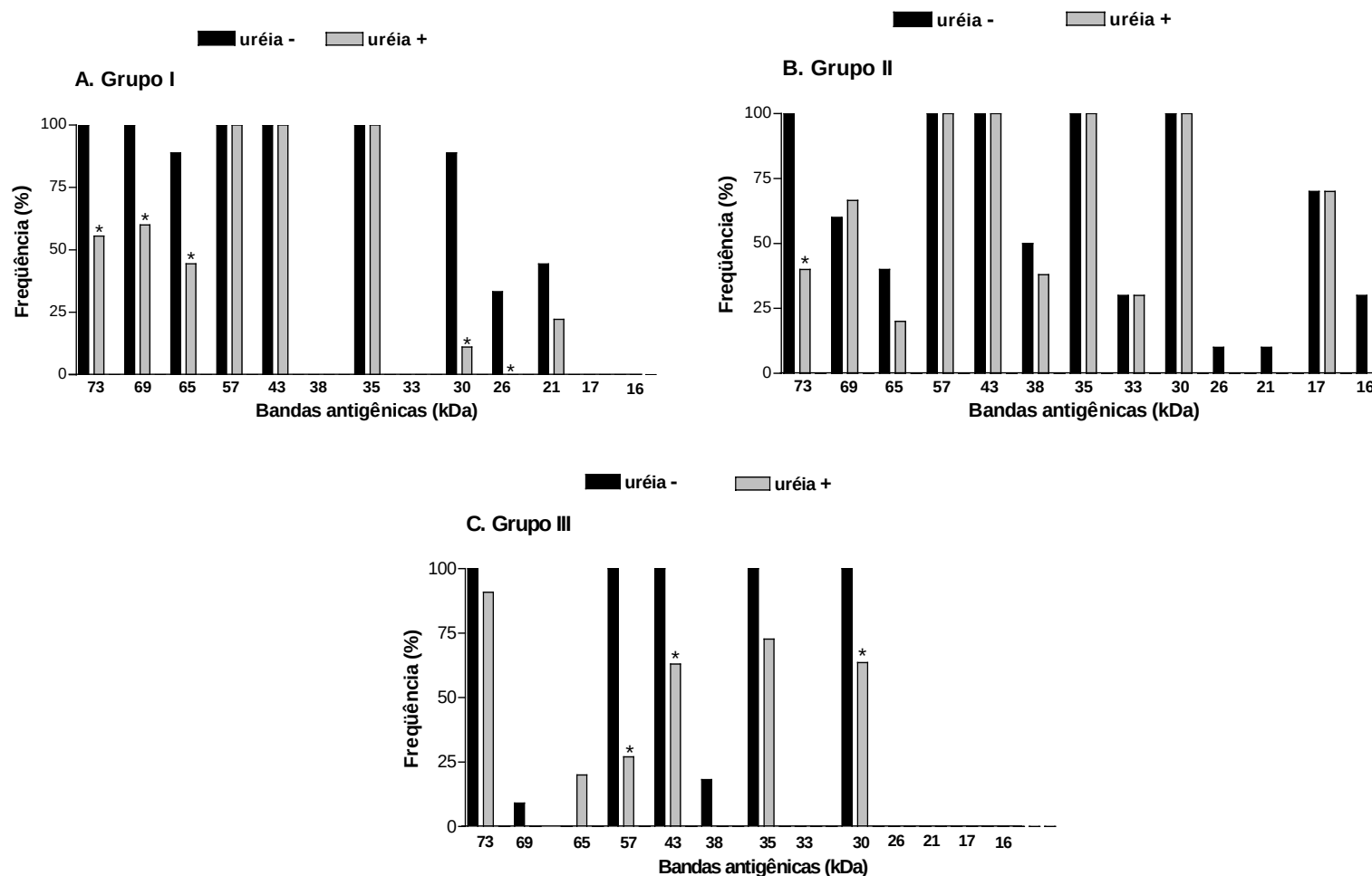


Figura 5. Frequência das bandas antigênicas da fração hidrofílica Triton X-114 de *Brucella abortus*, determinada por *Immunoblot*, reconhecidas por amostras de soros bovinos tratadas (**uréia⁺**) ou não (**uréia⁻**) com uréia 8 M nos seguintes grupos: (A) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área endêmica para *Brucella* (grupo I; n=15); (B) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área não endêmica para *Brucella* (grupo II; n=15); (C) novilhas vacinadas com S19 entre 3 e 8 meses de idade e procedentes de áreas endêmicas (grupo III; n=15). As bandas antigênicas estão expressas em kiloDaltons (kDa). As barras representam a média e intervalo de confiança de 95% para cada grupo. * $p < 0,05$ quando comparando amostras de soro tratadas (**uréia⁺**) ou não tratadas (**uréia⁻**) com uréia 8 M.

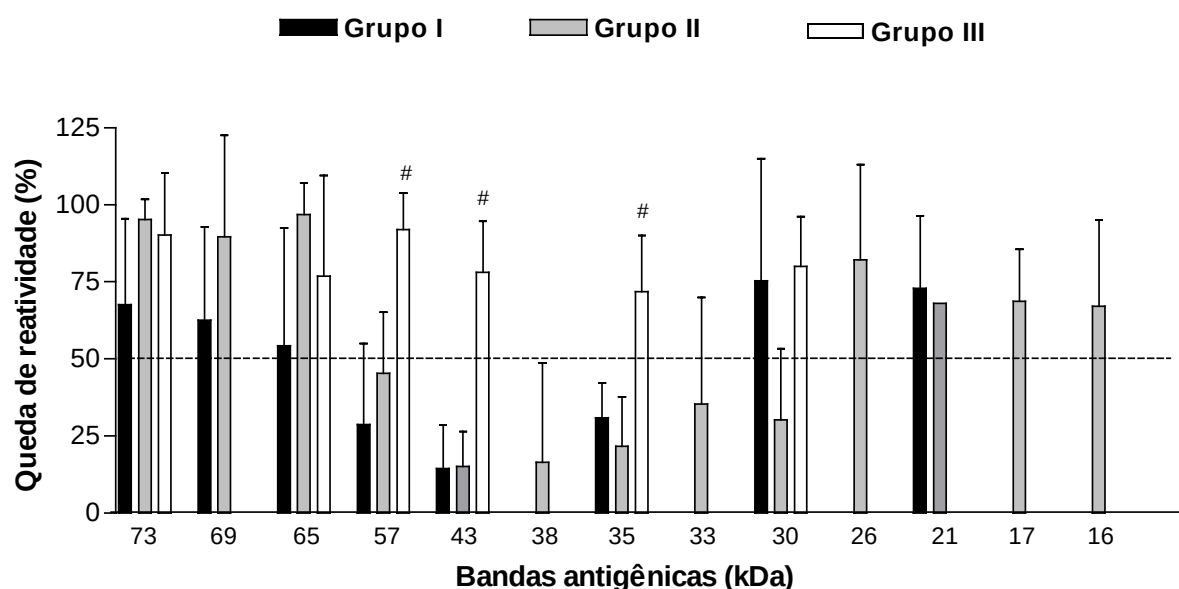


Figura 6. Comparação da avidéz de IgG dos soros de bovinos frente a fração hidrofílica Triton X-114 de *Brucella abortus* mensurada pela queda da reatividade entre os seguintes grupos: **(I)** vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área endêmica para *Brucella* (grupo I; n=15); **(II)** vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área não endêmica para *Brucella* (grupo II; n=15); **(III)** novilhas vacinadas com S19 entre 3 e 8 meses de idade e procedentes de áreas endêmicas (grupo III; n=15). As bandas antigênicas estão expressas em kiloDaltons (kDa). A linha descontínua representa o limite para diferenciar alta de baixa avidéz. As barras representam a média e intervalo de confiança de 95% para cada grupo. [#] $p < 0,05$, quando comparando a queda de reatividade entre os grupos

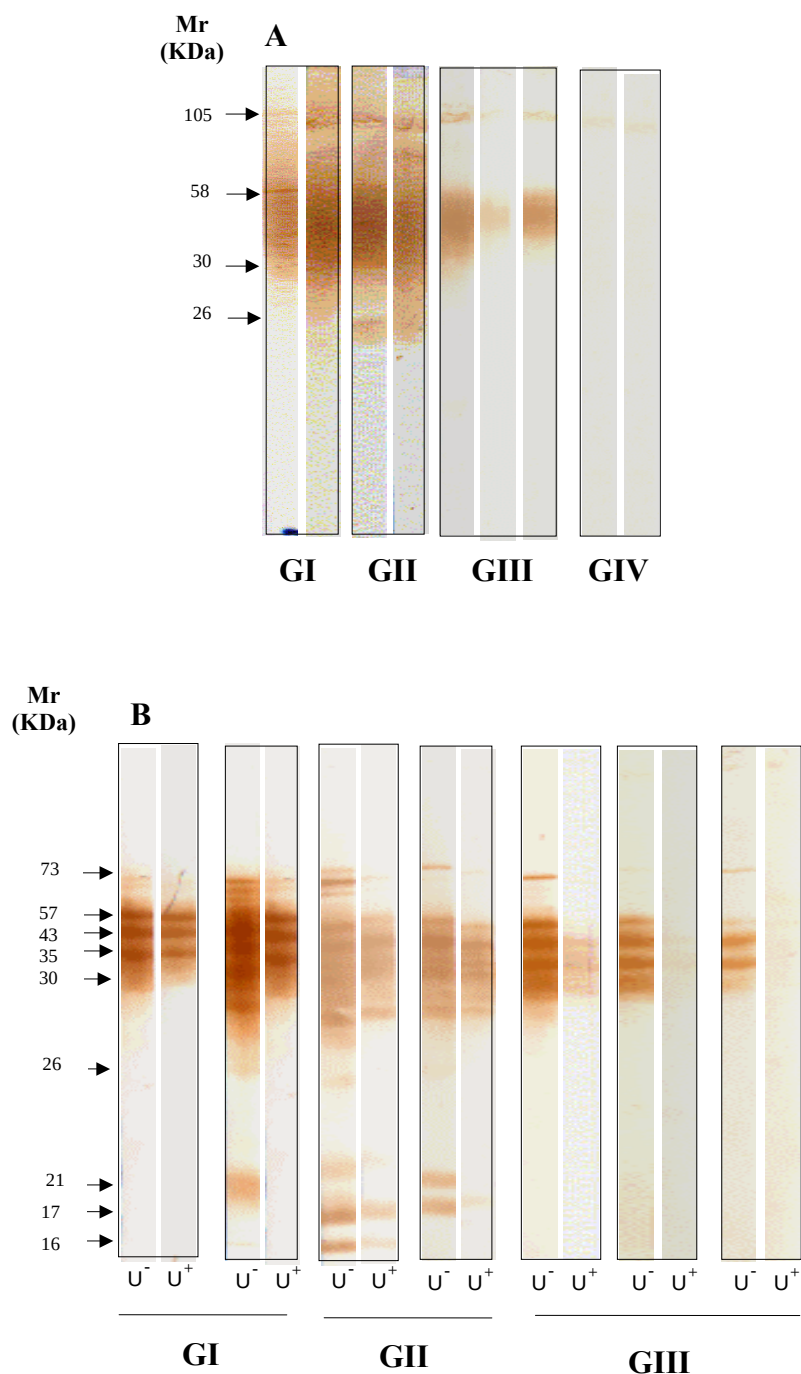


Figura 7. Immunoblot representativo das principais bandas antigênicas presentes na fração enriquecida S-LPS (**A**) ou fração hidrofílica Triton X-114 (**B**) de *Brucella abortus* reconhecidas por amostras de soros bovinos obtidas dos seguintes grupos: (G I) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área endêmica para *Brucella*; (G II) vacas não vacinadas soropositivas procedentes de área não endêmica para *Brucella*; (G III) novilhas vacinadas com S19 entre 3 e 8 meses de idade e procedentes de área endêmica; (G IV) vacas não vacinadas soronegativas procedentes de área não endêmica. A avidéz de anticorpos IgG para os componentes da fração hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus* foi observada pela queda da reatividade dos soros bovinos submetidos ao tratamento com uréia 8 M (U⁺) quando comparado ao soro sem tratamento (U⁻).

5. DISCUSSÃO

Brucelose bovina tem sido controlada em muitos países por programas que incluem diferentes esquemas de vacinação com *B. abortus* S-19, objetivando a redução da prevalência e seguindo pelo diagnóstico sorológico, por meio de testes simples ou combinados, e conseqüente eliminação dos animais soropositivos (ABALOS; DAFFNER; PINOCHET, 2000). A maioria dos testes sorológicos é baseada na detecção de anticorpos dirigidos para o antígeno S-LPS de *B. abortus* e métodos tradicionais como RBT, SAT/2ME, teste de fixação de complemento (CFT), e mais recentemente, o iELISA e o cELISA têm sido validados e utilizados regularmente (McGIVEN et al., 2003). Desta forma, testes de triagem com alta sensibilidade como o RBT, são aplicados seguindo por um teste confirmatório com maior especificidade como CFT ou SAT/2ME (UZAL et al., 1996). Neste contexto, novos procedimentos para o diagnóstico da brucelose são requeridos para diferenciar respostas vacinais de infecção natural, possuindo uma especificidade e sensibilidade para detectar todos os estágios da infecção, incluindo o diagnóstico diferencial para animais vacinados não infectados que não são identificados nos testes clássicos (ABALOS et al., 1996). No entanto, atualmente, tais testes ainda não existem (McGIVEN et al., 2003).

Os ensaios imunoenzimáticos têm sido avaliados por muitos anos em relação ao seu desempenho para detectar anticorpos séricos para *B. abortus* e tais técnicas oferecem várias vantagens em relação aos outros testes, incluindo que o soro não precisa ser inativado como para o CFT ou pré-tratado com 2ME como para o SAT/2ME, podendo ser utilizado soro hemolisado e a reatividade é avaliada objetivamente, reduzindo erros subjetivos (UZAL et al., 1996). Em adição, ELISAs utilizando conjugados de afinidade como Proteína A ou G marcadas com peroxidase permitem a distinção de diferentes subclasses de anticorpos IgG, o que é importante para determinar o perfil de infecção por *Brucella* (LAWMAN et al., 1986).

No presente trabalho, comparou-se iELISA utilizando conjugados enzimáticos anti-IgG bovina ou Proteína A marcados com peroxidase para a detecção de anticorpos do isotipo IgG contra a fração enriquecida de S-LPS de *B. abortus* em soros de bovinos de diferentes grupos em relação aos testes clássicos de aglutinação. Primeiramente, foi determinado pela análise TG-ROC o valor limiar do IE para o qual um resultado seria considerado positivo para cada iELISA. Desta maneira, ambos iELISAs demonstraram um excelente desempenho para detectar animais positivos em amostras de soros provenientes de vacas soropositivas não vacinadas (grupos I e II) e animais negativos em amostras de soros de novilhas vacinadas (grupo III) e de vacas não vacinadas soronegativas (grupo IV). Em contraste, os testes de

aglutinação clássicos como RBT e SAT/2ME demonstraram uma alta eficiência para detectar animais positivos nos grupos I e II, mais falharam em diferenciar respostas vacinais, uma vez que altas taxas de soropositividade foram detectadas em novilhas vacinadas (grupo III). Resultados similares foram reportados por Samartino e colaboradores (1999).

Vários estudos têm demonstrado a alta sensibilidade de iELISA com S-LPS de *B. abortus*, porém tem sido atribuída uma baixa habilidade na sua capacidade de diferenciar animais não vacinados dos vacinados com *B. abortus* S19, bem como aqueles que apresentam anticorpos resultantes de uma exposição a microorganismos com determinantes antigênicos em comum (ABALOS et al., 1996; SAMARTINO et al., 1999; OIE, 2000; NIELSEN, 2002). O antígeno polissacáride (PS) de *B. abortus* extraído por água aquecida foi avaliado em iELISA por Abalos e colaboradores (2000), demonstrando 100% de sensibilidade, 97% de especificidade e foi capaz de discriminar animais vacinados em 85,2% das amostras analisadas. No presente estudo, o iELISA com fração enriquecida de S-LPS de *B. abortus* apresentou uma maior capacidade de identificar novilhas vacinadas como animais negativos (87%) em relação aos testes clássico de aglutinação (13%). Vale salientar que as amostras de soros das novilhas vacinadas foram obtidas 90 dias após a vacinação, período no qual os anticorpos vacinais alcançam uma máxima produção. Assim, a caracterização destas amostras de soros como negativas reflete a habilidade dos iELISAs de diferenciar entre bovinos vacinados e infectados (ABALOS et al., 2002)

Quando os dois conjugados utilizados no iELISA foram comparados, observou-se que 7% de resultados positivos foram encontrados em vacas soronegativas não vacinadas (grupo IV) quando anti-IgG bovina/peroxidase foi utilizado como conjugado, enquanto que não foram observados resultados positivos ao se utilizar o conjugado Proteína A/peroxidase. Estes resultados falso positivos podem ser devido à reatividade cruzada de epítomos imunodominantes na cadeia de polissacarídeo O (O-PS) de *Brucella* que estão presentes em várias bactérias Gram-negativas (Al DAHOUK et al., 2006). Por outro lado, 20% contra 7% de resultados negativos foram encontrados em vacas soropositivas não vacinadas (grupos I e II) para anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase, respectivamente, sugerindo a presença de baixos níveis de anticorpos ou de diferentes isotipos. Neste contexto, tem sido demonstrado que a Proteína A reage mais especificamente com anticorpos da subclasse IgG2, cujos níveis aumentam de acordo com o tempo de exposição ao antígeno na infecção natural por *Brucella* spp (SAEGERMAN et al., 2004). Ao analisar a sensibilidade de iELISAs utilizando como conjugados anticorpos monoclonais anti-IgG1 bovina, anti-IgG2 bovina e Proteína G marcados com peroxidase no diagnóstico sorológico da brucelose bovina,

Saegerman e colaboradores (2004) observaram que o ensaio utilizando o conjugado anti-IgG2 bovina mostrou uma menor propensão a produzir reações falso positivas. No presente estudo, quando a Proteína A foi utilizada como reagente de detecção, maiores níveis de anticorpos IgG anti-S-LPS de *B. abortus* foram detectados em vacas não vacinadas (grupos I e II) em relação ao conjugado anti-IgG bovina/peroxidase, sugerindo a predominância de anticorpos IgG2 neste grupo e, conseqüentemente, caracterizando um perfil de bovinos infectados. De maneira similar, Lawman e colaboradores (1986) relataram que a resposta de anticorpos IgG2 indicou uma correlação absoluta entre níveis de IgG2 anti-*B. abortus* e infecção animal. Assim, a avaliação dos níveis de anticorpos IgG2 específicos para *B. abortus* pode ser uma valiosa ferramenta para identificar bovinos infectados por *Brucella* spp

A avaliação de marcadores antigênicos para identificar diferentes fases da infecção tem sido largamente empregada em várias doenças. Assim, no intuito de determinar marcadores antigênicos que possam ser úteis para melhor diferenciação entre bovinos vacinados daqueles infectados não vacinados, análises de *immunoblot* convencional e *immunoblot*-avidez foram conduzidas com as frações S-LPS e hidrofílica Triton X-114 de *B. abortus*. SDS-PAGE da fração S-LPS de *B. abortus* seguida da coloração pelo nitrato de prata demonstrou um perfil típico de S-LPS como descrito por Goldstein e colaboradores (1992), enquanto SDS-PAGE das frações Triton X-114 de *B. abortus* revelaram um distinto padrão de bandas. Os ensaios *immunoblot* utilizando S-LPS de *B. abortus* evidenciaram um amplo complexo de bandas na região de alto peso molecular (22 a 105 kDa) reconhecido por amostras de soros de vacas soropositivas não vacinadas (grupos I e II) em relação a uma região mais restrita de bandas (43 a 58 kDa) para novilhas vacinadas (grupo III). Entretanto, a identificação precisa de cada banda antigênica torna-se difícil devido à característica de um típico complexo de bandas agregadas para este antígeno S-LPS. Similarmente, a fração hidrofóbica obtida pela extração com Triton X-114 de *B. abortus* revelou um complexo de bandas antigênicas em contraste com a fração hidrofílica Triton X-114 que demonstrou um perfil de reatividade mais claramente definido. Desta maneira, *immunoblot*-avidez foi realizado utilizando somente a fração hidrofílica de Triton X-114 que revelou uma significativa queda da reatividade para várias bandas antigênicas imunodominantes (35, 43 e 57 kDa) reconhecidas por soros de novilhas vacinadas, refletindo a presença de anticorpos vacinais de baixa avidez para estes marcadores antigênicos. Estes resultados são concordantes com relatos anteriores demonstrando que vacinas induzem anticorpos de baixa afinidade devido ao menor tempo de exposição ao antígeno pela eliminação imune comparada à infecção natural, na qual o antígeno é persistente, resultando em um aumento da afinidade do anticorpo (McMILLAN et

al., 1990). Além disso, tem sido relatado que anticorpos vacinais são indistinguíveis dos anticorpos gerados pela infecção natural por *B. abortus*, exceto pela sua baixa afinidade (NIELSEN et al., 2004).

Os resultados deste estudo mostraram que iELISA com S-LPS de *B. abortus* utilizando Proteína A/peroxidase como reagente de detecção pode ser uma útil e potencial ferramenta para melhor caracterização da resposta de anticorpos vacinais S19 e de infecção natural por *B. abortus*, devido à detecção preferencial de anticorpos da subclasse IgG2, um importante marcador de infecção por *Brucella* spp Além disso, o perfil de reatividade de anticorpos IgG específicos para *B. abortus* no ensaio de *immunoblot*-avidez demonstrou que anticorpos vacinais apresentaram uma baixa avidez para componentes com massa molecular aparente de 35, 43 e 57 kDa, constituindo-se em potenciais marcadores antigênicos para diferenciar bovinos vacinados dos animais com infecção natural. Isto é particularmente importante em regiões de baixa prevalência, onde a vacinação com *B. abortus* S19 é tradicionalmente utilizada em novilhas ou em regiões de alta prevalência onde vacas adultas podem ser revacinadas com doses reduzidas de S19 como parte de programas de erradicação da brucelose bovina. Finalmente, um processo de validação deve ser conduzido com os antígenos investigados neste trabalho, considerando um número apropriado de amostras de soros de diferentes condições naturais, para obtenção do uso potencial desses antígenos em iELISA, *immunoblot* e *immunoblot*-avidez no diagnóstico da brucelose bovina.

6. CONCLUSÕES

- A análise TG-ROC permitiu estabelecer um valor limiar de positividade para o índice ELISA (IE) nos iELISAs utilizando anti-IgG bovina ou Proteína A como conjugados marcados com peroxidase.
- O iELISA com S-LPS de *B. abortus* utilizando Proteína A/peroxidase como reagente de detecção mostrou ser uma útil e importante ferramenta para a diferenciação entre resposta de anticorpos induzidos pela cepa vacinal S19 de *B. abortus* e aqueles de infecção natural.
- A presença de anticorpos vacinais de baixa avidéz para componentes antigênicos imunodominantes (35, 43 e 57 kDa) da fração hidrofílica de Triton X-114 de *B. abortus*, evidenciados pela significativa queda de reatividade no *immunoblot*-avidéz, indica que estes componentes possam ser utilizados como potenciais marcadores antigênicos capazes de diferenciar bovinos vacinados de infectados.

REFERÊNCIAS¹

- ABALOS, P.; DAFFNER, J.; PINOCHET, L. Evaluation of three *Brucella* soluble antigens used in an indirect ELISA to discriminate S19 vaccinated from naturally infected cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 161-167, 2000.
- ABALOS, P.; IBARRA, L.; PINOCHET, L.; NAVIA, F.; BOISIER, X. Residual anti-*Brucella abortus* strain 19 antibodies detected in adult cattle by two indirect-ELISA test. **The Veterinary Record**, London, v.138, n. 6, p. 140, 1996.
- ACHA, P. N.; SZYIFRES, B. Brucellosis, In: ACHA, P. N.; SZYIFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases to man and animals**. Washington, DC : Pan American Health Organization Scientific publication, 1980. p. 28-45.
- ADAMS, L. G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 553-561, 2002.
- AGUADO-MARTINEZ, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ARNAIZ-SECO, I.; INNES, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.17, p. 442-450, 2005.
- AL DAHOUK, S.; NÖCKLER, K.; SCHOLZ, H.C.; TOMASO, H.; BOGUMIL, R.; NEUBAUER, H. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 309, n. 1-2, p. 34-47, 2006.
- AL DAHOUK, S.; NÖCKLER, K.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H.; FRANGOULIDIS, D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis: a review of the literature. Part II: Serological tests for brucellosis. **Clinical Laboratory**, Germany, v. 49, n. 11-12, p. 577-589, 2003.
- ALLAN, G.; CHAPPEL, R.; WILLIAMSON, P.; McNAUGHT, D. A quantitative comparison the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **Journal of Hygiene**, London, v. 76, n. 2, p. 287-298, 1976.
- ALTON, G. G.; FORSYTH, J. R. L. *Brucella*. In: __. **Medical Microbiology**. 4th. Texas: Samuel Baron, 1996. sec.1. Disponível em :<<http://www.ncbi.nlm/books/htm>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2006.
- ALTON, G. G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. Paris, France, 190 pp.

¹ As referências bibliográficas foram citadas de acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR 6023/2002; NBR 10520/2002 e NBR 14724/2002.

AMATO, G. A. J. The return of brucellosis. **Maltese Medical Journal**, v.7, n. 1-2, p.7-8, 1995

BALDWIN, C. L. Immune response overview. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 365-366, 2002.

BEH, K. J. Distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes and low molecular weight antibody fraction in serum and whey of cattle. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 14, n.3, p. 381-384, 1973.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v.8, p.93-99, 1987.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **Journal Biological Chemistry**, Germany, v. 256, n. 4, p. 1604-1607, 1981.

BRACEWELL, C. D.; CORBEL, M. J. An association between arthritis and persistent serological reactions to *Brucella abortus* in cattle apparently brucellosis-free herds. **The Veterinary Record**, London, v. 106, n. 5, p. 99-101, 1980

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose-PNCEBT**. Brasília, 2004. 101p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**. Ano V, vols. 1-4, 1975. 17 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Diagnóstico de Saúde Animal**. 1977. p. 525-602.

BUNDLE, D. R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; GIDNEY, M.A.; MEIKLE, P. J.; PERRY, M. B.; PETERS, T. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 9, p.2829-2836, 1989.

CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G.; SOWA, B. A. Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41, n. 3-4, p. 295-306, 1994

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **The Journal of Infection**, v. 45, n. 2, p.122-127, 2002.

CAROFF, M.; BUNDLE, D. R.; PERRY, M. B.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; DUNCAN, J. R. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. **Infection and Immunity**, Washington, v. 46, v. 2, p.384-388, 1984.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, n. 23, p. 2431-47, 2003.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D.; CAVAILLON, J. M.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Structural and functional analyses of bacteria lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, Paris v.4, n.9, p. 915-26, 2002.

CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K.; BRUNO, L.; WALLACH, J. C.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 1, p. 111-114, 2004.

CHAVES-BORGES, F.A; MINEO, J. R. **Medidas de Biosseguranca em Laboratórios**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1997. 57 p.

CLOECKAERT, A.; VIZCAINO, N.; PAQUET, J. Y.; BOWDEN, R. A.; ELZER, P. H. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 229-247, 2002.

CLOECKAERT, A.; WEYNANTS, V.; GODFROID, J.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; ZYGMUNT, M. O-Polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. -870, **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 5, n. 6, p. 862- 870, 1998.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an Overview. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, p. 213-221, 1997.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. Brucelose. In:__. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda, 1992, cap. 20, p. 195-218.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUEÑAS, A. I.; ORDUÑA, A.; SÁNCHEZ CRSPO, M.; GARCIA-RODRIGUEZ, C. Interaction of endotoxins with Toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella* spp LPS. **International Immunology**, Oxford, v. 16, n.10, p. 1467-1475, 2004.

ELBERG, S.S.; FITZUGH, H. A .; KING, N.B.; LIVE, I.; ROBERTSON, D.C.; SCHNURRENBERGER, P. R.; SHOOK, J. C. **Brucellosis research: an evolution** . National Academy of Sciences. Washington, DC. 1977.

ENRIGHT, F.M; WALKER, J.V.; JEFFERS, G.; DEYOE, B.L.. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 45, n.3, p.424-430, 1984.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). 2004. **Animal production and health division**. Disease Cards. Bovine Brucellosis. Disponível em : <<http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards>> Acesso em: 24 de maio de 2004

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Expert Committee on Brucellosis**. Geneva: World Health Organization, 1986. 132 p

FORSGREN, A.; SJOQUEST, J. Protein A from *S. aureus* I. Pseudo-immune reaction human gamma-globulin. **International Immunology**, Oxford, v. 97, n. 6, p. 822-825, 1966.

FREER, E.; ROJAS, N.; WEINTRAUB, A; LINDBERG, A. A.; MORENO, E. Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. **Research in Microbiology**, Paris, v.146, n.7, p. 569-578, 1995.

GOLDING, B.; SCOTT, D. E.; SCHARF, O.; HUANG, L. Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2001.

GOLDSTEIN, J.; HOFFMAN, T.; FRASCH C.; LIZZIO, E. F.; BEINING, P.R.; HOCHSTEIN, D.; LEE, Y.L.; ANGUS, R. D.; GOLDING, B. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 4, p. 1385-1389, 1992.

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

GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 185, n. 1, p.123-132, 1995

GUTIERREZ, J.; MAROTO, C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infections diseases? A review. **Microbios**, Cambridge, v. 87, n.351, p. 113-121, 1996.

HARTIGAN, P. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 50, n. 3, p. 179-180, 1997

JENSEN, K. A normally occurring staphylococcal antibody in human serum. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**. Copenhagen, v. 44, p. 421-427, 1958.

JOHNSON, B.; MOSIER, D. A.; MORTON, R. J.; CONFER, A. W. Experimental *Brucella abortus* strain 19 arthritis in young cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 6, p. 56-61, 1994.

KAUFMANN; A. F.; MELTZER, M. I.; SCHIMID, G. P. The economic of a bioterrorist attack: are prevention and post attack intervention programs justifiable? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.3, n. 2, p. 83-94,1997.

KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n.1, p. 65-78, 2003

KORHONEN, M. H.; BRUNSTEIN, J.; HAARIO, H.; KATNIKOV, A.; RESCALDANI, R.; HEDMAN, K. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, n. 5, p.725-728., 1999.

KUTIU, S. S; CELIKBAS, A.; ERGONUL, O.; KUTIU, M.; AKSARAY, S.; GUVENER, E.; DOKUZOGUZ, B. The value of the immunoglobulin G avidity test for the serological diagnosis of brucellosis. **Mikrobiyoloji Bülteni**, Turkey, v. 37, n. 4, p. 261-267, 2003.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAPAQUE, N.; FORQUET, F.; DE CHASTELLIER, C.; MISHAL, Z.; JOLLY, G.; MORENO, E.; MORIYÓN, I.; HEUSER, J.E.; HE, H.T.; GORVEL, J.P. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.8, n. 2, p. 197-206, 2006

LAPAQUE, N.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 8, n.1, p. 60-66, 2005.

LAWMAN, M .J. P.; BALL, D. R.; HOFFMANN, E .M.; DESJARDIN, L. E.; BOYLE, M. D. P. Production of *Brucella abortus*-specific Protein A-reactive antibodies (IgG2) in infected and vaccinated cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.12, n.1, p. 43-53, 1986.

LEVIEUX, D. Immunoglobulines et transmission de l'immunité passive chez les ruminants. I: PASTORET, P.P.; GOVAERT, A.; BAZIN, H.(Ed). **Immunologie Animale, Medicine-Sciences**. Paris: Flammarion, 1990. p. 596-599.

LOPEZ, A.; HITOS, F.; PERZ, A.; NAVARRO-FIERRO, R. R. Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 48, p. 275-277, 1984.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

MACMILLAN, A.; GREISER-WILKE, I.; MOENNING, V.; MATHIAS, L. A. Competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 97, v. 2, p. 83-85, 1990.

MARIA-PILAR, J. B.; DUDAL, S.; DORNAND, J.; GROSS, A. Cellular bioterorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 114, n. 3, p. 227-238, 2005.

McGIVEN, J. A.; TUCKER, J. D.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A; BREW, S. D.; MACMILLAN, A. P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 278, v. 1-2, p.171-178, 2003.

MEADOR, V. P.; DEYOE, B. I.; CHEVILLE, N. F. Patogénesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 26, n. 5, p. 357-368, 1989.

MEYER, M.E. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. (Ed.). **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 1-17.

MINNICK, M. B.; STIEGLER, G. L. Nucleotide sequence and comparison of the 5S ribosomal genes of *Rochalimaea henselae*, *R. quintana* and *Brucella abortus*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, n.10, p.2518, 1993.

MORENO, E.; BERMAN, D. T.; BOETTCHER, L. A. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. **Infection and Immunity**, Washington, v31, n. 1, p. 362-370, 1981.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy **Veterinary Microbiology** , Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 209–227, 2002.

MORENO, E.; MORIYÓN, I. The genus *Brucella*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.; Stackebrandt, E. (Ed). **The Prokaryotes**. Electronic version Springer, New York, 2001.

MORENO, E.; SPETH, S. L.; JONES, L. M.; BERMAN, D. T. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharide and polysaccharides. **Infection and Immunity**, Washington, v. 31, n. 1, p. 214-22, 1981.

MORENO, E.; STACKEBRANDT, E.; DORSCH, M.; WOLTERS, J.; BUSCH, M.; MAYER, H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, n.2, p. 3569–3576, 1990.

NICOLETTI, P. Further evaluation of serological procedures used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 30, n. 10, p. 1811-1821, 1969.

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

NIELSEN, K., SMITH, P., YU, W., NICOLETTI, P., ELZER, P., VIGLIOCCO, A., SILVA, P., BERMUDEZ, R., RENTERIA, T., MORENO, F., RUIZ, A., MASSENGILL, C., MUENKS, Q., KENNY, K., TOLLERSRUD, T., SAMARTINO, L., CONDE, S., BENITEZ, G. D., GALL, D., PEREZ, B., ROJAS, X., Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric Protein A–Protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam , v.101, n. 2, p.123-129, 2004.

NIELSEN, K.; HECK, F.C. ; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 2, n. 1-4, p. 197-204, 1984.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE). **Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals**. 4th. ed. 2000. cap. 2.3.1. Disponível em: <<http://www.oie.int> > Acesso em 10 de abril de 2004.

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

PALMER, M. V.; CHEVILLE, N .F.; JENSEN, A. E. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic and aerologic findings. **Veterinary Pathology**, Basel, v.33, n.6, p. 682-691. 1996.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E.V. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, n. 2, p.91-99, 2006.

PERRY, M. B.; BUNDLE, D. R. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*. In: ADAMS, L.G. (Ed.). **Advances in Brucellosis Research**. Austin: Texas A & M University, 1990. p. 76-88.

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

RAJASHEKARA, G.; GLASNER, J. D.; GLOVER, D.A.; SPLITTER, G. A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 15, p. 5040-5051, 2004.

RICHMAN, D. D.; CLEVELAND, P. H.; OXMAN, M. N.; JOHNSON, K. M. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 128, n. 5 , p. 2300-2305, 1982.

ROJAS, N.; FREER, E.; WEINTRAUB, A.; RAMÍREZ, M.; LIND, S.; MORENO, E. Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.1, n. 2, p.206-213, 1994.

SAEGERMAN, C.; DE WAELE, L.; GILSON, D.; GODFROID, J.; THIANGE, P.; MICHEL, P.; LIMBOURG, B.; VO, T.K.; LIMET, J.; LETESSON, J.J.; BERKVEN, D. Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and Protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.100, n. 1-2, p. 91-115, 2004.

SAMARTINO, L.; ENRIGHT, F. M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**. Oxford, v. 16, n.2 , p. 95-101, 1993.

SAMARTINO, L.; GALL, D.; GREGORET, R.; NIELSEN, K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of brucellosis bovine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.70, n. 3-4, 193-200, 1999.

SARKARI, B.; CHANCE, M.; HOMMEL, M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterization of a carbohydrate antigen. **Acta Tropica**, Basel, v. 82, n.3, p.339-348, 2002.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.139, n. 1, p. 221-227, 1987.

SIKKEMA, W. D. An Fc-binding protein. **American Biotechnology Laboratory**, Shelton v. 7, p. 22-23, 1989.

SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.P.; PAJUABA NETO, A.A.; FERRO, E.A.V.; MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.107, n.3, p.181-195, 2002.

TEMPLETON, J. W. Natural resistance to bovine brucellosis. In: ADAMS, L. G. (Ed.) **Advances in Brucellosis Research: an International Symposium**. Texas: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p. 144-150.

THOMAS, H. I.; MORGAN-CAPNER, P. Rubella-specific IgG1 avidity: a comparison of methods. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.1, n. 2-3, p. 219-228, 1991.

TIBOR, A.; DECELLE, B.; LETESSON, J. J. Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp 19 of *Brucella* spp are lipoproteins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4960-4962, 1999.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4356, 1979.

TSAI, C.M.; FRASH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v.119, n. 1, p. 115-119. 1982.

UZAL, F. A., CARRASCO, A. E., NIELSEN, K., ECHAIDE, S., CABRERA, R. F. An ELISA using a monoclonal antiIgG₁ enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n. 1-2, p. 175-180, 1996.

VELASCO, J.; BENGOCHEA, J. A.; BRANDENBURG, K.; LINDNER, B.; SEYDEL, U.; GONZALEZ, D.; ZÄHRINGER, U.; MORENO, E.; MORIYÓN, I. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative *Ochrobactrum* spp, differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 6, p.3210-3218, 2000.

VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; GRAYON, M. *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 35, p. 292-295, 1985. não achei

VERONEZI, R. H. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6.ed. Guanabara-Koogan, 1976. 421. p.

WIUFF, C.; THORBERG, B. M.; ENGVALL, A.; LIND, P. Immunochemical analyses of serum antibodies from pig herds in a *Salmonella* non-endemic region. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam ,v. 85, n.1, p. 69-82, 2002.

YAGUPSKY, P. Detection of Brucellae in blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington , v. 37, n. 11, p.3437-3442, 1999.

YOUNG, E. J. An overview of human brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 21, n. 2, p. 283-290, 1995.

ZAHAN, Y.; YANG, J.; CHEERS, C. Cytokines response of T-cell subsets from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n.7, p. 2841-2847, 1993.

.