



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas-Laboratório de
Imunoparasitologia
Campus Umuarama- Bloco 4C- Uberlândia-MG
Brasil – 38400-902**

Telefone: (34)3218-2195 – Telefax: (34)3218-2333



**Determinação da reatividade diferencial de anticorpos de bovinos
vacinados com a cepa S19 de *Brucella abortus* e naturalmente
infectados através de análises imunoproteômicas**

Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba

UBERLÂNDIA-MG

Agosto-2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas-Laboratório de
Imunoparasitologia
Campus Umuarama- Bloco 4C- Uberlândia-MG
Brasil – 38400-902**

Telefone: (34)3218-2195 – Telefax: (34)3218-2333



**Determinação da reatividade diferencial de anticorpos de bovinos
vacinados com a cepa S19 de *Brucella abortus* e naturalmente
infectados através de análises imunoproteômicas**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor.

Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Co-orientadora: Profa. Dra. Deise Aparecida Oliveira Silva

UBERLÂNDIA-MG

Agosto-2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- P151d Pajuaba, Ana Cláudia Arantes Marquez, 1967-
Determinação da reatividade diferencial de anticorpos de bovinos vacinados com a cepa S19 de *Brucella abortus* e naturalmente infectados através de análises imunoproteômicas / Ana Cláudia Arantes Marquez. - 2010.
87 f. : il.
- Orientador:..José Roberto Mineo.
Co-orientadora: Deise Aparecida Oliveira Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Brucelose em bovino - Diagnostico - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Silva, Deise Aparecida Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 619:616.981.42-071

Dedicatória

À *Deus*,

Pela vida,

Pelas oportunidades de estudo e trabalho,

Pela força de continuar a caminhar diariamente e incessantemente

em busca de metas e sonhos, da felicidade e da consolidação do Amor Universal.

A meus pais *Vasco* e *Edna*,

Pelos princípios fundamentais que alicerçaram o meu caráter, minha personalidade,

Embasados no amor, na honestidade e na verdade.

A meu marido *Adalberto*,

Pelo amor, amizade e cumplicidade durante toda a nossa jornada,

Pelas horas em que acalentou nossos filhos para que eu pudesse estudar,

Pela paciência de esperar o findar desta etapa.

A meus filhos, *Ana Júlia*, *João Pedro* e *Maria Clara*,

Meus “tesouros” de amor e agradecimentos,

Pelas ausências, pelos passeios não realizados,

Mais pela certeza de que estarão no meu coração.

“Tudo nesta vida é passageiro, menos a fê, o amor, a amizade, a esperança de conquistar a felicidade e poder acreditar que ao findar de cada dia, uma parte de nossa missão foi finalizada, se bem cumprida, caberá somente a Deus avaliar”

Agradecimentos especiais

Ao meu Orientador,

Prof. Dr. *José Roberto Mineo*,

Por me receber no Laboratório de Imunoparasitologia,

Acreditando na minha capacidade, incentivando-me nos momentos difíceis,

Propondo sempre uma alternativa para a solução de questionamentos.

À minha amiga e Co-Orientadora

Profa. Dra. *Deise Aparecida de Oliveira Silva*

Por estar sempre disposta a auxiliar em todos os momentos,

Oferecendo uma amizade sincera,

Transmitindo ensinamentos científicos e morais valiosos.

Agradecimentos

Aos companheiros de trabalho *Zilda, Marley, Max* e *Edilge*, pela amizade e auxílio na rotina laboratorial.

Às grandes amigas, *Cristina* e *Celene*, pela ajuda, apoio e solicitude no transcorrer do curso de Pós-Graduação.

Aos funcionários do curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia, *Lucineide* e *Lucélia*, pela colaboração e desprendimento nos momentos necessários.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia e Alergia, os que já terminaram e aos que estão trilhando os caminhos do conhecimento científico, *Hercílio, Silas, Arlindo, Fernanda, Priscila, Leandro, Rafael, Karine, Helena*, ..., pelos momentos de alegria, auxílio e aprendizado.

Aos Professores *Dr. Jair Pereira da Cunha Junior* e *Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo*, pelas idéias, ensinamentos e confiança.

Ao Professor *Dr. Carlos Priminho Pirovani*, pela solicitude e disponibilidade na realização das análises de espectrometria.

À Professora *Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro*, pela confiança e amizade no decorrer deste período, pela sua determinação na concepção do maravilhoso trabalho como Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – UFU.

À Professora *Dra. Neide Maria da Silva*, parabênizo pela sua exemplar conduta ética e dedicação à pesquisa científica, e agradeço pela amizade e valiosos conselhos.

Agradecimentos

Ao *Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas*, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia pela contribuição à minha formação acadêmica e científica..

A *CAPES, FAPEMIG* e ao *CNPq*
pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

*“Deus nos concede, a cada dia, uma página
de vida nova no livro do tempo. Aquilo que
colocarmos nela, corre por nossa conta”*

(Francisco Cândido Xavier)

LISTA DE ABREVIACÕES

1-D	Unidimensional
2-D	Bidimensional
AAT	Teste do antígeno acidificado tamponado
AAT	Teste do antígeno acidificado tamponado
ACN	Acetonitrila
APC	Célula apresentadora de antígeno
Bfr	Ferritina bacteriana
BPAT	Teste de aglutinação em placa com antígeno tamponado
CD	<i>Cluster differentiation</i>
cELISA	Ensaio imunoenzimático competitivo
CFT	Teste de fixação do complemento
CID	Fragmentação induzida por colisão
DAB:	diaminobenzidina
DCs	Células dendríticas
Dps	Proteína de proteção da fase estacionária de DNA na carência de nutrientes
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
FPA	Teste de polarização de fluorescência
GTPases	Enzimas hidrolases que se ligam e hidrolizam guanosina trifosfato (GTP)
IA	Índice de avides
IEF	Focalização isoeletrica
iELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
IFN-γ:	Interferon- γ
Ig	Imunoglobulina

IL	Interleucina
IL-12	Citocina IL-12
IPG	Tira com gradiente de pH imobilizado – ReadyStrip™ IPG Strips
kDa	kiloDaltons
Linfócitos T$\gamma\delta$	Linfócitos T com receptor $\gamma\delta$
Linfócitos Th0	Linfócitos T <i>helper naive</i>
Linfócitos Th1	Linfócitos T <i>helper 1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de ataque à membrana
<i>Mr</i>	Massa molecular aparente
MS	Espectrometria de massa
MW	Peso molecular
Ndpk-I	Nucleosídeo difosfato quinase
NK	Célula <i>natural killer</i>
OMPs	Proteínas de membrana externa de <i>Brucella</i> spp
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	Solução salina tamponada
PBS-T	Solução salina tamponada contendo Tween 20 0,05%
PBS-TM	Solução salina tamponada contendo Tween 20 0,05%, leite desnatado 1%
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>pI</i>	Pontos isoelétricos
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
PS	Polissacarídeo
RBT/CT	Teste rosa Bengala/ <i>card test</i>
R-LPS	Lipopolissacarídeo da superfície de colônias de bactérias de morfologia rugosa

ROIs	Intermediários reativos de oxigênio
SAT	Teste de aglutinação do soro
SAT/2-Mercaptoetanol	Prova de aglutinação com agentes redutores
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Sod	Superóxido desmutase
SPs	Proteínas de superfície de <i>Brucella</i> spp
TLRs	Receptores de reconhecimento padrão tipo <i>Toll-like</i>
TX-114	Triton X-114

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Brucelose	15
1.2 Etiologia.....	16
1.3 Epidemiologia.....	18
1.4 Aspectos clínico-patológicos.....	19
1.5 Fatores de virulência de <i>Brucella</i> spp.....	22
1.6 Composição antigênica de <i>Brucella</i> spp.....	23
1.7 Resposta imune.....	24
1.8 Ensaaios diagnósticos validados	26
1.8.1 Métodos diretos.....	26
1.8.2 Métodos indiretos.....	27
1.9 Ensaaios diagnósticos baseados na afinidade de proteínas ligantes de imunoglobulinas.....	30
1.10 Ensaaios de diagnósticos baseados na avidéz de anticorpos.....	30
1.11 Imunoproteômica.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Amostras de soros bovinos.....	34
3.2 Cepa de <i>B. abortus</i>	34
3.3 Extração do antígeno solúvel de <i>B. abortus</i> por Triton X-114 (Antígeno TX-114).....	35
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	35
3.4.1 Eletroforese unidimensional (1-D).....	35
3.4.2 Eletroforese bidimensional (2-D).....	36
3.5 Immunoblot 1-D e 2-D.....	37
3.5.1 Immunoblot-avidéz 1-D.....	38
3.6 Espectrometria de massa (MS).....	38
3.6.1 Digestão das proteínas em gel 2-D	39
3.6.2 Análise de MS.....	39
3.6.3 Análise <i>in silico</i>	40

3.7 Análise estatística	40
3.8 Normas de biossegurança.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Dosagem de proteínas no antígeno solúvel TX-114 de <i>B. abortus</i>	41
4.2 Perfil eletroforético 1-D e antigênico do antígeno solúvel TX-114 de <i>B. abortus</i>	41
4.3 Análise da frequência de sororeatividade por <i>Immunoblot</i> 1-D	44
4.4 <i>Immunoblot</i> -avidez 1-D do antígeno solúvel TX-114 de <i>B. abortus</i>	47
4.5 Perfil eletroforético 2-D e antigênico do antígeno solúvel TX-114 de <i>B. abortus</i>	54
4.6 Identificação de peptídeos do antígeno solúvel TX-114 de <i>B. abortus</i> por espectrometria de massa	64
5 DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar uma nova preparação antigênica de *Brucella abortus* obtida pela extração com o detergente Triton X-114 (TX-114) por análise imunoproteômica e *immunoblot*-avidez, utilizando os conjugados de detecção anti-IgG bovina e Proteína A, marcados com peroxidase. Amostras de soros de três grupos de bovinos foram analisadas: (GI) 30 vacas soropositivas não-vacinadas; (GII) 30 novilhas soropositivas e vacinadas com *B. abortus* S-19; (GIII) 30 vacas soronegativas não-vacinadas. Os perfis eletroforéticos unidimensionais (1-D) e bidimensionais (2-D) do antígeno TX-114 revelaram amplo espectro de polipeptídeos (10 a 79 kDa), e *immunoblot* 1-D mostrou um extenso perfil de reatividade por soros de GI comparado a um perfil mais restrito por soros de GII, independente dos conjugados de detecção utilizados. Anticorpos IgG de alta avidez foram detectados em soros de GI por ambos os conjugados analisados, mas Proteína A/peroxidase mostrou maior capacidade de detectar anticorpos IgG2 de baixa avidez em soros de GII. Cinco componentes antigênicos imunodominantes (24, 28, 35, 47 e 52 kDa) foram predominantemente reconhecidos por anticorpos IgG de alta avidez em GI, em adição a três componentes antigênicos não imunodominantes reconhecidos exclusivamente por soros deste grupo (10, 12 e 17 kDa), sendo considerados como potenciais marcadores de infecção e exclusão de resposta vacinal. A caracterização proteômica revelou 42 *spots* no gel 2-D e permitiu a identificação de 22 proteínas citoplasmáticas hipotéticas, enquanto o *immunoblot* 2-D demonstrou sororeatividade de polipeptídeos abaixo de 20 kDa exclusivamente com soros de GI. A análise por espectrometria de massa destes polipeptídeos permitiu a identificação de cinco proteínas antigênicas de *B. abortus* (Bfr, Dps/Ndpk-I, Sod e Proteína B de invasão), das quais Ndpk-I e proteína B de invasão foram identificadas em cepa vacinal de *B. abortus* S-19 pela primeira vez no presente estudo, e relacionadas com a antigenicidade em amostras soropositivas de bovinos não vacinados. Em conclusão, a análise imunoproteômica deste novo antígeno solúvel de *B. abortus* permitiu a caracterização de várias proteínas antigênicas da cepa S-19 que podem ser candidatas ao sorodiagnóstico da brucelose bovina e diferenciação entre animais vacinados e infectados. A avaliação da avidez de anticorpos IgG2 específicos a marcadores antigênicos do antígeno TX-114 pode ser também considerada como ferramenta adicional para permitir melhor distinção sorológica no perfil de afinidade funcional de anticorpos IgG em resposta à infecção e vacinação na brucelose bovina.

Palavras-chaves: *Brucella abortus*. Imunoproteômica. Eletroforese 2-D. *Immunoblot*-avidez. Triton X-114. Bovinos

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize a new soluble antigen of *Brucella abortus* obtained by Triton X-114 (TX-114) extraction by immunoproteomic analysis and immunoblot-avidity, using the detection conjugates anti-bovine IgG and Protein A labeled with peroxidase. Serum samples of three groups of bovine were studied: (GI) 30 non-vaccinated seropositive cows; (GII) 30 S19-vaccinated seropositive heifers; (GIII) 30 non-vaccinated seronegative cows. The one dimensional (1-D) and two dimensional (2-D) electrophoretic profiles of the TX-114 antigen revealed a broad spectrum of polypeptides (10 to 79 kDa), and 1-D immunoblot showed a widespread profile of reactivity by sera of GI compared with a more restricted profile by sera of GII, regardless of the detection conjugate. High avidity IgG antibodies were detected in sera of GI by both conjugates analyzed, but Protein A/peroxidase showed higher ability to detect low avidity IgG2 antibodies in sera of GII. Five major antigenic components (24, 28, 35, 47 and 50 kDa) were predominantly recognized by high avidity IgG antibodies in sera of GI, in addition to three minor antigenic components (10, 12 and 17 kDa) that were recognized exclusively by sera of this group, and so considered potential markers of infection and exclusion of vaccinal response. The proteomic characterization revealed 42 spots in 2-D gel, being possible to identify 22 hypothetical cytoplasmic proteins, while the 2-D immunoblot showed reactivity of polypeptides below 20 kDa exclusively with sera of GI. The analysis by mass spectrometry of these polypeptides was able to identify five antigenic proteins of *B. abortus* (Bfr, Dps/Ndpk-I, Sod, and Protein B of invasion), from which Ndpk-I and Protein B of invasion were identified in vaccinal S19 strain on the first time in the present study, and were related with the antigenicity in seropositive samples of non-vaccinated bovine. In conclusion, the immunoproteomic analysis of this new soluble antigen of *B. abortus* permitted the characterization of several antigenic proteins of the vaccinal S19-strain that could be candidates for the serodiagnosis of bovine brucellosis and the differentiation between vaccinated and infected animals. The evaluation of avidity of IgG2 antibodies to antigenic markers of the TX-114 antigen can also be considered an additional tool for a better serological distinction in the profile of functional affinity of IgG antibodies in response to infection and vaccination in bovine brucellosis.

Keywords: *Brucella abortus*. Immunoproteomic. 2-D electrophoresis. Immunoblot-avidity Triton X-114. Bovine.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Brucelose

Brucelose é uma doença infecciosa crônica que afeta ampla variedade de mamíferos domésticos, selvagens e marinhos, especialmente os animais domésticos produtores de alimentos (caprinos, bovinos, suínos), tendo o homem como hospedeiro acidental e constituindo em importante zoonose com distribuição mundial (CORBEL, 2006). É considerada doença emergente ou re-emergente, causando aborto infeccioso e infertilidade em animais domésticos e infecção crônica debilitante no homem, que pode persistir intermitentemente por anos (MARIA-PILAR et al., 2005; CARVALHO-NETA et al., 20010; WHATMORE, 2009; OIE, 2009).

A brucelose bovina, também denominada de aborto infeccioso, está associada à habilidade da bactéria em induzir o aborto em fêmeas gestantes, principalmente no último trimestre da gestação, bem como mortalidade fetal e infertilidade no rebanho, ocasionando grandes prejuízos econômicos (MARIA-PILAR et al., 2005; CARVALHO NETA et al., 2009). Em fêmeas não gestantes, a doença é geralmente assintomática (OIE, 2009). No homem, manifesta-se como doença aguda febril (febre ondulante ou febre de Malta), podendo progredir para a forma crônica, produzindo complicações severas em diversos órgãos, como também incapacidade parcial ou total para o trabalho (BRASIL, 2006a; OIE, 2009).

Apesar de a doença possuir natureza insidiosa e não específica, em conjunto com a dificuldade de manipulação da bactéria, sua importância é frequentemente mascarada por outras doenças relevantes, sendo subdiagnosticada e não reportada de forma eficaz (CORBEL, 1997; BOSCHIROLI et al., 2001; FRANCO et al., 2007). Brucelose permanece endêmica em muitas áreas do mundo, sendo que a doença tem sido descrita como controlada em rebanhos do norte da Europa, Austrália, Estados Unidos e Canadá, após a aplicação de programas de controle por longos períodos e alto custo pelos órgãos sanitários. Entretanto, o estabelecimento de um controle completo, expresso pela erradicação da doença, torna-se um evento complexo considerando-se a existência de reservatórios silvestres (BOSCHIROLI et al., 2001; WHATMORE, 2009).

Devido ao seu potencial epidêmico, à ausência de vacinas para humanos, à existência de 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 a ser utilizado em atividades de bioterrorismo (KAUFMANN; MELTZER; SCHIMID, 1997).

1.2 Etiologia

Brucella spp, agente etiológico da brucelose, pertence ao subgrupo α -2 da classe Proteobacteria (VELASCO et al., 2000; MORENO; CLOECKAERT; MORIYÓN, 2002), sendo considerado um cocobacilo Gram-negativo, imóvel, não capsulado, aeróbico, intracelular facultativo ou mais apropriadamente descrito como um patógeno intracelular facultativamente extracelular (YOUNG, 1995; GORVEL; MORENO, 2002). Durante as últimas décadas, taxonomistas desenvolveram um sistema de classificação baseado principalmente nas diferenças em patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas (Tabela 1), consistindo em seis espécies: *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *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, como aprovado pelo Comitê Internacional em Sistemática de Procariotas – Subcomitê de Taxonomia da *Brucella* (<http://www.theicsp.org/subcoms/Brucella.htm>; OIE, 2009). Além disso, isolados de *Brucella* spp de mamíferos marinhos foram recentemente identificados, tendo sido classificados em duas novas espécies, *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, baseados nos hospedeiros preferenciais, cetáceos e pinípedes, respectivamente, em adição a uma nova cepa isolada em roedores silvestres (*Microtus arvalis*) na Europa Central, nomeado de *B. microti* (SCHOLZ et al., 2008; OIE, 2009) (Tabela 1).

É importante enfatizar que os membros do gênero *Brucella* possuem aproximadamente 94% de homologia genética (VERGER et al., 1987; DELVECCHIO et al., 2002), sendo que o sequenciamento do genoma total da *Brucella* spp, incluindo *B. melitensis* (DELVECCHIO et al., 2002), *B. suis* (PAULSEN et al., 2002), *B. abortus* (HALLING et al., 2005; CRASTA et al., 2008) e *B. ovis* (TSOLIS et al., 2009) tem demonstrado baixa variabilidade genética.

De acordo com Cloeckert e colaboradores (1998), as principais espécies patogênicas para os animais são *B. melitensis* (brucelose caprina e ovina), *B. abortus* (brucelose bovina) e *B. suis* (brucelose suína). Apesar da relativa adaptação de *Brucella* spp aos seus hospedeiros, este microorganismo possui potencial zoonótico importante, sendo que as principais espécies que infectam o homem, em ordem crescente de patogenicidade, são *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis* (HARTIGAN, 1997; LUCERO et al., 2007).

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, 2006a).

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	-	-	+
<i>B. ceti</i>	-	-	-	+	+	+	- ^e	-
<i>B. pinnipedialis</i>	-	+	-	+	+	+	- ^e	-
<i>B. microti</i>	-	-	-	+	+	-	+	-

^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: Adaptado de Alton e Forsyth (1996); OIE (2009).

1.3 Epidemiologia

A brucelose bovina causada por *B. abortus* é endêmica em todo o território do Brasil, afetando rebanhos leiteiros, de corte e bubalinos.

Apesar da carência de dados relativos à prevalência e distribuição regional da brucelose, são observadas diferenças na sua prevalência entre os vários estados da Federação (BRASIL, 2006a). A situação da brucelose bovina no Brasil demonstrou a seguinte prevalência: 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; POESTER et al., 2002). Levantamentos sorológicos subseqüentes 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 manteve entre 4% e 5% no período entre 1989 e 1998 (BRASIL, 2006a). Após a implantação do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2004), foi realizado um novo inquérito sorológico no período de 2001 a 2004, em 13 unidades Federativas, confirmando que a doença continua disseminada de forma heterogênea, com tendência de aumento da prevalência nas regiões Centro-Oeste e Norte do país (BRASIL, 2006b). No estado de Minas gerais, em decorrência da campanha de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinas com a vacina B19, a partir de 1993, foi observada uma diminuição significativa da doença (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006a). A baixa prevalência da brucelose no estado de Santa Catarina (0,34%) possibilitou a implantação de estratégias de erradicação da doença (BRASIL, 2006b).

Dentre os fatores relevantes na prevalência da brucelose, a idade se destaca, sendo mais susceptíveis as fêmeas púberes não vacinadas, que podem abortar durante a primeira gestação. Em bovinos e outros Bovidae, *Brucella* é freqüentemente transmitida pelo contato com material procedente de aborto, parto de animais infectados e durante todo o período puerperal, que concentram uma grande quantidade de bactérias (BRASIL, 2006a; CORBEL, 2006). A principal via de infecção para animais susceptíveis é a ingestão de gramíneas, água e outros alimentos contaminados pela bactéria (BRASIL, 2006a; LAGE et al., 2006). Outros modos de infecção como a inalação, contaminação de pele e mucosa conjuntival, uso de ordenhadeiras contaminadas com leite infectado ou mesmo o aleitamento artificial com colostro contaminado podem transmitir a bactéria, difundindo a doença no rebanho (CORBEL, 2006). A transmissão sexual pela monta natural não é relevante na epidemiologia da brucelose bovina, entretanto, a inseminação artificial pode transmitir a doença, uma vez que o sêmen

contaminado por *B. abortus* é depositado diretamente no útero da fêmea, sendo portanto, altamente infeccioso (CORBEL, 2006; LAGE, 2008).

Não há transmissores nem vetores especiais, sendo os animais doentes os principais reservatórios, eliminando a bactéria pelos fluidos e anexos fetais desprendidos durante o parto ou abortamento e durante todo o puerpério, pelo leite e sêmen (BRASIL, 2006a).

A espécie humana geralmente adquire a brucelose pelo consumo de leite não pasteurizado e derivados lácteos, sendo a mucosa digestiva a principal via de acesso para *Brucella* spp (OIE, 2009). Pode ocorrer também a penetração percutânea, pela 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; CORBEL, 2006). A brucelose humana é essencialmente uma doença zoonótica, portanto o controle e a prevenção da brucelose em animais são fundamentais para erradicação da doença no homem (CARVALHO-NETA et al., 20010).

1.4 Aspectos clínico-patológicos

Membros do gênero *Brucella* estão adaptados em seus hospedeiros, possuindo mecanismos patogênicos semelhantes aos dos parasitos intracelulares, ainda que a via de exposição natural possa variar 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).

A definição clássica da *Brucella* como bactéria intracelular facultativa não define sua verdadeira natureza, sendo mais apropriada a designação de patógeno intracelular/facultativamente extracelular, visto que o microambiente preferencial da bactéria é o nicho endossomal intracelular da célula hospedeira, o qual sustenta sua extensiva replicação (GORVEL; MORENO, 2002). *B. abortus* apresenta um tropismo por trofoblastos, pulmão fetal, trato reprodutivo feminino e masculino, infectando preferencialmente macrófagos, sendo que a base para a cronicidade da infecção reside na sua capacidade em sobreviver por prolongados períodos dentro do compartimento fagossomal das células hospedeiras, (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO, 2004; ROOP et al., 2004; OIE, 2009).

De maneira similar a outros agentes patogênicos intracelulares, *Brucella* necessita de quatro fatores para garantir seu sucesso como microorganismo infeccioso: aderência, invasão, replicação e disseminação dentro do hospedeiro (KO; SPLITTER, 2003).

Os mecanismos utilizados pela bactéria para causar a doença não estão bem esclarecidos, sendo que a diversidade das lesões patológicas em animais domésticos pode ser 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).

Após a internalização da *Brucella* pelos fagócitos, as cepas virulentas conseguem evadir dos mecanismos bactericidas intracelulares, ocorrendo um redirecionamento da bactéria para compartimentos membranosos, definido como via endocítica clássica, a qual está primariamente localizada nos endossomos primários. Subsequentemente, a fusão com lisossomas é impedida, o que possibilita a replicação da *Brucella* no interior do fagossoma, ou também designado de *brucellassoma* (ROOP et al., 2004; MARIA-PILAR et al., 2005; LAMONTAGNE et al., 2009).

Estudos genéticos e bioquímicos indicam a exposição da *Brucella* aos processos microbicidas oxidativos do fagócito hospedeiro logo após a sua entrada, particularmente quando a bactéria encontra-se opsonizada com anticorpos IgG e/ou os macrófagos são ativados por interferon- γ (IFN- γ), limitando portanto, a progressão dos vacúolos contendo *Brucella* para a via endossomal-lisossomal (PHILLIPS; ROOP, 2001; ROOP et al., 2004).

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, 2006a). 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, com

subseqüente migração da glândula mamária para os vasos linfáticos e linfonodos supramamários (ADAMS, 2002).

O tropismo de *Brucella* para os tratos reprodutivo 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, no entanto, a eliminação deste patógeno ocorrer novamente após um parto normal. Vacas infectadas podem eliminar a bactéria através do colostro e leite (GORVEL; MORENO, 2002; FAO/WHO, 2004). O aborto e expulsão do feto são resultantes da placentite causada pela bactéria que, após invadir e proliferar nos tecidos uterinos induz 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 (PALMER; CHEVILLE; JENSEN, 1996). Apesar destas alterações anátomo-patológicas, o mecanismo preciso do aborto não está completamente elucidado, uma vez que a placenta, além de concentrar a bactéria oriunda da circulação materna, também pode ser considerada um sítio privilegiado para a sua multiplicação. Estes achados têm suscitado questionamentos sobre o real tropismo de *Brucella* em relação à placenta (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993; ADAMS, 2002). *B. abortus* pode induzir a produção de altas concentrações de cortisol com decréscimo nas concentrações de progesterona e aumento na liberação de estrógeno que pode ocasionar um parto prematuro (ENRIGHT 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).

1.5 Fatores de virulência de *Brucella* spp

Brucella não possui fatores de virulência clássicos encontrados em outras bactérias patogênicas como exotoxinas, citolisinas, cápsula, fímbrias, flagelo, plasmídeos, fagos lisogênicos, variações antigênicas, exoproteases, assim como outras formas de resistência ou indutoras de apoptose da célula hospedeira (MORENO; MORIYON, 2002). Os produtos gênicos requeridos para a sobrevivência, multiplicação e patogênese de *B. abortus* no microambiente fagocítico da célula hospedeira indicam a expressão de genes de virulência em resposta às alterações neste meio intracelular (LIN; FICHT, 1995; WAGNER et al., 2002). Desta forma, os fatores de virulência encontrados em *Brucella* são determinantes moleculares que auxiliam na invasão, na sobrevivência e replicação intracelular, possibilitando a evasão aos mecanismos microbicidas da célula hospedeira (ADAMS, 2002; MORENO; MORIYON, 2002).

O genoma da *Brucella* consiste de dois cromossomas circulares sem plasmídeos, sugerindo uma marcante diferença com genomas de outras bactérias (MICHAUX et al., 1993). A avaliação recente de ferramentas genéticas para a manipulação do genoma da *Brucella* tem permitido a identificação de fatores de virulência a nível molecular (LAMONTAGNE et al., 2009). A análise do genoma das três espécies mais patogênicas confirmou a ausência de seqüências funcionais para vários fatores de virulência, incluindo os sistemas de secreção dos tipos I, II e III (MORENO; MORIYÓN, 2002; KO; SPLITER, 2003). Entretanto, foram descobertas algumas seqüências gênicas para virulência, como a presença de genes para sistemas de secreção alternativos tipo IV (*virB*) e V e sistemas incompletos tipo III (MORENO; MORIYÓN, 2002; KO; SPLITER, 2003; MARIA PILAR et al., 2005). O recrutamento de actina e a ativação de pequenas GTPases durante a internalização requerem um sistema regulatório composto de dois componentes: BvrR, uma proteína regulatória, e BvrS, uma proteína da superfamília de histidina-quinase (CARVALHO-NETA et al., 2010). Este sistema é responsável pela regulação da expressão de proteínas da membrana externa (OMPs) relacionadas ao processo de invasão da célula hospedeira (LÓPEZ-GONI et al., 2002; GUZMAN-VERI et al., 2002).

Já foi relatada a presença de proteínas *heat-shock* induzidas em resposta às alterações sofridas pela bactéria durante a sua permanência no compartimento intracelular da célula hospedeira, bem como a expressão da protease *Lon*, importante para a sobrevivência da bactéria na fase inicial da infecção (KO; SPLITER, 2003) e a expressão de proteínas (Asp24 e Asp60) em resposta à acidificação do fagossoma (LIN; FICHT, 1995). A proteína superóxido dismutase (*Sod*) desempenha um papel importante na sobrevivência intracelular da *Brucella*,

participando de um sistema de defesa antioxidante, protegendo a bactéria dos efeitos microbicidas dos intermediários reativos de oxigênio (ROIs) (KO; SPLITER, 2003). Portanto, *Brucella* expressa genes de virulência que participam na dinâmica da interação hospedeiro-patógeno, induzindo a expressão de moléculas que podem alterar a fagocitose, a fusão fagolisossomal, secreção de citocinas e apoptose (MARIA-PILAR et al., 2005).

1.6 Composição antigênica de *Brucella* spp

Vários componentes antigênicos de *Brucella* já foram bem caracterizados, sendo que o antígeno imunodominante de superfície é de natureza lipopolissacarídea (LPS) (CORBEL, 1997), estando relacionado com a morfologia das colônias lisas (S-LPS) como os biovars de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. neotomae*, ou colônias rugosas (R-LPS) características de *B. ovis* e *B. canis* (ALTON et al., 1988; MEYER, 1990; ALTON; FORSYTH, 1996).

B. abortus possui LPS peculiar como 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 - *smooth*), o S-LPS compreende um lipídeo bifosforilado (lipídeo A) e um polissacarídeo hidrofílico (PS), localizado mais externamente na parede bacteriana (FREER et al., 1995; CAROFF et al., 2002; CAROFF; KARIBIAN, 2003). O PS consiste de duas regiões distintas composto de uma cadeia de oligossacarídeos e uma cadeia-O, representado por um homopolímero de aproximadamente 100 resíduos (4-formamido-4,6-dideoxi-D-manopiranosil [N-formilperosamine]). A cadeia PS está associada ao lipídeo A (CAROFF et al., 1984; PERRY; BUNDLE, 1990; ROJAS et al., 1994; CORBEL, 1997). 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).

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 28 a 36 kDa como proteínas do tipo porina do grupo 2 e de 31-34 e 25-27 kDa como proteínas do grupo 3 (CLOECKAERT et al., 2002). OMPs e outras proteínas da membrana interna, assim como as 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, 1999). As proteínas

ribossomais L7/L12 foram também pesquisadas como importantes componentes imunológicos por estimularem respostas humorais e celulares, conferindo proteção contra *Brucella* (CORBEL, 1997; OLIVEIRA; SOEURT; SPLITTER, 2002). Proteínas de superfície de *Brucella* (SPs) associadas com a aderência ou invasão de células epiteliais humanas e de animais já foram também identificadas e caracterizadas (CASTANEDA-RALDAN et al., 2006).

1.7 Resposta imune

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

A imunidade inata representa uma resposta não específica durante o estágio inicial da infecção, com a participação de células *natural killer* (NK), sistema complemento e fagócitos (macrófagos e neutrófilos), sendo fundamental durante a infecção por *B. abortus*, pois o desenvolvimento da imunidade adaptativa está relacionado ao controle do número inicial de bactérias (KO; SPLITTER, 2003; CARVALHO-NETA et al., 2010).

B. abortus ativa neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e outros tipos celulares, estimulando a expressão de moléculas de adesão e a secreção de citocinas pró e antiinflamatórias, envolvendo interações com receptores de reconhecimento padrão da superfície da célula hospedeira tipo Toll-like (TLRs) com moléculas conservadas da bactéria (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) (CAMPOS et al., 2004; WEISS et al., 2005). O reconhecimento do LPS de *B. abortus* envolve a interação com as moléculas de superfície CD14 e TLR-4 em DCs, com a indução da citocina IL-12 que direciona a diferenciação de linfócitos Th0 para linfócitos efetores Th1 e de memória (CAMPOS et al., 2004). A ativação de DCs durante a infecção por *B. abortus* resulta em importante via de regulação da resposta imune, com indução de IFN- γ pelos linfócitos T e secreção de IL-12 pela co-estimulação de CD-14 (BILLARD; DORNAND; GROSS, 2007). TLR-2 and TLR-9, que reconhecem lipoproteínas e DNA bacteriano, respectivamente, interagem com componentes de *B. abortus* e estimulam resposta imune (MACEDO et al., 2008).

A citotoxicidade mediada pelas células NK é decorrente da sua ativação em virtude da liberação de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos (APC), ou seja, macrófagos e DCs 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).

B. abortus tem habilidade particular para resistir à atividade bactericida do soro não imune. 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). Durante a infecção, a resistência ao complemento e à degradação mediada por peptídeos catiônicos aumenta a sobrevivência da *Brucella* antes de sua localização no nicho intracelular (LAPAQUE et al., 2005).

A resposta imune adaptativa é crítica, pois promove memória funcional, que é a estratégia utilizada na vacinação. Os mecanismos funcionais da resposta imune adaptativa se resumem em: (1) produção de IFN- γ pelos linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e T γ δ que ativa as funções efectoras 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, 2006a). 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. Anticorpos da classe IgM são menos específicos (NIELSEN et al., 1984; 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 ocorrer 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). Em estudo recente, nosso grupo correlacionou a presença de níveis mais elevados de anticorpo IgG2 anti-*B. abortus* em soro de animais infectados em relação a animais vacinados, correlacionando este perfil com infecção (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010)

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, 2006a). Em fêmeas vacinadas até 8 meses de idade com S19, o nível de anticorpos decresce rapidamente, atingindo títulos inferiores a 25 UI/mL 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 2006a).

1.8 Ensaios diagnósticos validados

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 amplo espectro das manifestações clínicas mimetizando outras condições, infecciosas ou não infecciosas, contribui para a utilização e o aprimoramento das ferramentas de diagnóstico laboratorial, seja pelo emprego de métodos diretos de identificação do agente patogênico ou de métodos indiretos, como os vários testes sorológicos para pesquisa de anticorpos (YAGUPSKY, 1999).

1.8.1 Métodos diretos

Um histórico de aborto em vacas, no terço final da gestação, deve ser investigado e considerado suspeito de brucelose. Aspectos clínicos não podem ser considerados patognomônicos, entretanto, são epidemiologicamente úteis durante a ocorrência de surtos de brucelose.

A brucelose pode ser diagnosticada definitivamente pelo isolamento microbiológico do agente infectante, sendo que o resultado é considerado como padrão-ouro (*gold standard*). De acordo com a OIE (2009), 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. A reação de imunohistoquímica realizada em material de aborto ou secreção vaginal confere uma evidência presuntiva da brucelose, podendo ser confirmada por cultura (OIE, 2009).

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* (BRASIL, 2006a). Apesar do alto grau de homologia dentro do gênero *Brucella*, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos e analisados para a diferenciação entre as espécies de *Brucella* e seus biovars e a identificação de cepas vacinais (OIE, 2009). Um novo ensaio PCR-multiplex, *Bruce-ladder*, foi proposto para a identificação e diferenciação, em uma única etapa, de várias espécies de *Brucella*, incluindo as cepas vacinais *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e *B. melitensis* Rev.1 (GARCÍA-YOLDI et al, 2006; OIE, 2009). Apesar das vantagens, esta técnica é pouco utilizada, pois requer equipamentos específicos, técnicos capacitados e tem custo elevado (BRASIL, 2006a).

1.8.2 Métodos indiretos

Devido às exigências para o cultivo de *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; NIELSEN, 2002; AL DAHOUK et al., 2006; CORBEL, 2006; OIE, 2009). As técnicas sorológicas oferecem 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 intensa 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 prozona (CASSATARO et al, 2004; OIE, 2009).

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 estão sendo pesquisadas como ferramentas de diagnóstico (CORBEL, 1997; NIELSEN, 2002; McGIVEN et al., 2003; AL DAHOUK et al, 2006). Estas preparações antigênicas são frequentemente obtidas a partir de cepas lisas (S) de *B. abortus* ricas em S-LPS (AL DAHOUK et al., 2003).

Dentre os testes validados e utilizados mundialmente, destacam-se:

1.8.2.1 Testes de aglutinação

► **Teste de aglutinação do soro (SAT):** é a prova mais antiga, sendo ainda utilizada em muitos países para 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, 2009). O teste pode ser realizado em tubos ou em placas de microtitulação, 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 considerado um resultado positivo (OIE, 2009).

► **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).

► **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). Estes testes 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, 2009). 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).

1.8.2.2 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, 2009). 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, 2009). O teste está sujeito à interferência das reações de anti-complementariedade e amostras hemolisadas não podem ser utilizadas (McGIVEN et al., 2003).

1.8.2.3 Ensaios imunoenzimáticos:

► **Ensaio imunoenzimático indireto (iELISA):** numerosas variações deste teste, empregando diferentes preparações antigênicas, conjugados enzimáticos e substratos/cromógenos estão descritos na literatura (OIE, 2009), 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, 2009).

► **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 tal especificidade (NIELSEN, 2002; OIE, 2009). O cELISA utiliza anticorpo monoclonal de alta afinidade e específico para um dos epítomos da molécula PS-O de *B. abortus*, sendo que o princípio do ensaio se baseia na competição do anticorpo monoclonal com anticorpos do soro teste ao antígeno adsorvido na placa de microtitulação (NIELSEN, 2002; OIE, 2009). Variações deste ensaio têm sido validadas, utilizando conjugados de afinidade com imunoglobulinas com Proteína A e G marcados com peroxidase, com o objetivo de minimizar a variabilidade de reagentes (NIELSEN, 2008)

1.8.2.4 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). 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).

1.9 Ensaios diagnósticos baseados na afinidade de proteínas ligantes de imunoglobulinas

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; NIELSEN et al., 2007). 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 bovinos IgG1 e IgG2 anti-*Brucella* é relevante para a distinção entre animais infectados e vacinados (LAWMAN et al., 1986; PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010).

1.10 Ensaios diagnósticos baseados na avidéz de anticorpos

Durante a 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, ensaios de avidéz de IgG têm sido desenvolvidos para vários patógenos para investigar o tempo de vigência da infecção primária e diferenciar entre infecções adquiridas recentemente daquelas ocorridas em tempo mais distante (MONTROYA et al., 1997; BJÖRKMAN et al., 1999; BÉLA et al., 2008).

Em bovinos persistentemente infectados com *Salmonella dublin*, anticorpos aumentam a sua afinidade para antígenos específicos do patógeno ao longo do tempo (HANSEN et al., 2006). Entretanto, pouco é conhecido sobre a maturação da afinidade de anticorpos anti-

Brucella, particularmente para diferenciar animais infectados de vacinados. Neste contexto, nós desenvolvemos, recentemente, um ensaio de ELISA-avidez usando o antígeno S-LPS para diferenciar vacas soropositivas não-vacinadas de vacas vacinadas e nossos dados demonstraram a predominância de amostras de soros com IgG de alta avidez no primeiro grupo e IgG de baixa avidez no último (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010). Portanto, anticorpos de baixa avidez estão presentes em bovinos vacinados com *Brucella* como previamente sugerido (NIELSEN et al., 2004).

1.11 Imunoproteômica

O sequenciamento e a caracterização do genoma de diversas espécies de *Brucella* já foram bem documentados na literatura (DELVECCHIO et al., 2002; HALLING et al., 2005; CHAIN et al., 2005). Recentemente, o genoma da cepa vacinal *B. abortus* S19 foi caracterizado por Crasta e colaboradores (2008) e as informações mais relevantes estão sumarizados na Tabela 2. Vários aspectos da biologia, patogênese, virulência e especificidade de hospedeiros deste patógeno têm sido analisados por meio de uma análise proteômica (DELVECCHIO et al., 2002), seja em condições especiais de crescimento, que mimetizam o microambiente endossomal intracelular no qual a *Brucella* permanece e replica em condições desfavoráveis e estressantes (WAGNER et al., 2002), seja em condições que permitam analisar as diferenças no padrão de expressão de proteínas entre cepas virulentas e vacinais atenuadas (ESCHENBRENNER et al., 2002).

Neste contexto, a análise imunoproteômica é uma ferramenta para auxiliar a identificação de proteínas antigênicas em alta resolução, particularmente dentro do amplo espectro de proteínas expressadas pela *Brucella* (AL DAHOUK et al., 2006). Os estudos proteômicos de *B. abortus* foram primariamente conduzidos para a identificação de fatores de virulência (DELVECCHIO et al., 2002; ESCHENBRENNER et al., 2002; WAGNER et al., 2002), e há poucos relatos imunoproteômicos de *B. abortus* enfatizando a identificação de proteínas candidatas ao sorodiagnóstico (AL DAHOUK et al., 2006) ou ao desenvolvimento de vacinas (CONNOLLY et al., 2006).

Desta maneira, a caracterização de proteínas imunogênicas é um ponto crucial para a pesquisa e a compreensão das variações da resposta imune durante a infecção por *Brucella* ou após vacinação. Portanto, uma distinta seleção e caracterização da sororeatividade e imunogenicidade de várias proteínas de *Brucella* poderão levar ao desenvolvimento de testes diagnósticos que permitam responder aos principais questionamentos dos testes atualmente utilizados (AL DAHOUK et al., 2006).

Tabela 2. Características do genoma de *Brucella abortus* S19

Aspectos/propriedades	<i>B.abortus</i> S19^I	
	Cromossoma I	Cromossoma II
Tamanho (Mbp) ^a	2.12249	1.16145
Referência sequenciamento ^a	NC_010742	NC_010740
Nº genes codificam proteínas ^a	1967	1033
ORFs ^{b, c}	2.005 ²	1.057 ²
tRNA ^b	41	14
rRNA ^b	6	3
Topologia	circular	circular
Proteínas hipotéticas	408	163

^a Obtido do NCBI

^b Adaptado de Crasta e colaboradores (2008)

^c Região de leitura aberta do cromossoma (ORFs-Open Reading Frame)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar uma nova preparação antigênica de *B. abortus* obtida pela extração com o detergente Triton X-114 por análise imunoproteômica e *immunoblot*-avidez para identificar proteínas antigênicas candidatas ao sorodiagnóstico da brucelose bovina com distinção sorológica entre bovinos infectados e vacinados.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar antígeno solúvel de *B. abortus* pela extração com o detergente não iônico Triton X-114.
- Identificar as proteínas do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* por meio de eletroforese uni e bidimensional.
- Identificar componentes antigênicos por *immunoblot* uni e bidimensional reconhecidos por anticorpos IgG anti-*B. abortus* em amostras soropositivas de bovinos vacinados e não vacinados, e amostras soronegativas, utilizando os conjugados de detecção anti-IgG bovina e Proteína A, marcados com peroxidase.
- Avaliar a avidez de anticorpos IgG anti-*B. abortus* em amostras soropositivas de bovinos vacinados e não vacinados por *immunoblot* do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus*, utilizando os conjugados de detecção anti-IgG bovina e Proteína A, marcados com peroxidase.
- Identificar polipeptídeos antigênicos de *B. abortus* por espectrometria de massa como potenciais marcadores para a distinção sorológica entre bovinos vacinados e infectados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de soros bovinos

Para a realização do presente trabalho, foi coletada amostras de soros de três grupos de animais, os quais foram estabelecidos como segue:

- GI: vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose (n = 30);
- GII: novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo as amostras de soros coletadas 3 meses após a vacinação (n = 30);
- GIII: vacas não vacinadas e soronegativas para *B. abortus*, com idade superior a 24 meses, procedentes de área não endêmica para *Brucella* (n = 30).

As áreas endêmicas para brucelose estão localizadas no estado de Minas Gerais, enquanto as áreas não endêmicas ou com surtos focais estão localizadas no estado de Santa Catarina onde a vacinação contra brucelose não é praticada, sendo os rebanhos monitorados periodicamente. Os diferentes grupos foram estabelecidos em condições de campo. Desta maneira, as amostras de soros do **GI** foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Pedro Leopoldo, estado de Minas Gerais, Brasil) e Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC - São José, estado de Santa Catarina, Brasil) e as amostras do **GIII** foram procedentes somente do último. Além dos dados epidemiológicos, estes grupos também foram selecionados de acordo com a soropositividade (GI, GII) e soronegatividade (GIII) pelos testes clássicos de diagnóstico, como o teste rosa Bengala (RBT) e teste de soroaglutinação em tubos com agente redutor 2-mercaptoetanol (SAT/2ME), bem como pelo teste imunoenzimático indireto utilizando-se o antígeno S-LPS (iELISA-LPS) para detecção de anticorpos bovinos IgG anti-*B. abortus* (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010). As amostras de soros de GII foram coletadas pela equipe e/ou fornecidas pela Cooperativa Agropecuária Ltda. de Uberlândia (CALU, Uberlândia, estado de Minas Gerais, Brasil). Todas as amostras de soros foram armazenadas a -20° C até serem analisadas.

3.2 Cepa de *B. abortus*

B. abortus cepa lisa vacinal de referência S19 (Arbor-Vac, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) foi adquirida comercialmente para utilização nos protocolos de extração antigênica.

3.3 Extração do antígeno solúvel de *B. abortus* por Triton X-114 (Antígeno TX-114)

Frações antigênicas de *B. abortus* S19 foram obtidas mediante extração pelo detergente não iônico Triton X-114 (TX-114) (BORDIER, 1981; SCOTT et al., 1987; TIBOR; DECELLE; LETESSON, 1999), com as adaptações a seguir. Bactérias liofilizadas (1,0 g) foram ressuspensas em 10 mL de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2) e inativadas pelo calor (66°C por 1 hora). Após três ciclos de lavagens por centrifugação (312 x g, 15 minutos, 20°C) em PBS, o sedimento foi ressuspensão em 5 mL de solução de Tris-EDTA (20 mM Tris-HCl (pH 8,0) e 10 mM de ácido etilenodiaminotetraacético [EDTA]), sendo então submetido a dez ciclos rápidos de criólise (congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-Maria a 37°C) seguido por seis ciclos de ultra-som durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo. A seguir, foi adicionado o detergente TX-114 na concentração final de 2%, sendo a mistura incubada por 5 minutos a -20°C. Restos celulares foram removidos por centrifugação (4.000 x g, 10 minutos, 10°C) e o sobrenadante foi incubado durante 5 minutos a 37°C para permitir a separação de fases. A fase aquosa (solúvel) foi separada da fase detergente por centrifugação (13.000 x g, 10 minutos, 20°C) e clarificada pela adição de dois novos ciclos de extração com TX-114 a 2%. A fase detergente foi descartada em todas as etapas do processo de extração. Para a concentração de proteínas, 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 (1.500 x g, 15 minutos, 4°C), os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de salina tamponada com Tris 20 mM (TBS) ou somente Tris 20 mM para utilização nos ensaios eletroforéticos em uma dimensão (1-D) ou duas dimensões (2-D), respectivamente.

Após a obtenção do antígeno solúvel de *B. abortus* pela extração com TX-114, a sua concentração protéica foi determinada de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se a soroalbumina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) para a curva de referência. O antígeno solúvel TX-114 foi armazenado a -20°C.

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

3.4.1 Eletroforese unidimensional (1-D)

Para a eletroforese 1-D, o antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* foi solubilizado (v/v) em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%), aquecido a 100°C durante 3 minutos e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% e com gel de empilhamento a 5%, em condições desnaturantes e não-redutoras, segundo Laemmli (1970). Marcadores de pesos moleculares

(BenchMark™ Protein Ladder 6-200 kDa, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) foram aplicadas em paralelo. Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Sistema Hoefer Mighty Small, São Francisco, EUA), sob corrente constante de 20 mA por 1 hora.

O antígeno solúvel TX-114 foi aplicado em concentração protéica total de 10 µg por poço individual do gel e, após a separação eletroforética, o gel foi corado com nitrato de prata (BLUMM et al., 1987) para visualização do perfil protéico. Alternativamente, 32 µg de proteína total foram aplicadas em poço único do gel e, após a separação, as proteínas foram eletroforeticamente transferidas para membranas de nitrocelulose, utilizando-se um sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Suécia) por 2 horas como previamente descrito (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). As imagens dos géis 1-D foram processadas utilizando-se o programa computacional *Kodak Digital Science 1D Image* (Kodak, Rochester, EUA) para determinar as massas moleculares aparentes das proteínas em comparação com a curva de padrões de pesos moleculares.

3.4.2 Eletroforese bidimensional (2-D)

Para a eletroforese 2-D, todos os procedimentos foram realizados utilizando-se o sistema Mini Protean Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) e todos os reagentes foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories e empregados de acordo com as recomendações do fabricante.

Para os procedimentos de focalização isoeletrica (IEF), amostras do antígeno solúvel TX-114 contendo 20 µg de proteína total foram incubadas por 1 hora, sob agitação lenta, em solução tampão de reidratação (uréia 8 M, Triton X-100 2% [w/v], azul de bromofenol 0,0025%, ditiotretol [DTT] 65 mM, anfólitos 0.2%) para um volume final de 125 µL por amostra. O precipitado foi removido por centrifugação (13.000 x g, 30 minutos, 23°C) sendo a amostra aplicada sobre tiras de 7 cm com gradiente de pH imobilizado (ReadyStrip™ IPG Strips, pH 3-10). A seguir, as tiras IPG foram reidratadas por 10 minutos em temperatura ambiente e IEF foi conduzida no aparelho Protean IEF Cell (Bio-Rad), utilizando-se um sistema gradiente com reidratação passiva por 4 horas a 20°C e reidratação ativa por 12 horas a 50 V. Para prevenir a desidratação, as tiras foram recobertas com óleo mineral não condutível. IEF foi realizada a 20°C e os seguintes parâmetros de focalização foram aplicados: 50 µA/tira, incremento rápido da voltagem de 500 a 1.000 V por 1 hora, voltagem linear de 4.000 V por 3 horas e, finalmente, voltagem máxima até 16.000 V/hora por 24 horas.

Após a IEF, cada tira foi equilibrada em 2,5 mL de solução tampão de equilíbrio (uréia 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glicerol 30% [v/v], SDS 2%, azul de bromofenol 0,001%, DTT 130 mM) durante 10 minutos. A seguir, as tiras foram lavadas em solução tampão Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%) e aplicadas na superfície do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, sendo seladas com solução de agarose 0,5% contendo 0,0003% de azul de bromofenol. Paralelamente, padrões de pesos moleculares (BenchMark™ Protein Ladder 6-200 kDa) foram aplicados em papel de filtro. A eletroforese foi realizada aplicando-se corrente constante de 15 mA por 15 minutos e 20 mA até completar o procedimento. Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue* G-250 coloidal (Sigma-Aldrich), sob agitação pendular, durante 24 horas à temperatura ambiente, ou transferidos eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose como descrito para eletroforese 1-D.

As imagens dos géis 2-D foram analisadas utilizando-se o programa computacional *ImageMaster™ 2-D Platinum 7.0* (GE Healthcare, Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) para determinar as massas moleculares aparentes (*Mr*) e os pontos isoelétricos (*pI*) dos polipeptídeos do antígeno solúvel TX-114.

3.5 Immunoblot 1-D e 2-D

Foram analisadas amostras individuais de soros bovinos de cada grupo em *immunoblot* 1-D, enquanto três “pools” de seis amostras de soros bovinos de cada grupo foram analisados no *immunoblot* 2-D. O critério para seleção destes “pools” de amostras foi baseado no perfil do reconhecimento antigênico visto no *immunoblot* 1-D, sendo representativos de diferentes intensidades de reação e heterogeneidades complementares.

Membranas (2-D) ou tiras de 3 mm (1-D) de nitrocelulose previamente eletrotransferidas com proteínas do antígeno solúvel TX-114 foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em PBS contendo Tween 20 0,05% (PBS-T) por 2 horas a temperatura ambiente. Subseqüentemente, amostras de soros bovinos diluídas 1:50 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado (PBS-TM) foram adicionadas à membrana ou tiras de nitrocelulose e incubadas por 18 horas a 4°C, sob agitação pendular. Amostras de soros controles positivos e negativos foram incluídas em cada bateria de análise. Após seis ciclos de lavagens em PBS-T, foram adicionados os conjugados de detecção anti-IgG bovina/peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído 1:40.000 ou Proteína A/peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído 1: 5.000 e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático (Sigma Fast™ 3,3-diaminobenzidine tablet sets, Sigma Chemical Co.).

A reação foi interrompida pela adição de água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas.

Bandas polipeptídicas e *spots* foram analisados utilizando-se os programas computacionais de análise de imagens *Kodak Digital Science 1D* e *ImageMaster™ 2-D Platinum 7.0*, sendo comparadas com a curva de padrões de pesos moleculares para determinar valores de *Mr* e *pI*. *Spots* reconhecidos pelas amostras de soros nos diferentes grupos testados foram pesquisados para as respectivas proteínas hipotéticas no banco de dados Swissprot: (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>>UniProtKB/TrEMBL).

3.5.1 Immunoblot-avidez 1-D

Após bloqueio das tiras de nitrocelulose como descrito para *immunoblot* 1-D, as tiras foram incubadas em duplicata com amostras de soros positivas diluídas 1:50 em PBS-TM por 18 horas a 4°C. A seguir, uma das tiras foi lavada por três vezes com solução de uréia 8 M em PBS-T por 5 minutos, enquanto a outra tira foi lavada somente com PBS-T. Subseqüentemente, ambas as tiras foram lavadas por três vezes em PBS-T por 5 minutos. As etapas subseqüentes foram realizadas como descrito acima para *immunoblot* 1-D.

Os perfis de bandas polipeptídicas obtidos para as amostras não tratadas (uréia⁻) ou tratadas com uréia 8 M (uréia⁺) foram avaliados quanto à sua intensidade em pixels (*Int Band*), utilizando-se o programa de imagens *Kodak Digital Science 1D*. Os resultados foram expressos como Índice de avidez (IA), o qual foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $IA = (Int\ Band\ urea^{+} / Int\ Band\ urea^{-}) \times 100$. Foi arbitrariamente definido que $IA < 50\%$ corresponderia à reatividade com anticorpos de baixa avidez e, inversamente, $IA > 50\%$ corresponderia à reatividade com anticorpos de alta avidez.

3.6 Espectrometria de massa (MS)

A identificação das proteínas de *Brucella abortus* por espectrometria de massa (MS) foi realizada conforme descrito por Schevchenko e colaboradores (1996). Os *spots* de interesse foram selecionados e a região central de cada um foi excisada manualmente do gel SDS-PAGE 2-D, previamente corado por Coomassie coloidal, em capela de fluxo laminar. Estas preparações foram acondicionadas em microtubos de poliprolileno, previamente lavados com álcool metílico absoluto. As análises subseqüentes foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Proteômica do Centro de Genética e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

3.6.1 Digestão das proteínas em gel 2-D

Para a digestão das proteínas do gel 2-D, os *spots* excisados sofreram três ciclos de lavagem com 200 µL de solução de bicarbonato de amônio (25 mM, pH 8,0), durante 10 minutos, sob agitação em vórtex, seguidos de um novo ciclo de lavagens com água deionizada. Subseqüentemente, as amostras foram tratadas com 100 µL de acetonitrila (ACN) 100%, durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo secadas por centrifugação a vácuo (Speed-vac, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Para a digestão enzimática, as amostras foram reidratadas com 5-7 µg/mL de tripsina *Gold* (Promega, Madison, EUA), solubilizada em solução de bicarbonato de amônio, por 10 minutos a 4°C e incubadas com a mesma solução a 37° C por 16 horas em banho-Maria. A seguir, a solução contendo os digestos trípticos de interesse foi colocada em microtubos e foram adicionados 25-50 µL de solução contendo ACN 50% e ácido fórmico 5%, ficando sob agitação suave por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um microtubo, sendo o ciclo de extração repetido por mais duas vezes. A solução final contendo apenas os digestos trípticos foi concentrada em Speed-vac para volume de 10-15 µL.

3.6.2 Análise de MS

Após a extração, os peptídeos foram analisados pela técnica de nanocromatografia aplicada ao espectrômetro de massa (nanoLC/MS/MS), utilizando-se o sistema de cromatografia UPLC nanoAcquity (Waters, Milford, EUA) acoplado ao espectrômetro ortogonal Micromass Q-TOFmicro (Waters).

Duas fases móveis foram utilizadas para as análises cromatográficas. Fase móvel A: 100% água ultra-pura e a fase B: 100% de ACN, ambas acidificadas com ácido fórmico 0,1%. Os digestos trípticos foram dessalinizados utilizando-se uma pré-coluna Symmetry (Waters) C18, com 180 µm de diâmetro interno x 20 mm de comprimento e separados em uma coluna analítica de 1,7 µm x 100 mm.

A eluição sequencial dos peptídeos foi realizada utilizando-se um gradiente de 1-50% de ACN por 23 minutos, chegando até 85% com 27 minutos. A corrida para cada *spot* foi de 30 minutos com um fluxo de 0,6 µL/min. Os peptídeos foram introduzidos ao quadrupolo do espectrômetro de massa Q-TOFmicro (Waters) e ela sonda deionizados em sonda de *eletrospray*. As análises no espectrômetro foram feitas através do *software* Masslynx V 4.1, e os íons mais abundantes observados no espectro de MS, escolhidos automaticamente para a fragmentação induzida por colisão (CID), gerando os espectros de MS/MS. O nitrogênio foi

utilizado como gás de nebulização e dessolvação, e o argônio como gás de colisão. O equipamento foi operado no modo íon positivo com voltagem do capilar 3000 V e voltagem do cone 35 V.

3.6.3 Análise *in silico*

Os espectros gerados foram processados pelo algoritmo Max Ent3 *software* Masslynx V 4.1, resultando numa lista de massas que foi analisada pelo *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) V2.3 (Waters) e posteriormente pesquisada no banco de dados Swissprot ([http:// ca.expasy.org/sprot/](http://ca.expasy.org/sprot/)) e NCBI ([http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Os critérios de busca utilizados pelo *software* foram massas moleculares, perda do sítio de clivagem, pontos isoeletricos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e as possíveis modificações, como oxidação de metionina. Os resultados das identificações foram observados pelo *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) V2.3, sendo consideradas identificações confiáveis apenas as que apresentaram probabilidade entre 80-100%.

Após identificação dos peptídeos de *B. abortus* extraídos do gel 2-D, realizou-se uma busca pela sequência completa dos epitopos imunodominantes nos bancos de dados: (<http://www.expasy.org/tools/tagdent.html>) e BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), delimitando-se a procura ao organismo *B. abortus*. O alinhamento das sequências peptídicas encontradas dos epítomos de interesse foi pesquisado no banco de dados BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, EUA). As frequências das bandas antigênicas foram analisadas empregando-se o teste Chi-quadrado (χ^2). A comparação do índice de avidéz médio (IA) para cada banda antigênica entre os grupos GI e GII e entre os diferentes conjugados analisados foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.8 Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos técnicos e manuseio de materiais biológicos foram realizados seguindo as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005; OIE, 2009).

4. RESULTADOS

4.1 Dosagem de proteínas no antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus*

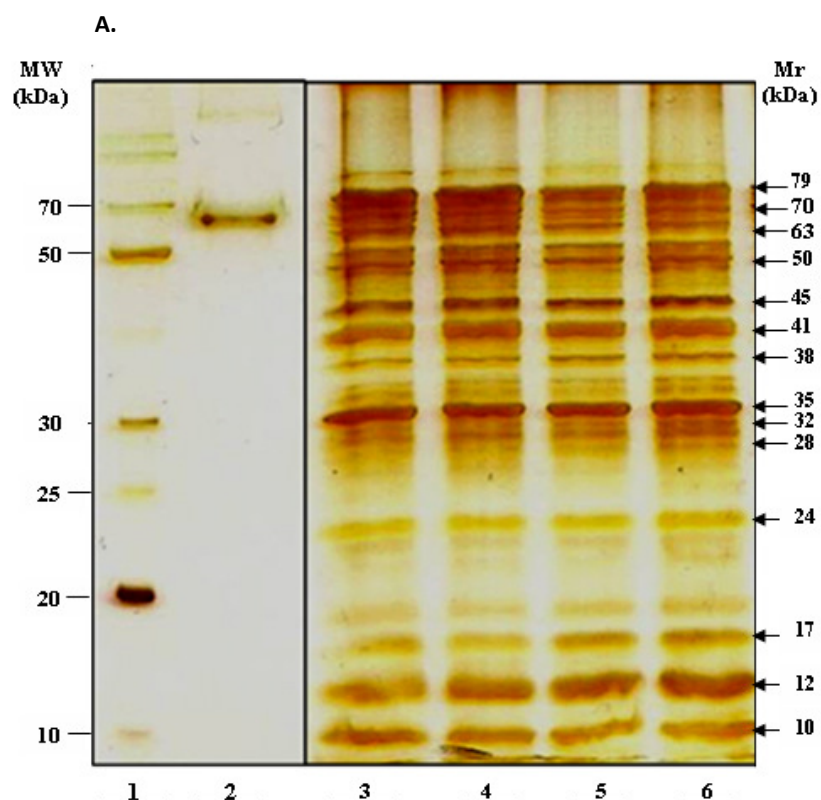
A concentração média de proteína total nas diversas extrações realizadas para obtenção de um *pool* do antígeno solúvel TX-114 destinado aos experimentos de análise proteômica e imunoproteômica foi de 500 µg de proteína/mL.

4.2 Perfil eletroforético 1-D e antigênico do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus*

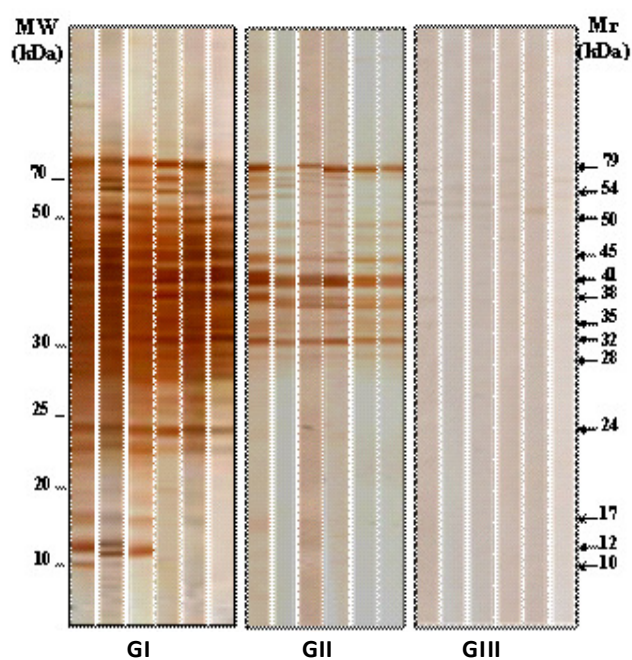
O perfil eletroforético 1-D do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* foi analisado após ser submetido em SDS-PAGE 12% (Figura 1A). O gel corado com prata demonstrou um amplo espectro de bandas com massas moleculares aparentes (*Mr*) variando de 10 a 79 kDa, destacando-se oito bandas fortemente coradas (10, 12, 32, 35, 41, 45, 50 e 79 kDa).

Immunoblots representativos do antígeno solúvel TX-114 com as principais bandas antigênicas reconhecidas por amostras de soro dos três grupos analisados, utilizando os reagentes de detecção anti-IgG bovina e Proteína A conjugados com peroxidase, estão ilustrados nas Figuras 1B e 1C, respectivamente. Foi visualizado um amplo perfil de sororeatividade por amostras de soros de GI (vacas não vacinadas soropositivas), com intensidade de reação mais forte para 13 bandas (10, 12, 17, 24, 28, 32, 35, 38, 41, 45, 50, 54 e 79 kDa), para ambos os conjugados analisados. Por outro lado, um perfil mais restrito de sororeatividade foi observado pelas amostras de soros de GII (novilhas vacinadas soropositivas), que apresentaram reatividade predominante com cinco bandas (32, 38, 41, 45 e 79 kDa), para ambos os conjugados analisados. Adicionalmente, os componentes antigênicos com *Mr* abaixo de 20 kDa (10, 12 e 17 kDa) foram reativos exclusivamente com soros de GI, apesar de não serem reconhecidos por todas as amostras analisadas deste grupo. Bandas inespecíficas acima de 50 kDa e fracamente coradas foram detectadas em amostras de soro de GIII (vacas não vacinadas soronegativas), para ambos os conjugados analisados.

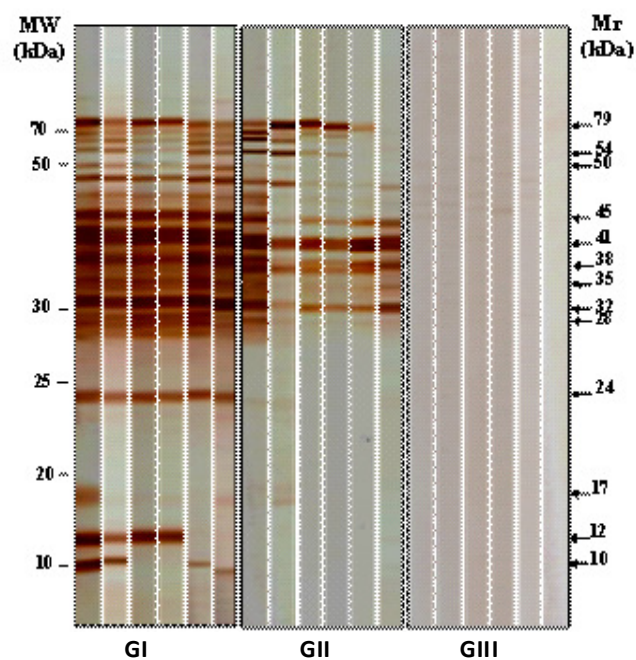
Figura 1. Perfil eletroforético e antigênico unidimensional (1-D) do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* cepa vacinal S19. **(A)** Gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) corado com nitrato de prata. (1) padrão de pesos moleculares (BenchMark™ Protein Ladder 6-200 kDa, Invitrogen); (2) fração purificada de albumina bovina, 66 kDa (Sigma Chemical Co.); (3-6), diferentes lotes de extrações antigênicas de *B. abortus* pelo detergente Triton X-114. Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo programa de imagens *Kodak Digital Science 1D*. **(B e C)** *Immunoblots* 1-D representativos demonstrando as principais bandas antigênicas do antígeno solúvel TX-114 reconhecidas por amostras de soros bovinos dos seguintes grupos: GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose, n = 30; GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação, n = 30; GIII, vacas não vacinadas e soronegativas para *B. abortus*, com idade superior a 24 meses, procedentes de área não endêmica para *Brucella*, n = 30. Os soros foram detectados utilizando os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase **(B)** ou Proteína A/peroxidase **(C)** e a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co.).



B. Anti-IgG bovina/peroxidase



C. Proteína A/peroxidase



4.3 Análise da frequência de sororeatividade por *Immunoblot 1-D*

A frequência de sororeatividade dos grupos GI e GII para cada banda antigênica do antígeno TX-114, determinada pelos conjugados anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase, está demonstrada nas Figuras 2A e 2B, respectivamente. Foi observado um perfil distinto de sororeatividade entre os grupos, sendo caracterizada como significativamente mais elevadas as frequências de reconhecimento de oito componentes imunodominantes (24, 28, 35, 47, 50, 52, 54 e 63 kDa), os quais foram reconhecidos por mais de 50% das amostras de soro de GI em relação ao GII para ambos os conjugados analisados ($P < 0,05$). Dessas bandas antigênicas, quatro (24, 28, 47 e 52 kDa) (Figura 2A) e cinco (24, 28, 35, 47 e 52 kDa) (Figura 2B) bandas apresentaram reconhecimento $<50\%$ por amostras de soro de GII, quando utilizado os reagentes de detecção anti-IgG bovina e Proteína A marcados com peroxidase, respectivamente. Adicionalmente, cinco bandas antigênicas imunodominantes (32, 38, 41, 45, e 79 kDa) foram reconhecidas por $>50\%$ de soros de GI e GII para ambos os conjugados sem apresentar diferença significativa entre os grupos (Figuras 2A e 2B). É importante ressaltar que três bandas antigênicas com baixa massa molecular (10, 12 e 17 kDa) foram reconhecidas somente por amostras de soro de GI ($P < 0,05$). Entretanto, elas não foram consideradas como antígenos imunodominantes por apresentarem frequência de reconhecimento $<50\%$ pelas amostras de soros analisadas deste grupo.

A reatividade das amostras de soros dentro de cada grupo soropositivo (GI e GII) foi analisada em relação aos conjugados anti-IgG bovina e Proteína A marcados com peroxidase (Figuras 3A e 3B). Não foi observada diferença significativa na frequência de bandas antigênicas reconhecidas por amostras de soros de GI (Figura 3A) analisadas pelos dois conjugados. Somente a banda antigênica de 35 kDa teve sua frequência de reconhecimento significativamente maior quando detectada com o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (63,4%) em relação à Proteína A/peroxidase (26,7%) ($P < 0,05$) em amostras de soros de GII (Figura 3B).

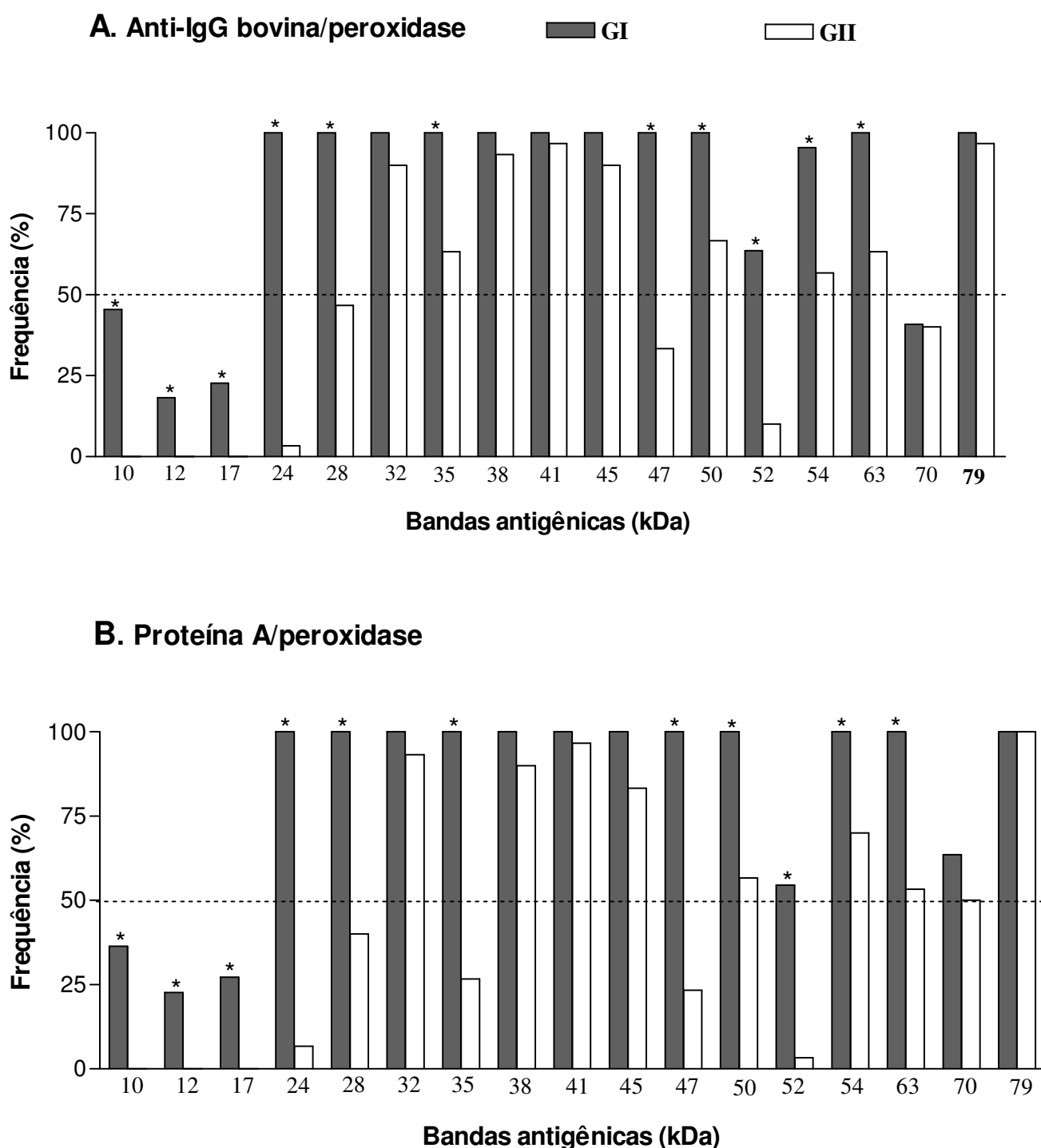


Figura 2. Frequência dos componentes polipeptídicos do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* reconhecidos por amostras de soros bovinos dos grupos GI e GII, e detectados pelos conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase (A) ou Proteína A/peroxidase (B) por *Immunoblot* unidimensional. GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose, n = 30; GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação, n = 30. Massas moleculares aparentes das bandas antigênicas estão expressas em kiloDalton (kDa). A linha tracejada indica o limite estabelecido para as bandas imunodominantes (>50% de reconhecimento). * $P < 0,05$ determinado pelo teste chi-quadrado (χ^2) na comparação da frequência de cada banda antigênica entre os grupos GI e GII.

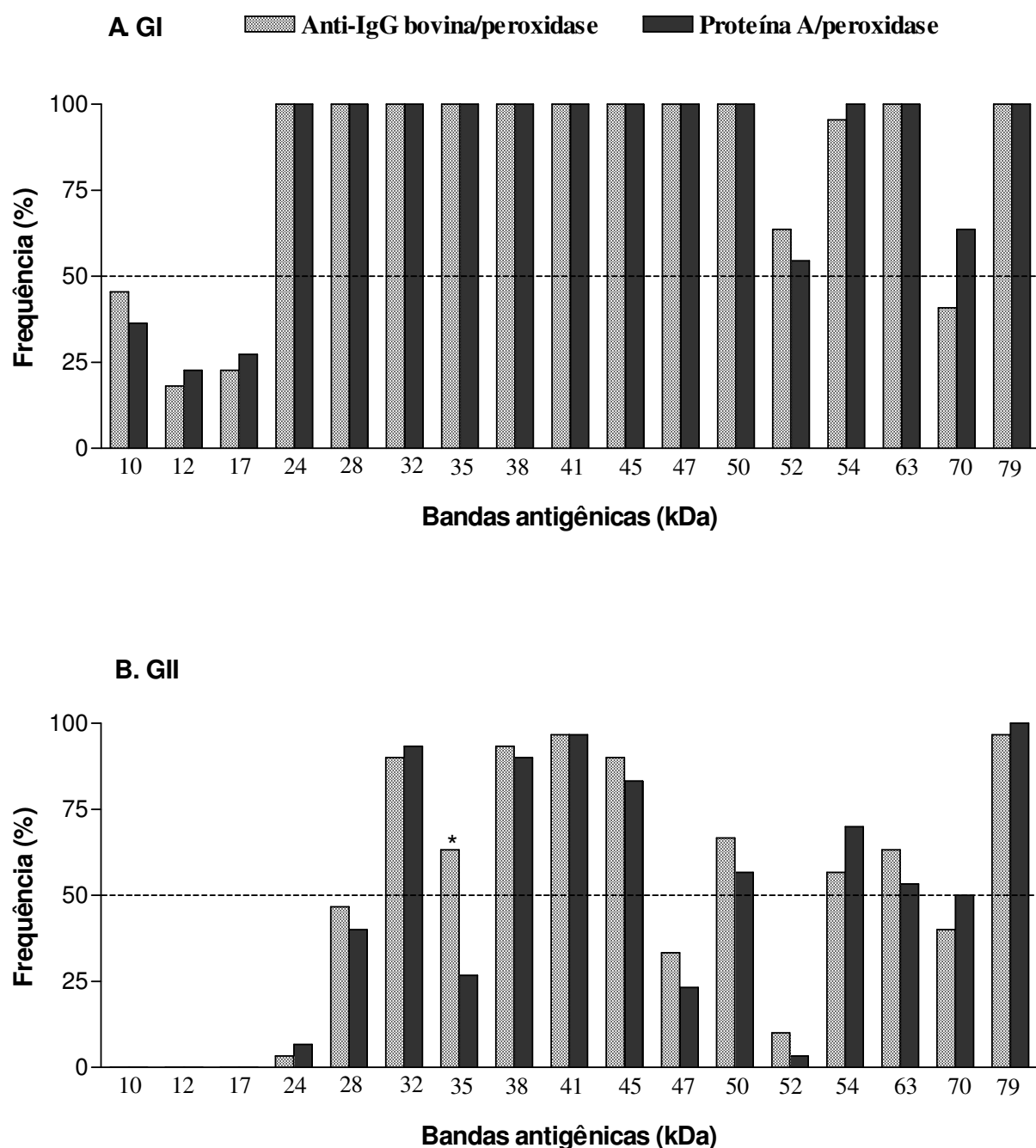


Figura 3. Comparação entre as frequências dos componentes polipeptídicos do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus*, determinados por *Immunoblot* unidimensional, utilizando os conjugados de detecção anti-IgG bovina e Proteína A marcados com peroxidase, dentro de cada grupo de amostras de soros bovinos. (A) GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose, n = 30; (B) GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação, n = 30. Massas moleculares aparentes das bandas antigênicas estão expressas em kiloDalton (kDa). A linha tracejada indica o limite estabelecido para as bandas imunodominantes (>50% de reconhecimento). * $P < 0,05$ determinado pelo teste chi-quadrado (χ^2) na comparação da frequência de cada banda antigênica entre os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase.

4.4 Immunoblot-avidez 1-D do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus*

Immunoblot-avidez 1-D foi realizado somente com amostras positivas de soros de GI e GII (Figura 4). Ao analisar o perfil de bandas antigênicas detectadas com o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Figuras 4A e 4B), observou-se significativa redução na frequência de quatro bandas antigênicas imunodominantes (52, 54, 63 e 79 kDa) e da banda antigênica de 10 kDa em amostras de soro de GI após tratamento com uréia ($P < 0,05$), enquanto que a maioria das bandas imunodominantes (24-50 kDa) não tiveram suas frequências significativamente alteradas (Figura 4A). Em GII (Figura 4B), sete bandas antigênicas (28, 35, 50, 54, 63, 70 e 79 kDa) tiveram redução significativa na sua frequência após tratamento das amostras com uréia ($P < 0,05$), sendo apenas duas bandas (28 e 70 kDa) consideradas não imunodominantes (<50% reconhecimento).

Ao analisar a frequência de bandas antigênicas detectadas com Proteína A/peroxidase (Figuras 4C e 4D), foi observada significativa redução na frequência de quatro bandas antigênicas imunodominantes (24, 54, 63 e 79 kDa) em amostras de soros de GI após tratamento com uréia (Figura 4C). Em GII (Figura 4D), entretanto, foi observada marcante redução na frequência de 10 bandas antigênicas, dentre elas oito imunodominantes (32, 38, 41, 45, 50, 54, 63 e 79 kDa) e duas bandas (28 e 70 kDa) não imunodominantes ($P < 0,05$).

O índice de avidez médio (IA) de anticorpos IgG-específicos foi comparado entre os grupos GI e GII utilizando os reagentes de detecção anti-IgG bovina/peroxidase ou Proteína A/peroxidase (Figura 5). Para o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Figura 5A), anticorpos IgG-específicos presentes em soros do GI apresentaram IA significativamente maiores que aqueles do GII para 11 componentes antigênicos (28, 32, 35, 38, 41, 45, 47, 50, 54, 63 e 70 kDa), dos quais somente dois (54 e 63 kDa) foram reativos a anticorpos de baixa avidez ou $IA < 50\%$ ($P < 0,05$). Por outro lado, soros do GII apresentaram $IA > 50\%$ somente para três bandas antigênicas (32, 38 e 41 kDa). Adicionalmente, nenhum valor de IA foi encontrado para soros do GII reativos a cinco bandas antigênicas, das quais três (10, 12 e 17 kDa) foram exclusivamente reativas com soros de GI e duas (24 e 52 kDa) mostraram baixa frequência de reconhecimento por soros de GII. Destes cinco componentes antigênicos, dois (12 e 52 kDa) foram reativos a anticorpos de alta avidez ($IA > 50\%$).

A análise comparativa da avidez de IgG específica entre amostras de soros de GI e GII utilizando o conjugado Proteína A/peroxidase (Figura 5B) demonstrou valores de IA maiores em soros de GI comparado a GII ($P < 0,05$) para oito componentes antigênicos (28, 32, 35, 38, 41, 45, 47 e 50 kDa), enquanto amostras de soros de GII apresentaram $IA < 50\%$ para todos componentes antigênicos detectados. Adicionalmente, nenhum valor de IA foi encontrado

para soros do GII reativos a oito bandas antigênicas, das quais três (10, 12 e 17 kDa) eram exclusivamente reativas com soros de GI, duas (24 e 52 kDa) mostraram baixa frequência de reconhecimento por soros de GII e três (54, 63 e 70 kDa) mostraram alta frequência de reconhecimento por soros de GII, assim caracterizando o seu reconhecimento por anticorpos de baixa avidéz presentes em soros de GII. Destes oito componentes antigênicos, quatro (12, 17, 52 e 70 kDa) foram reativos com anticorpos de alta avidéz (IA>50%) em soros de GI.

A comparação do IA médio das amostras soropositivas e reativas aos diferentes componentes do antígeno TX-114 entre os conjugados anti-IgG bovina e Proteína A marcados com peroxidase, dentro de cada grupo está demonstrada nas Figuras 6A e 6B. Em amostras de soros de GI (Figura 6A), valores de IA foram significativamente mais elevados apenas para três componentes antigênicos (35, 38 e 41 kDa) quando utilizado o conjugado Proteína A/peroxidase em relação à anti-IgG bovina/peroxidase ($P < 0.05$), embora foram reconhecidos por anticorpos de alta avidéz (IA>50%) por ambos os conjugados. Em soros de GII (Figura 6B), entretanto, valores de IA foram significativamente maiores para três componentes antigênicos (32, 38 e 41 kDa) quando utilizado o conjugado anti-IgG/peroxidase em relação à Proteína A/peroxidase ($P < 0.05$), sendo reconhecidos por anticorpos de alta avidéz (IA>50%) somente pelo conjugado anti-IgG bovina/peroxidase. Três bandas de massas moleculares >50 kDa (54, 63 e 70 kDa) foram reconhecidas por amostras de soros de GII após o tratamento com uréia somente quando utilizado o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase.

Immunoblots-avidéz representativos do antígeno solúvel TX-114 demonstrando as principais bandas antigênicas reconhecidas por soros bovinos de GI e GII antes e após o tratamento com uréia, utilizando ambos conjugados de detecção, estão ilustrados nas Figuras 7A e 7B. Para o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Figura 7A), foi observada queda de reatividade de cinco bandas antigênicas (10, 52, 54, 63 e 79 kDa) reconhecidas por amostras de soros de GI e de sete bandas (28, 35, 50, 54, 63, 70 e 79 kDa) reconhecidas por amostras de soros de GII. Quando foi utilizado o conjugado Proteína A/peroxidase (Figura 7B), quatro componentes antigênicos (24, 54, 63 e 79 kDa) apresentaram diminuição na reatividade após o tratamento com uréia de soros do GI, enquanto a maioria das bandas antigênicas reconhecidas por soros de GII mostraram queda de reatividade (Figura 7B).

Dados obtidos nas análises de *immunoblot* 1-D para determinar a frequência de bandas antigênicas reconhecidas diferencialmente por amostras de soros de GI e GII bem como a frequência de reatividade após tratamento dos soros com uréia e respectivos índices de avidéz estão sumarizados na Tabela 3.

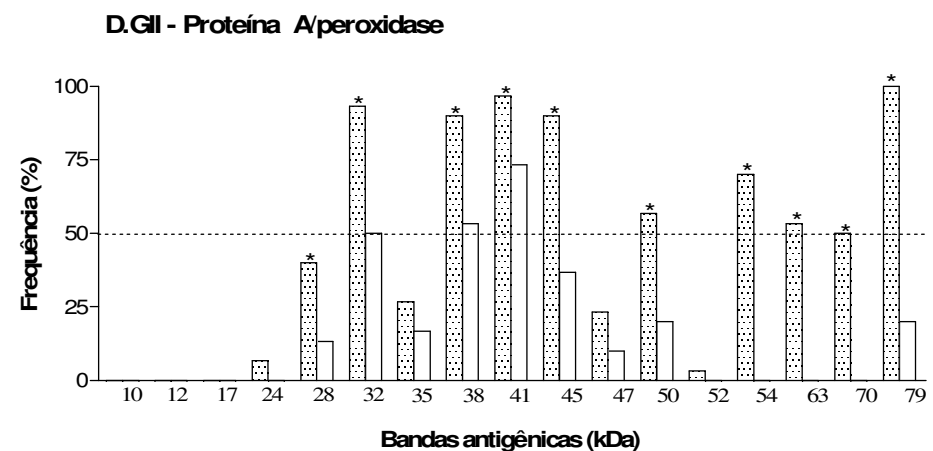
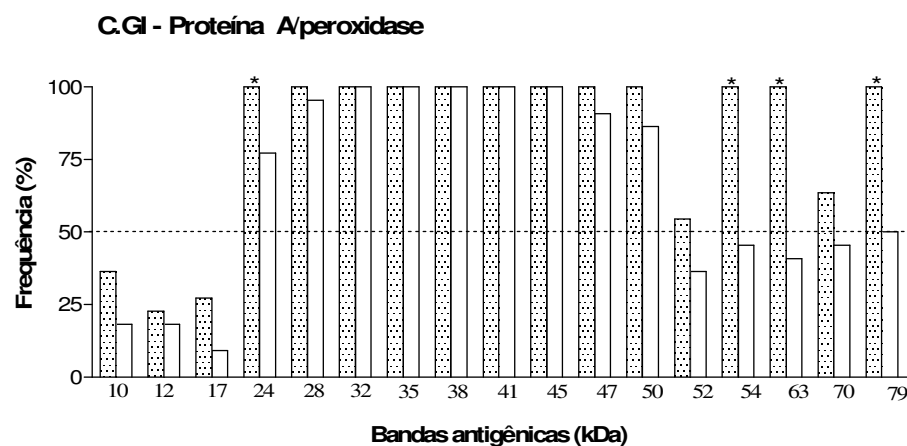
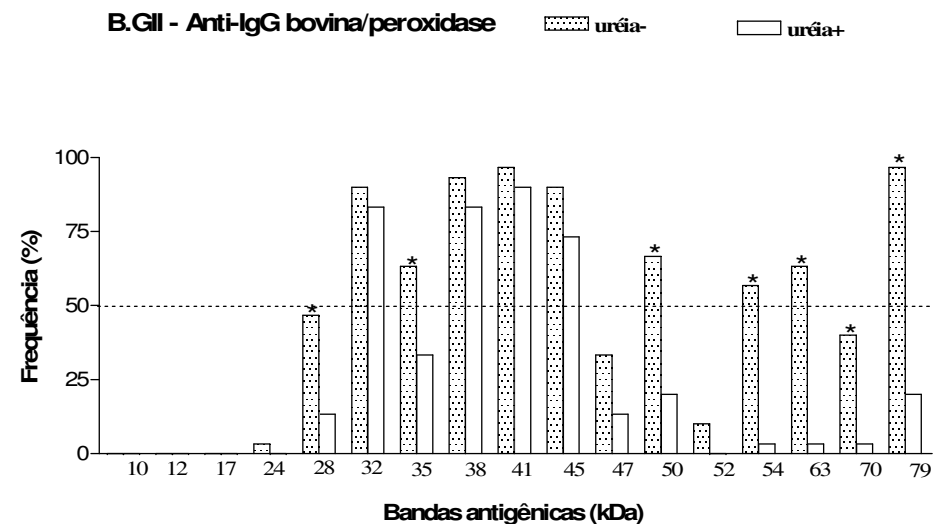
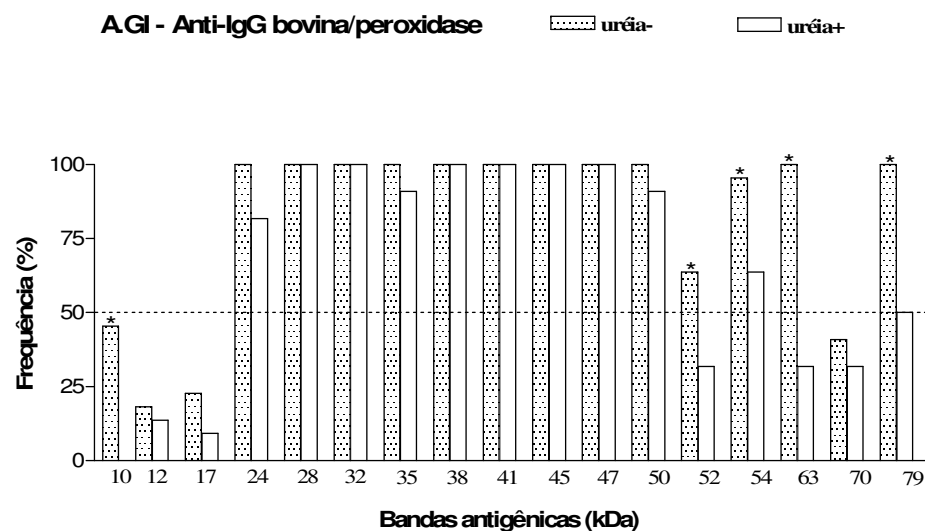


Figura 4. Frequência dos componentes polipeptídicos do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* reconhecidos por amostras de soros bovinos tratadas ou não com uréia 8 M, utilizando os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase (**A, B**) ou Proteína A/peroxidase (**C, D**) por *Immunoblot* unidimensional, nos seguintes grupos: GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose, n = 30; GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação, n = 30. Massas moleculares aparentes das bandas antigênicas estão expressas em kiloDalton (kDa). A linha tracejada indica o limite estabelecido para as bandas imunodominantes (>50% de reconhecimento). * $P < 0,05$ determinado pelo teste chi-quadrado (χ^2) na comparação da frequência de cada banda antigênica reconhecida por amostras de soros tratadas (uréia⁻) e não tratadas (uréia⁺).

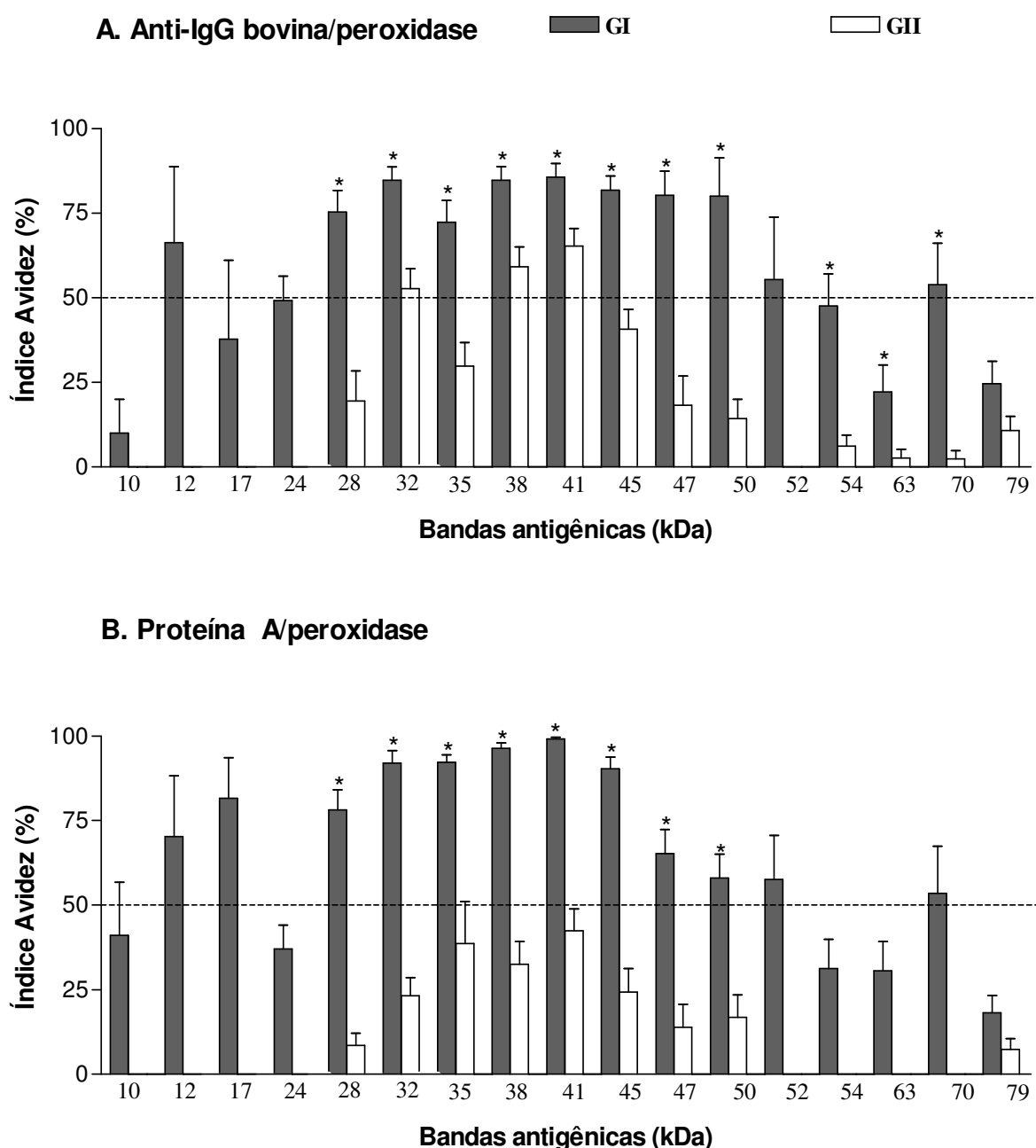


Figura 5. Comparação do Índice de avidéz (IA) de anticorpos IgG específicos aos componentes polipeptídicos do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* reconhecidos por amostras de soros bovinos dos grupos GI e GII, utilizando os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase (**A**) ou Proteína A/peroxidase (**B**) por *Immunoblot* unidimensional. GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose, n = 30; GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação, n = 30. A linha tracejada indica o limite estabelecido para diferenciar alta (IA>50%) e baixa (IA<50%) avidéz. As barras representam a média do IA e o erro padrão da média. * $P < 0,05$ determinado pelo teste *t* de *Student* na comparação entre as médias de IA dos soros de GI e GII.

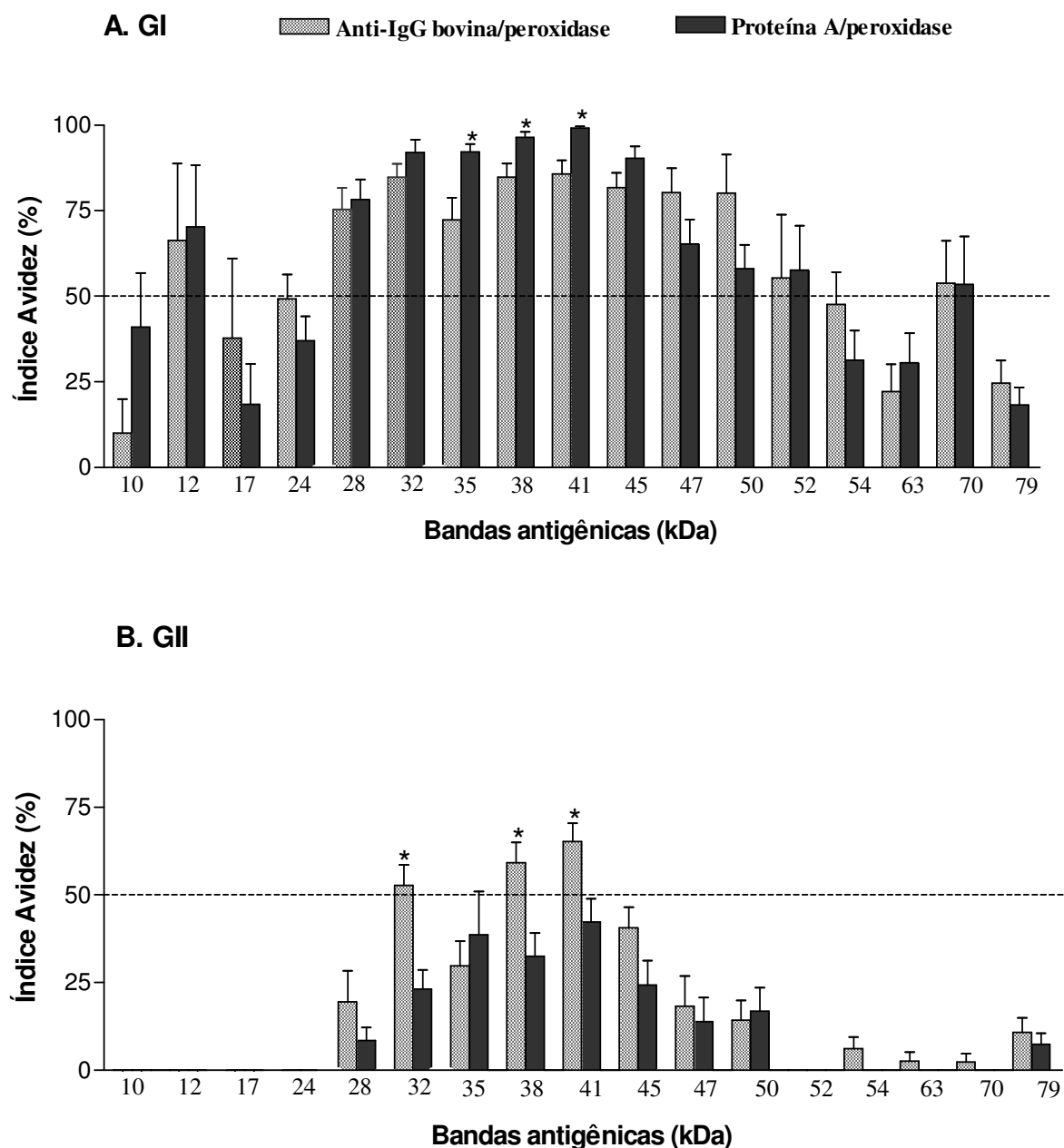


Figura 6. Comparação do Índice de avidéz (IA) de anticorpos IgG específicos aos componentes polipeptídicos do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* reconhecidos por amostras de soros bovinos dos grupos GI (A) e GII (B) entre os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase por *Immunoblot* unidimensional. GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose, n = 30; GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação, n = 30. A linha tracejada indica o limite estabelecido para diferenciar alta (IA>50%) e baixa (IA<50%) avidéz. As barras representam a média do IA e o erro padrão da média. * $P < 0,05$ determinado pelo teste *t* de Student na comparação entre as médias de IA obtidas pelos conjugados anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase.

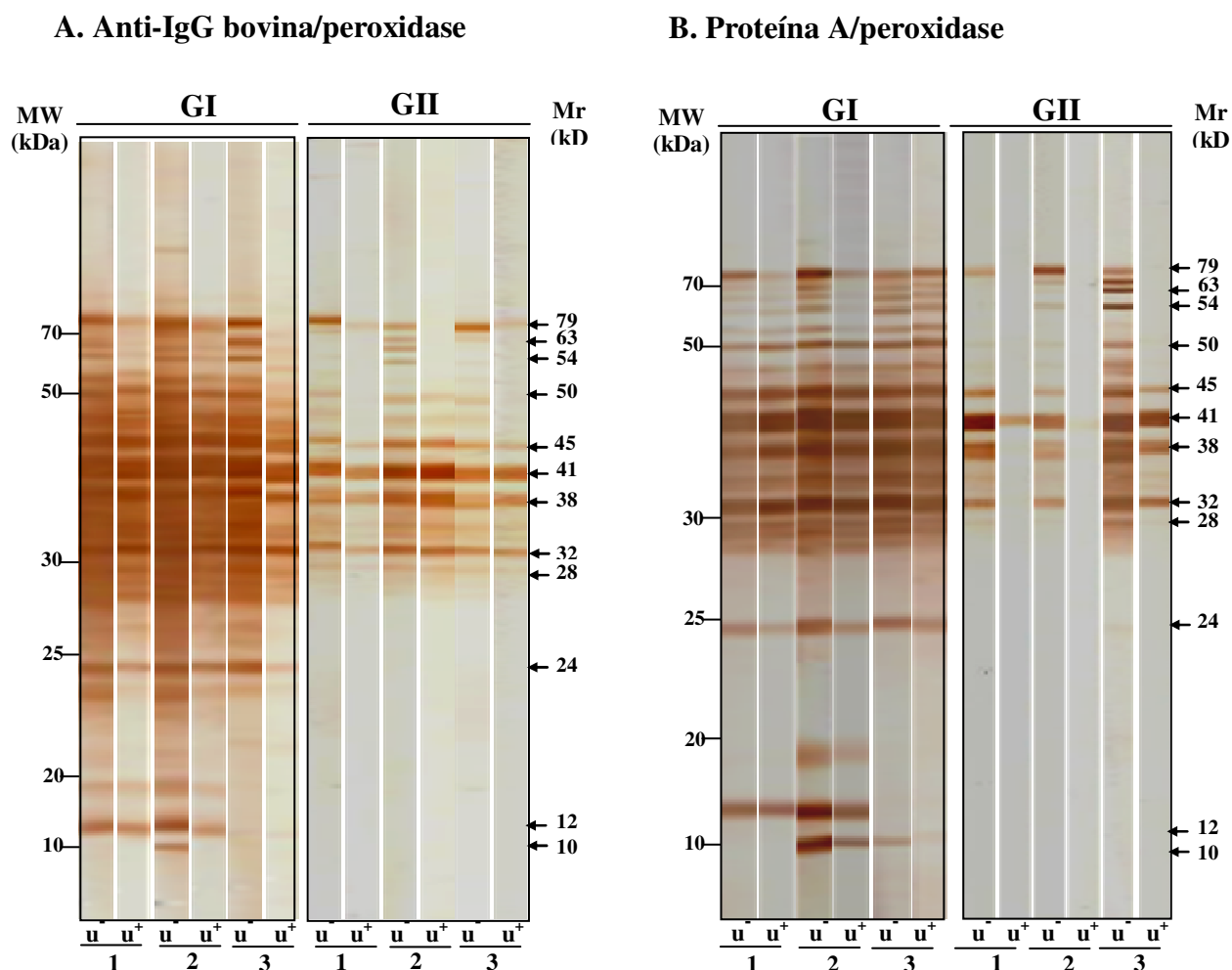


Figura 7. *Immunoblot*-avidez unidimensional representativo dos componentes polipeptídicos do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* reconhecidos por amostras de soros bovinos tratadas (u⁺) ou não (u⁻) com uréia 8 M (1-3), utilizando os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase (A) ou Proteína A/peroxidase (B), nos seguintes grupos: GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose, n = 30; GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação, n = 30. Pesos moleculares (MW) dos padrões, expressos em kiloDalton (kDa), estão indicados à esquerda. Massas moleculares aparentes (Mr), expressas em kDa, estão indicadas à direita e foram analisadas pelo programa de imagens *Kodak Digital Science1D*.

Tabela 3. Dados sumarizados das frequências de bandas antigênicas do antígeno solúvel Triton X-114 de *Brucella abortus* reconhecidas diferencialmente por amostras soropositivas de bovinos não vacinados (GI) e vacinados (GII), obtidos nas análises de *immunoblot* 1-D.

Bandas antigênicas (kDa) do antígeno solúvel Triton X-114 de <i>Brucella abortus</i>									
Grupos ^a	<i>Immunoblot</i> 1D			<i>Immunoblot</i> 1D-avidez					
	Frequência ^b (sem uréia)			Frequência ^c (após uréia)		Índice avidez ^d			
	>50%		<50%	Sem alteração	Com diminuição	>50%		<50%	
GI	24*	50*	32	24	32	28	12	24	10
	28*	54*	38	28	38	35			17
	35*	63*	41	35	41	47	32		
	47*		45	47	63	50	38		
	52*		79		79		41		54
GII		50	32		32		32	28	54
		54	38		38	28	38	35	63
		63	41		41		41	47	79
			45		45		45	50	
			79						

^a Grupos de bovinos: GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose; GII, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação.

^b Dados sumarizados das Figuras 2 e 3.

^c Dados sumarizados da Figura 4.

^d Dados sumarizados das Figuras 5 e 6.

* Significativamente predominante ($P < 0,05$).

Box cor verde: agrupa marcadores antigênicos com reconhecimento diferencial por amostras de soros de cada grupo, seja na frequência ou no índice de avidez dos anticorpos IgG específicos (sem ou após tratamento com uréia);

Box cor cinza: agrupa marcadores antigênicos com reconhecimento por amostras de soros de ambos os grupos (GI e GII);

Box cor vermelha: agrupa marcadores antigênicos com reconhecimento exclusivo por amostras de soros do grupo I.

4.5 Perfil eletroforético 2-D e antigênico do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus*

O perfil eletroforético 2-D do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* está ilustrado na Figura 8. O gel 2-D corado com *Coomassie* coloidal revelou um padrão restrito de *spots* em relação aos pontos isoelétricos, com *pI* variando de 5,1 a 8,4, mas apresentando uma faixa abrangente de massas moleculares variando de 7,1 a 79,4 kDa, com resolução total de 42 *spots* determinados pelo *software* ImageMaster™ 2-D Platinum 7,0 (Figura 8).

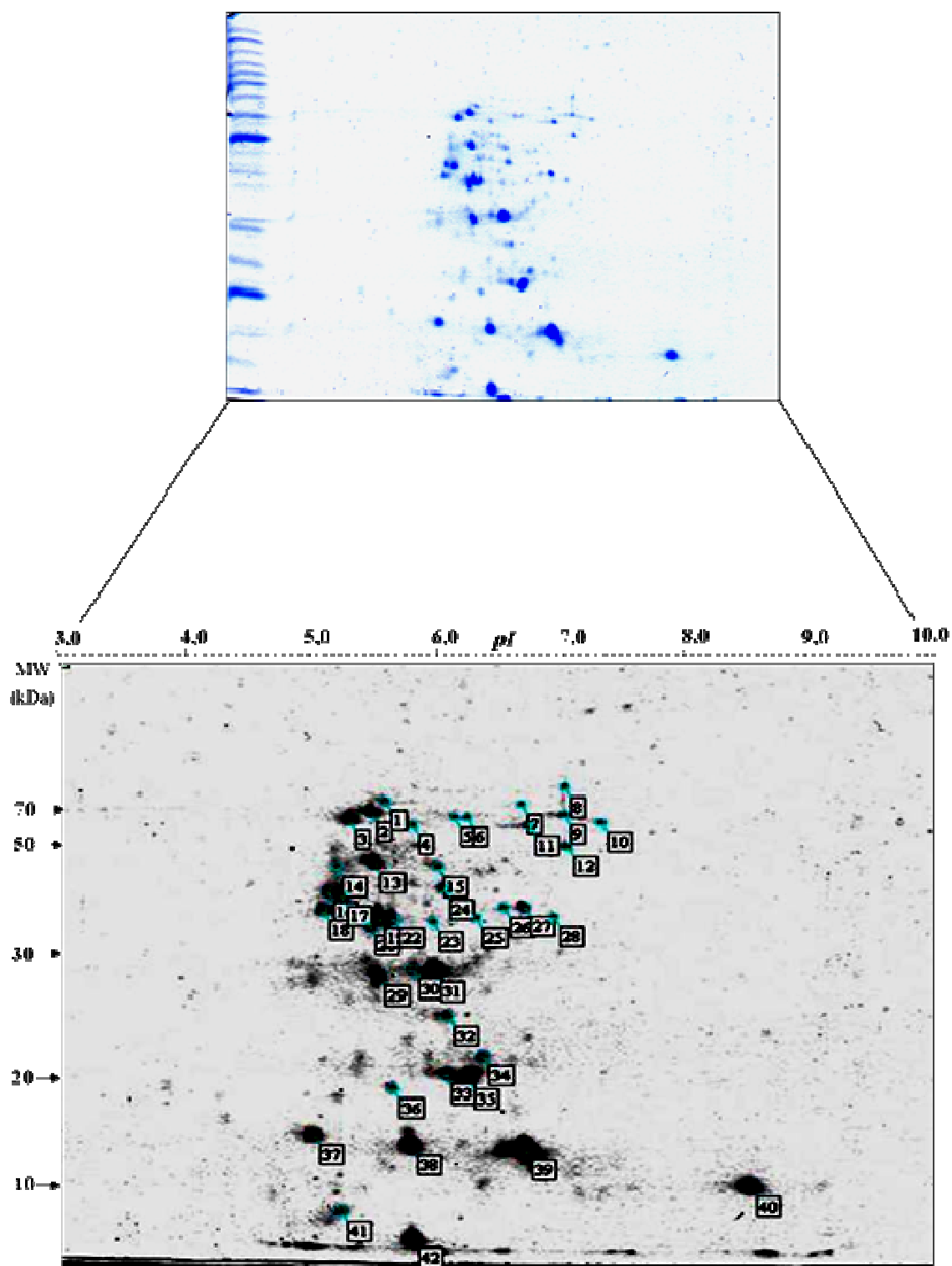


Figura 8. Perfil eletroforético e antigênico bidimensional (2-D) do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* separado por focalização isoeletrica (IEF) em tiras de 7-cm com gradiente de pH imobilizado (ReadyStrip™ IPG Strip pH 3-10) e resolvido em SDS-PAGE 12%. (A) Gel 2-D corado com *Coomassie* coloidal e (B) analisado pelo *software* ImageMaster™ 2-D Platinum 7.0. Um total de 42 *spots* foram identificados e numerados (#1-42). Marcadores de pesos moleculares (MW) estão indicados à esquerda em kiloDalton (kDa) e os pontos isoeletricos (*pI*, 3-10) estão demarcados na posição superior do gel.

Immunoblot 2-D foi realizado com três “pools” de seis amostras de soros bovinos de cada grupo (GI, GII e GIII) e selecionados de acordo com o perfil antigênico analisado em *immunoblot* 1-D, utilizando os conjugados de detecção anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase, como ilustrado na Figura 9. Os padrões de reatividade de anticorpos IgG aos *spots* antigênicos foram arbitrariamente agrupados em quatro regiões diferenciadas de acordo com os padrões de massa molecular relativa (*Mr*), como segue:

- Região I: representativa de uma série de *spots* antigênicos, individualizados e seriados, com *Mr* variando de 65 a 70 kDa e *pI* heterogêneo;
- Região II: representativa de *spots* antigênicos com *Mr* variando de 24 a 45 kDa, apresentando um padrão mais intenso de reatividade que nas demais regiões, com *spots* individualizados e seriados com *pI* heterogêneo;
- Região III: representativa de *spots* antigênicos individualizados, com reatividade marcadamente mais acentuada, compreendendo uma faixa de *Mr* inferior a 20 kDa e *pI* heterogêneo;
- Região IV: representativa de uma pequena série de *spots* antigênicos individualizados, fracamente reativos, com *Mr* variando de 50 a 79 kDa e *pI* neutro (6,4-7,2).

Globalmente, o número de marcações antigênicas reconhecidas por anticorpos das amostras de soro bovino dos grupos analisados (GI, GII e GIII) variou de 4 a 53, sendo 27 *spots* individualizados e 26 *spots* seriados (Figura 9; Tabela 4). A numeração dos *spots* antigênicos na Figura 9 do *immunoblot* 2-D corresponde aos *spots* analisados na Figura 8 do gel 2-D, enquanto *spots* individualizados referenciados com letras (identificadas de A a F) bem como os *spots* seriados (representados dentro de círculos brancos) foram detectados somente no *immunoblot* 2-D, sem correspondência com o gel 2-D.

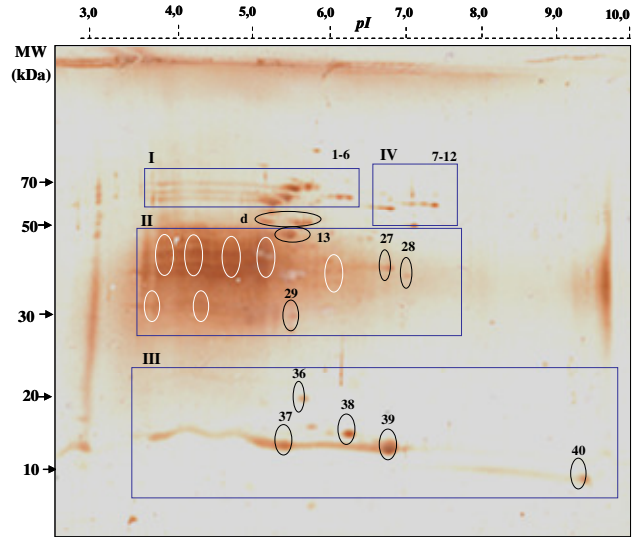
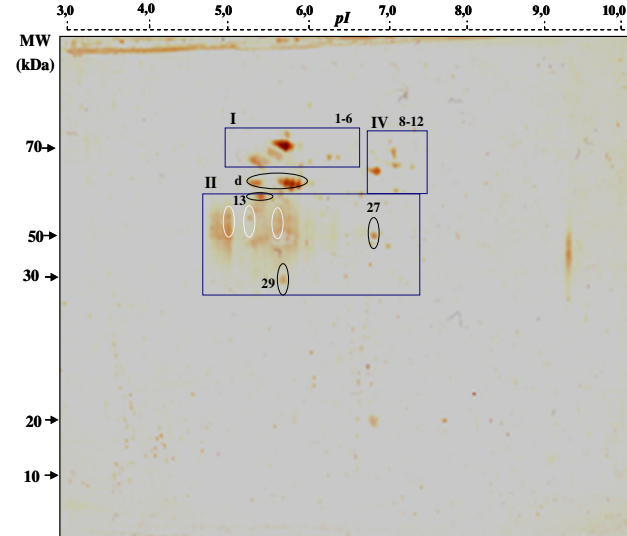
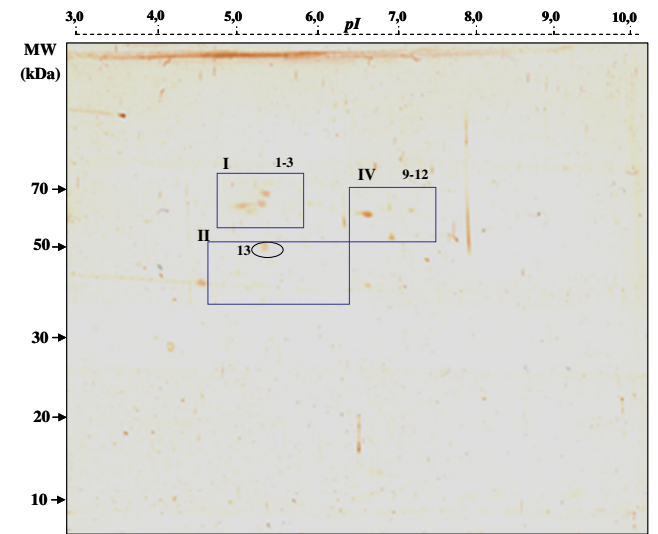
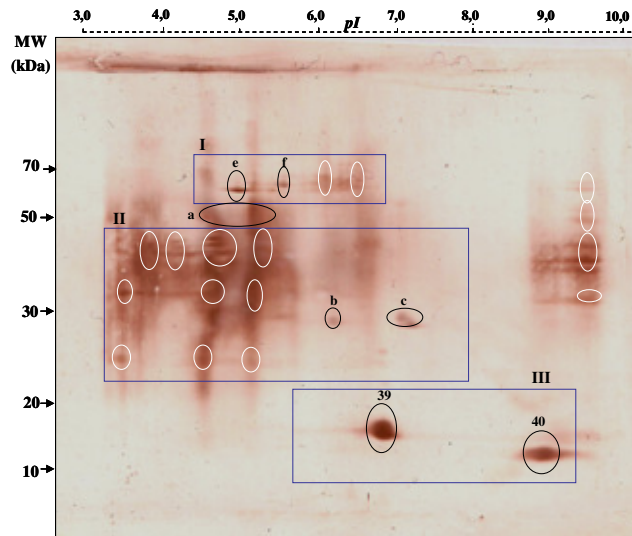
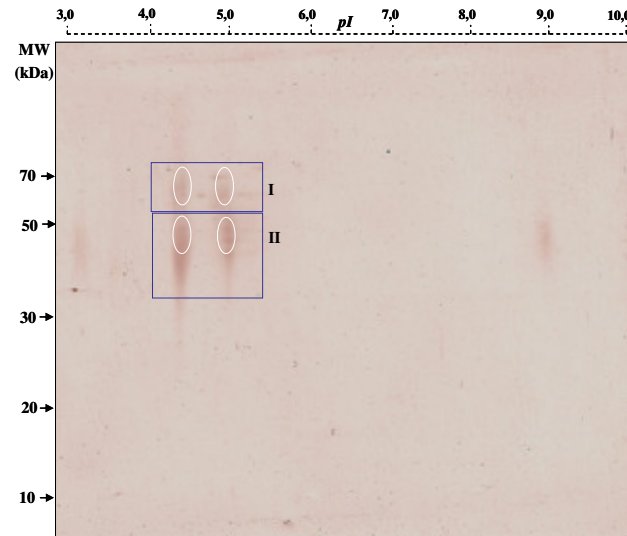
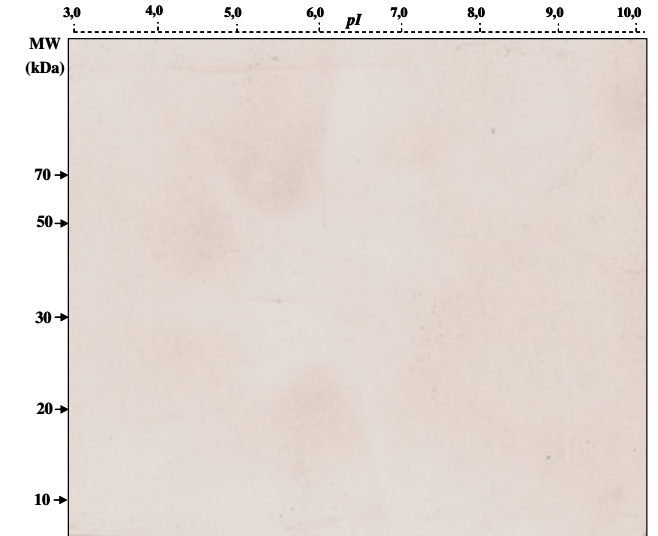
A análise de amostras de soros bovinos utilizando o conjugado de detecção anti-IgG bovina/peroxidase (Figuras 9A, B, C; Tabela 4) mostrou que soros de GI (Figura 9A) reconheceram 29 *spots*, sendo 22 *spots* individualizados, dos quais somente 1 (#d, *Mr* 50 kDa, *pI* 5.2-5.6), não foi visualizado no gel 2D e sete *spots* seriados. A região I (*Mr*: 65-70 kDa) apresentou seis *spots* antigênicos individualizados (#1-6). Uma marcação fortemente densa foi visualizada na região II (*Mr*: 24-45 kDa), com a identificação de sete *spots* seriados e quatro *spots* individualizados (#13, 27, 28 e 29). Na região III (*Mr*: <20 kDa) foram reconhecidos cinco *spots* individualizados intensamente reativos, sendo quatro com *pI* entre 5,1 a 7,0 (#36-39) e um com *pI* alcalino (#40, *pI* 9,2). Seis *spots* individualizados (#7-12) com *pI* neutro (6,4-7,2) e fracamente reativos foram identificados na região IV (*Mr*: 50-79 kDa).

O perfil de sororeatividade de GII (Fig. 9B, Tabela 4) revelou um padrão de marcação mais restrito em comparação GI, sendo reconhecidos 15 *spots* individualizados, dos quais seis na região I (#1-6), três na região II (#13, 27, 29), cinco na região IV (#8-12) e um *spot* não identificado no gel 2-D (#d). Três *spots* seriados foram também revelados na região II. Todos os *spots* reconhecidos por amostras de soro de GII também foram reconhecidos por amostras de soro de GI. Entretanto, não houve reatividade aos componentes peptídicos da região III por amostras de soros de GII. Portanto, a massa molecular dos *spots* reconhecidos por soros de GII variou de 30,8 kDa (#29) a 79,4 kDa (#8), sem detecção de *spots* abaixo de 30 kDa. O perfil de sororeatividade de GIII (Fig. 9C, Tabela 4) revelou sete *spots* fracamente corados, sendo três na região I (#1, 2, 3) e quatro na região IV (#9,10, 11 e 12), além de um *spot* na região II (#13), os quais foram também detectados por amostras de soro de GI e GII.

A análise de amostras de soros bovinos utilizando o conjugado de detecção com Proteína A/peroxidase (Figuras 9D, E, F; Tabela 4), revelou que soros de GI (Figuras 9D) mostraram um padrão de marcação predominantemente mais denso nas regiões I e II, sendo identificados dois *spots* individualizados (#e, f) e dois *spots* seriados na região I, em adição a dois *spots* individualizados (#b, c) e dez *spots* seriados na região II. Somente dois *spots* fortemente corados foram identificados na região III (#39, 40). Não foram identificadas marcações na região IV. O perfil de sororeatividade de GII (Figuras 9E) revelou um fraco padrão de marcação sem individualização de *spots*, com apenas a identificação de dois *spots* seriados nas regiões I e II, enquanto nenhuma reatividade foi observada com amostras de soros de GIII (Figura 9F).

A caracterização proteômica do antígeno solúvel TX-114 revelou 42 *spots* no gel 2-D, sendo possível identificar 22 proteínas hipotéticas com sublocalização citoplasmática, como demonstrado na Tabela 5. Somente seis *spots*, três na região I (#2, 3, 6) e três na região IV (#8, 9, 12) reconhecidos pelas amostras de soros dos grupos GI, GII e GIII (Figuras 9; Tabela 4) e detectados pelo conjugado anti-IgG bovina/peroxidase, tiveram suas proteínas hipotéticas referenciadas no banco de dados. Os cinco *spots* localizados na região III (#36-40) reconhecidos exclusivamente por soros de GI, não tiveram correspondência com proteínas hipotéticas descritas nos bancos de dados (Tabela 5).

Figura 9. *Immunoblots* 2-D representativos demonstrando os *spots* antigênicos presentes no antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* reconhecidos por um *pool* de seis amostras de soros bovinos dos seguintes grupos: GI (**A, D**), vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose; GII (**B, E**), novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação; GIII (**C, F**), vacas não vacinadas e soronegativas para *B. abortus*, com idade superior a 24 meses, procedentes de área não endêmica para *Brucella*, utilizando os conjugados enzimáticos anti-IgG bovina/peroxidase (**A, B, C**) ou Proteína A/peroxidase (**D, E, F**). Os padrões de reatividade de anticorpos IgG aos *spots* antigênicos foram arbitrariamente agrupados em quatro regiões de acordo com os padrões de massa molecular relativa (*Mr*): **I**, *Mr* entre 65 e 70 kDa e *pI* heterogêneo; **II**, *Mr* entre 24 e 45 kDa, apresentando um padrão mais intenso de reatividade e *pI* heterogêneo; **III**, *spots* individualizados e fortemente reativos com *Mr* inferior a 20 kDa e *pI* heterogêneo; **IV**, *spots* individualizados e fracamente reativos com *Mr* entre 50 e 79 kDa e *pI* neutro (6,4-7,2). *Spots* seriados estão representados por círculos brancos. *Spots* individualizados, com a numeração correspondente aos números de *spots* mapeados no gel 2-D, estão representados por círculos pretos. Marcadores de pesos moleculares (MW) estão indicados à esquerda, em kiloDalton (kDa) e os pontos isoelétricos (*pI*, 3-10) estão demarcados na posição superior do gel.

A. GI**B. GII****C. GIII****D. GI****E. GII****F. GIII**

Rodapé Tabela 4:

* Padrões de reatividade dos anticorpos IgG aos spots antigênicos foram arbitrariamente agrupados em quatro regiões acordo com os padrões de massa molecular relativa (*Mr*): **I**, *Mr* entre 65 e 70 kDa e *pI* heterogêneo; **II**, *Mr* entre 24 e 45 kDa, apresentando um padrão mais intenso de reatividade e *pI* heterogêneo; **III**, *spots* individualizados e fortemente reativos com *Mr* inferior a 20 kDa e *pI* heterogêneo; **IV**, *spots* individualizados e fracamente reativos com *Mr* entre 50 e 79 kDa e *pI* neutro.

Número dos *spots* correspondem aos números marcados no gel 2-D, indicados na Figura 8.

Φ Conjugados enzimáticos de detecção anti-IgG bovina e Proteína A marcados com peroxidase
pI: ponto isoelétrico; *Mr*: massa molecular relativa em kiloDaltons (kDa); ND: Não demarcado.

GI, vacas não vacinadas e soropositivas para *B. abortus*, com idade acima de 24 meses, procedentes de áreas endêmicas ou com surtos focais de brucelose; **GII**, novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa S19 de *B. abortus*, procedentes de áreas endêmicas, sendo os soros coletados 3 meses após a vacinação; **GIH**, vacas não vacinadas e soronegativas para *B. abortus*, com idade superior a 24 meses, procedentes de área não endêmica para *Brucella*

Tabela 4. Proteínas hipotéticas do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* determinadas por eletroforese 2-D e *immunoblot* 2-D reconhecidos por anticorpos de amostras de soros de bovinos detectados pelos conjugados enzimáticos anti-IgG bovina ou Proteína A marcados com peroxidase.

Região*	Spots [#]		Anti-IgG bovina/peroxidase ^Φ						Proteína A/peroxidase ^Φ					
	Indiv.	Seriados	GI		GII		GIII		GI		GII		GIII	
			Indiv.	Seriados	Indiv.	Seriados	Indiv.	Seriados	Indiv.	Seriados	Indiv.	Seriados	Indiv.	Seriados
I	1		X		X		X		-		-		-	
	2		X		X		X		-		-		-	
	3		X		X		X		-		-		-	
	4	4	X	ND	X	ND	-	ND	-	2	-	2	-	ND
	5		X		X		-		-		-		-	
	6		X		X		-		-		-		-	
	e		-		-		-		X		-		-	
	f		-		-		-		X		-		-	
II	13		X		X		X		-		-		-	
	27		X		X		-		-		-		-	
	28	22	X	7	-	3	-	ND	-	10	-	2	-	ND
	29		X		X		-		-		-		-	
	b		-		-		-		X		-		-	
	c		-		-		-		X		-		-	
III	36		X		-		-		-		-		-	
	37		X		-		-		-		-		-	
	38	ND	X	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	39		X		-		-		X		-		-	
	40		X		-		-		X		-		-	
IV	7		X		-		-		-		-		-	
	8		X		X		-		-		-		-	
	9	ND	X	ND	X	ND	X	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	10		X		X		X		-		-		-	
	11		X		X		X		-		-		-	
	12		X		X		X		-		-		-	
a			-		-		-		X		-		-	
d			X		X		-		-		-		-	

Tabela 5. Análise proteômica do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* S19 identificadas por eletroforese bidimensional (2-D).

Spots ^a (#)	Experimental 2-D		Antígeno hipotético	Função molecular
	<i>pI</i>	<i>Mr</i> (kDa)		
1	5,6	74,0	?	?
2	5,5	70,5	GMP sintase	Ligante de ATP
3	5,4	66,2	Arginil-tRNA sintetase	Aminoacil-tRNA sintetase
4	5,8	63,7	?	?
5	6,1	67,8	?	?
6	6,2	67,8	Glicose-6-fosfato isomerase	Atividade isomerase
7	6,7	72,9	?	?
8	7,0	79,4	β-glucano transporte ATPase	Hidrolase
9	7,0	69,1	β-glucano exportação de proteína ligante de ATP/ permease ndvA	Hidrolase
10	7,2	64,9	?	?
11	6,7	62,9	?	?
12	7,0	52,9	Proteína engA ligante de GTP	Ligante de GTP
13	5,6	47,6	?	?
14	5,3	47,1	?	?
15	6,0	46,9	Glutamil-tRNA sintetase 1	Atividade ligase
16	5,2	41,4	Protease Clp dependente de ATP/subunidade clpX ligante de ATP	Chaperona
17	5,3	40,6	Protease Hsl dependente de ATP/subunidade hslU ligante de ATP	Chaperona
18	5,2	38,6	Recombinase A	Ligante de ATP/DNA danificado
19	5,6	37,6	Triptofanil-tRNA sintetase	Atividade ligase
20	5,5	36,5	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase	Oxidoreductase
21	5,7	43,1	Seril-tRNA sintetase	Atividade ligase
22	5,7	37,5	Anidro-N-ácido acetilmurâmico quinase	Quinase transferase
23	6,0	39,4	Proteína ligante-GTP	Ligante de GTP
24	6,0	42,0	Argininosuccinato sintase	Síntese de aminoácido
25	6,3	37,6	Molibdênio cofactor de biossíntese de proteína A	Cluster de ligação de íons ferro(4) e enxofre (4)
26	6,5	39,0	Proteína dnaJ chaperona	Chaperona
27	6,7	39,0	?	?
28	6,9	37,7	?	?
29	5,6	30,8	?	?
30	5,8	31,6	Homoserina O-succinil transferase	Biossíntese de metionina
31	6,0	31,3	Glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente NAD(P)H	Biossíntese de fosfolípido

Tabela 5. Continuação

Spots ^a (#)	Experimental 2-D		Antígeno hipotético	Função molecular
	<i>pI</i>	<i>Mr</i> (kDa)		
32	6,1	27,2	Ubiquinona/menaquinona biossíntese metiltransferase ubiE	Transferase
33	6,1	21,8	GTP ciclohidrolase 1	Hidrolase
34	6,4	23,5	?	?
35	6,3	21,4	?	?
36	5,7	20,5	?	?
37 ^d	5,1	14,9	Ferritina bacteriana (Bfr) ou citocromo B1	Regulação de ferro, mono- oxigenação e produção de radicais reativos
38 ^d	5,8	13,8	Proteína de proteção da fase estacionária de DNA na carência de nutrientes (Dps) Nucleosídeo difosfato quinase (NDPk_I)	Atividade oxidoreductase
39 ^d	6,7	13,3	Cu Zn Superóxido desmutase (Sodc)	Transferase/quinase
40 ^d	8,4	10,3	Cu Zn Superóxido desmutase (Sodc)	Antioxidante/Oxiredutase
41	5,3	8,7	Proteína B de invasão	?
42	5,8	7,1	?	?
			?	?

^a Número dos *spots* (#) correspondem aos números marcados no gel 2-D, indicados na Figura 8.

^b Valores experimentais de *pI* e *Mr* foram obtidos pela análise de imagem do gel 2-D, utilizando o *software* ImageMaster 2D Platinum 7.

^c Antígeno hipotético e função molecular foram obtidos no banco de dados utilizando *pI* e *Mr* (kDa), respectivamente, <<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>>UniProtKB/>.

^d Antígenos seqüenciados por espectrometria de massa (MS) e analisados no banco de dados NCBI Blastp (<http://blast.ncbi.nih.gov>).

pI: ponto isoelétrico; *Mr*: massa molecular relativa em kiloDaltons (kDa); ?: não relacionado no banco de dados.

4.6 Identificação de peptídeos do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* por MS

Para identificar os peptídeos de interesse, aqueles que apresentaram marcação distinta entre amostras soropositivas de animais não vacinados (GI) e vacinados (GII), foram selecionados quatro *spots* da região III (#37, 38, 39, 40) com *Mr* <20 kDa e visivelmente identificados no gel 2-D. Os *spots* foram excisados do gel e submetidos à espectrometria de massa (MS) e a identificação dos peptídeos foi realizada com o auxílio do *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) V 2.3 e submetidas posteriormente à análise no banco de dados Swissprot e BLASTp.

Os resultados da identificação das proteínas estão sumarizados na Tabela 6 e o sequenciamento dos aminoácidos das proteínas antigênicas analisadas pelo programa Blastp está apresentado na Figura 10.

O *spot* #37 foi identificado com *Mr* de 16,5 kDa e *pI* 4,5, correspondendo à proteína ferritina bacteriana (Bfr) ou também designada citocromo B1 de *B. abortus*. Foram identificadas duas seqüências de aminoácidos com 16,1% de identidade de cobertura e a posição destes peptídeos na proteína está demonstrada na Figura 10.

O *spot* #38 teve correspondência com duas proteínas (Dps e Ndpk-I) de *Brucella*, com massa molecular variando de 15,2 a 18,2 kDa e *pI* de 5,0 a 5,1. Dois peptídeos foram identificados para a Dps (proteína de proteção da fase estacionária de DNA na carência de nutrientes) de *B. abortus* S19 e *B. suis*, com identidade de cobertura de 17%. Três peptídeos foram sequenciados para Ndpk-I (nucleosídeo difosfato quinase) de *B. melitensis*, apresentando 20% de identidade de cobertura. A posição destes peptídeos nas respectivas proteínas está representada na Figura 10.

Foram identificadas quatro seqüências de aminoácidos com elevada identidade (36,4%) para a proteína cobre-zinco dismutase (Sod) de *B. suis*, correspondente ao *spot* #39, com massa molecular de 18,2 e *PI* de 6,2. A análise no banco de dados para a pesquisa de epitopos imunogênicos, *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (<http://www.iedb.org/sourceOrgId/235>) revelou a presença de uma seqüência de 14 aminoácidos (GGDNYSDKPEPLGGG) (TABATABAI; PUGH, 1994) alinhados nas posições 8-21 do peptídeo RSLMVHVGGDNYSDKPEPLGGGGARF (Figura 10). Outras três seqüências de aminoácidos também foram identificadas.

O *spot* com perfil mais alcalino (#40) correspondeu à proteína de invasão B de *B. melitensis*, com peso molecular 18,0 kDa e *pI* 9,0. Foram identificados três peptídeos com identidade de cobertura de 25,4% e a posição destes peptídeos na proteína está demonstrada na Figura 10.

Tabela 6. Proteínas do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* S19 identificadas por espectrometria de massa.

Spot ^a (#)	Proteína	ORF ^b	<i>pI</i> exp ^c /teor ^d	<i>kDa</i> exp ^c /teor ^d	Identidade de cobertura (%) ^d	Peptídeos (n°) ^d	Seqüência ^d	Localização celular
37	Bfr (Ferritina bacteriana ou citocromo B1)	BruAb II- 0659	5,1 / 4,5	14,9 / 16,5	16,1	2	(R)LLNDWGYTR(L) R)IIFLEGFPNLQTVSPLR(I)	citoplasmática
38	Dps (Proteína de proteção da fase estacionária de DNA na carência de nutriente)	BR I-2149 BAbs19 I- 20110	5,8 / 5,0 -5,1	13,8 / 15,2-18,2	17,0	2	(R)YGDVANLVR(K) (K)DADDAGDDDTADIFTAASR(S)	citoplasmática
	Ndpk-I (Nucleosídeo difosfato quinase)	BME I-1256			20,0	3	(R)TFSMIKPDATR(R) (K)LEEAGLR(V) (R)EAEGFYAVHK(D)	
39	Sod (Cu-Zn Superóxido dismutase)	BRA I-0703	6,7 / 6,2	13,3 / 18,2	36,4	4	(K)MYEALPTGPGK(E) (K)EVGTVVISEAPGGLHFK(V) (K)VSETVVAPHLK(K) (R)SLMVHVGGDNYSKPEPLGGG GAR(F)	citoplasmática
40	Proteína B de invasão	BME I-15841	8,4 / 9,0	10,3 / 18,0	25,4	3	(K)VDGVLLMPFGLDLAK(G) (K)SGTNINVTTTALSPSQPVAFK(I) (K)GFGAALDR(I)	citoplasmática

^a Número dos *spots* (#) correspondem aos números marcados no gel 2-D, indicados na Figura 8 e Tabela 5.

^b Regiões de leitura aberta dos cromossomos (ORF- Open Reading Frame) acessadas no NCBI. Os cromossomos em cada ORF estão localizados e incluídos no nome da ORF, onde I refere-se ao cromossoma 2,1 Mb e II ao cromossomo 1,2 Mb da bactéria.

^c Valores experimentais de *pI* e *Mr* foram obtidos pela análise de imagem do gel 2-D utilizando o *software* ImageMaster 2D Platinum 7.

^d Valores teóricos de *pI* e *Mr*, bem como a porcentagem de identidade de cobertura da seqüência de aminoácidos obtidos pelo *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) V.2.3 (Waters) e posteriormente submetidos ao banco de dados UniProtKB/ TrEMBL (<http://www.expasy.org/tools/tagident.html>).

Bfr	MKGEPKVIERLNEALFLELGAVNQYWLHYRLLNDWGYTRLAKKEREESIEEMHHADKLID	60
	RIIFLEGFPNLQTVSPLRIGQNVKEVLEADLKGEYDARASYKESREICDKLGDYVSKQLF	120
	DELLADEEGHIDFLETQLDLLAKIGGERYGQLNAAPADEAE	161
Dps	MPKKS MHATRNDLPSNTKTTMIALLNENLAATIDLALITKQAHWNKGPQFI AVHEMLDG	60
	FRAELDDHVDTIAERAVQIGGTAYGTTQVVVKESRLKPYPTDIYAVHDHLVALIER YGDV	120
	ANLVRKSIKDADDAGDDDTADIFTAASRSLDKALWFLEAHVQESN	165
Ndpk-I	MAIERTFSMIKPDATRRNLTGAIIAKLEEAGLRV VASKRVWMSRREAEGFYAVHKDRPFF	60
	GELVEFMSSGPTVVQVLEGENAIAKNREVMGATNPANADEGTIRKAFALSIGENSVHGSD	120
	APETA AEEIAYWFSGTEIVG	140
Sodc	MKSLFIASTMVLMAFPFAAESTTV KMYEALPTGPGKEVGTVVISEAPGGLHFKVNMEKLT	60
	PGYHGFHVHENPSCAPGEKDGKIVPALAAGGHYDPGNTHHHLGPEGDGHMGDLPRLSANA	120
	DGKVSETVVAPHLKKLA EIKQRSLMVHVGGDNYS DKPEPLGGGGARFACGVIE	173
Proteína B de invasão	MKNYRAIGLAFTFTALSSLSAFAASLPGGASTLQETYQDWTVSCQSQKDTTACVMRQEQS	60
	SAQAGQRVLTAE LRNVAGGKVDGVLLMPFGLDLAKGASLKIDDTAGPNLTFSTCLPQGCL	120
	APVSFDAKQVAAL KSGTNINVT TTTALSPSQPVAFKISLKGFGAALDRIQALTK	173

Figura 10. Sequência de aminoácidos dos peptídeos do antígeno solúvel TX-114 de *Brucella abortus* e identificados utilizando o programa Blastp. A sequência de aminoácidos destacados em cinza refere-se aos peptídeos sequenciados por espectrometria de massa. A sequência de aminoácidos destacada em vermelho refere-se aos epítomos imunogênicos analisados pelo banco de dados *Immune Epitope Database And Analysis Resource* (:<http://www.iedb.org/sourceOrgId/235>)

5. DISCUSSÃO

A brucelose bovina tem sido controlada por programas dispendiosos e de longa duração, utilizando diferentes esquemas de vacinação, diagnóstico sorológico e eliminação de animais soropositivos (ABALOS; DAFFNER, PINOCHET, 2000). O diagnóstico da brucelose é geralmente realizado por testes sorológicos baseados em preparações contendo antígeno S-LPS, que também está presente na cepa vacinal S19 de *B. abortus* e em várias bactérias Gram-negativas, tais como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella urbana* grupo N, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularenses* e *Escherichia coli* O:157 (CAROFF et al., 1984; AL DAHOUK et al., 2006), resultando em reatividade cruzada e perda de especificidade. Além disso, procedimentos para o sorodiagnóstico da brucelose requerem a diferenciação da resposta de anticorpos após a vacinação e infecção natural, devendo possuir elevada especificidade, sensibilidade e capacidade de detectar todos os estágios da infecção (MCGIVEN et al., 2003).

Desta forma, o desenvolvimento de reagentes de diagnóstico utilizando proteínas livres de S-LPS pode oferecer uma resolução para esses problemas, e proteínas citoplasmáticas estão sendo pesquisadas como antígenos candidatos para fins de diagnóstico mais específico, visto que *Brucella* é um parasito intracelular e a resposta imune do hospedeiro não está restrita a proteínas de superfície (AL DAHOUK et al., 2006; CONNOLLY et al., 2006). Várias técnicas de diagnóstico sorológico para brucelose têm sido avaliadas para atender a estes propósitos, com esforços voltados para a padronização de reagentes de detecção, como os conjugados anti-imunoglobulinas requeridos para iELISA e os anticorpos policlonais requeridos para cELISA (NIELSEN et al., 2008). Alternativamente, conjugados de afinidade como Proteína A ou Proteína G marcados com peroxidase têm sido empregados em ELISAs permitindo distinção de diferentes isotipos de IgG e, conseqüentemente, caracterização do perfil da infecção por *Brucella* (LAWMAN et al., 1986; SAEGERMAN et al., 2004; PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010).

Neste contexto, nós avaliamos um novo antígeno de *B. abortus* obtido pela extração com TX-114 por meio de análise imunoproteômica para discriminar bovinos vacinados com a cepa S19 e animais infectados. Em adição, a afinidade funcional de IgG específica a *B. abortus* foi determinada por *immunoblot* do antígeno solúvel TX-114, empregando os conjugados de detecção anti-IgG bovina e Proteína A marcados com peroxidase para a identificação de marcadores antigênicos e caracterização do perfil da resposta de anticorpos para o sorodiagnóstico da infecção por *B. abortus*.

O perfil eletroforético do antígeno TX-114 revelou um amplo espectro de polipeptídios que foram reativos para amostras de soros bovinos de GI e GII, utilizando os dois conjugados de detecção. Resultados de *immunoblot* 1-D demonstraram a presença de várias bandas antigênicas imunodominantes, destacando um extenso perfil de sororeatividade para amostras de soros de GI, comparado a um perfil mais restrito para amostras de GII, independente do conjugado de detecção utilizado. Analisando as bandas antigênicas imunodominantes que apresentaram >50% de reconhecimento por amostras de soros bovinos, oito bandas (24, 28, 35, 47, 50, 52, 54 e 63 kDa) foram predominantemente reativas com amostras de soros de GI. É interessante notar que quatro (24, 28, 47 e 52 kDa) destas bandas, em adição à banda de 35 kDa quando foi utilizado o conjugado Proteína A/peroxidase, apresentaram <50% de reconhecimento por amostras de soros de GII, indicando estes componentes antigênicos como potenciais marcadores imunodominantes de infecção. Em adição, três bandas antigênicas <20 kDa (10, 12 e 17 kDa) não imunodominantes e detectadas por ambos os conjugados analisados, foram reconhecidas exclusivamente por amostras de soros de GI, podendo então, contribuir como marcadores adicionais para caracterizar infecção por *Brucella* e excluir resposta vacinal. Por outro lado, cinco bandas antigênicas imunodominantes (32, 38, 41, 45 e 79 kDa) foram reconhecidas por amostras de soros de GI e GII, refletindo em sororeatividade similar entre anticorpos vacinais e aqueles originados após a infecção para este espectro de proteínas antigênicas, portanto, não apresentando valor para o sorodiagnóstico diferencial entre animais infectados e vacinados.

Estudos anteriores demonstraram que a cepa vacinal S19 de *B. abortus* possui menor eficiência em infectar macrófagos e capacidade limitada de resistir aos mecanismos microbicidas gerados pela célula hospedeira, em relação às cepas virulentas, resultando em expressão diferencial de proteínas e alterações fisiológicas globais (LAMONTAGNE et al., 2009). Neste contexto, estas alterações poderiam contribuir ao diferencial perfil de sororeatividade encontrado em animais soropositivos vacinados e não-vacinados no presente estudo, com um amplo espectro de componentes antigênicos reconhecidos por animais infectados comparado a uma faixa mais restrita reconhecida por animais vacinados.

Ensaio de avididade de anticorpos IgG têm sido frequentemente utilizados para distinguir infecção aguda de crônica, como em toxoplasmose (KORHONEN, 1999; BÉLA et al., 2008), neosporose (AGUADO-MARTINEZ et al., 2005), e brucelose humana (KUTLU et al., 2003; MANTECÓN et al., 2008), demonstrando que anticorpos com alta avididade podem ser úteis em excluir infecções recentes. Entretanto, há poucos dados na literatura sobre o desenvolvimento da afinidade de maturação de anticorpos em brucelose bovina, particularmente para

diferenciação de animais vacinados e infectados. Em nosso estudo recente (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010), nós investigamos o valor da avidéz de IgG anti-*B. abortus* mensurada por ELISA indireto utilizando o antígeno S-LPS. Foi observada predominância de anticorpos IgG de alta avidéz em vacas soropositivas não vacinadas, enquanto anticorpos gerados após a vacinação demonstraram baixa avidéz (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010).

Com a finalidade de identificar polipeptídios do antígeno TX-114 que poderiam ser reconhecidos por anticorpos apresentando diferentes padrões de avidéz entre os grupos soropositivos não vacinados e vacinados, nós desenvolvemos um *immunoblot*-avidéz 1-D utilizando uréia 8 M como agente dissociante. Analisando a avidéz de anticorpos IgG em amostras de soros de GI, foi interessante observar que a maioria das bandas antigênicas imunodominantes (24 a 50 kDa), não tiveram suas frequências alteradas após o tratamento com uréia, empregando ambos os conjugados de detecção, exceto para a banda de 24 kDa, quando foi utilizado o conjugado Proteína A/peroxidase, refletindo em amplo espectro de marcadores antigênicos reativos com anticorpos de alta avidéz. Por outro lado, no grupo soropositivo vacinado (GII), a maioria das bandas antigênicas imunodominantes mostrou alteração significativa na sua frequência após o tratamento com uréia, especialmente quando utilizado o conjugado Proteína A/peroxidase, como resultado da reatividade com anticorpos vacinais de baixa avidéz para esses componentes antigênicos.

Em adição, um perfil restrito de bandas antigênicas imunodominantes com massa molecular >50 kDa (54, 63 e 79 kDa) reconhecidas por soros de GI e GII demonstraram redução significativa em suas frequências após o tratamento com uréia, para ambos os reagentes de detecção utilizados, caracterizando reconhecimento por anticorpos de baixa avidéz em ambos os grupos, não sendo úteis portanto para o sorodiagnóstico diferencial entre animais infectados e vacinados. Vale ressaltar a significativa redução da frequência, após tratamento com uréia, para as bandas antigênicas de 10 e 52 kDa empregando o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase, indicando um reconhecimento destes componentes antigênicos por anticorpos de baixa avidéz.

Estes resultados foram posteriormente reforçados quando foi comparado o índice de avidéz médio (IA) de IgG para cada componente antigênico entre os grupos GI e GII, mostrando uma faixa intermediária de componentes antigênicos imunodominantes (28 a 50 kDa) reconhecidos por anticorpos de alta avidéz (IA>50%) em soros de GI e baixa avidéz (IA<50%) em soros de GII, especialmente quando utilizado o conjugado Proteína A/peroxidase. Adicionalmente, bandas antigênicas com massas moleculares mais altas (54, 63 e 79 kDa) foram reconhecidas por anticorpos de baixa avidéz em ambos os grupos,

especialmente em GII, quando detectadas por ambos conjugados. As bandas antigênicas de menor massa molecular (<28 kDa) foram reativas com anticorpos de baixa avidéz (10 e 24 kDa) ou alta avidéz (12 kDa) somente em soros de GI e detectadas por ambos conjugados, enquanto a banda de 17 kDa apresentou um reconhecimento diferencial por anticorpos de baixa ou alta avidéz, quando utilizado o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase ou Proteína A/peroxidase, respectivamente.

Quando foram comparados os conjugados de detecção utilizados em relação aos índices de avidéz dos anticorpos reativos aos componentes antigênicos em cada grupo de soros, foi claramente evidenciado que ambos os conjugados foram capazes de detectar predominantemente anticorpos de alta avidéz nos soros de GI, enquanto o conjugado Proteína A/peroxidase foi mais hábil em detectar anticorpos de baixa avidéz nos soros de GII. Estes resultados estão de acordo com nossos estudos prévios mostrando a capacidade diferencial do conjugado Proteína A/peroxidase em detectar preferencialmente anticorpos de alta avidéz em soros bovinos infectados e de baixa avidéz em soros bovinos vacinados (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010), enfatizando a hipótese sugerida por Nielsen e colaboradores (2004) que anticorpos de baixa afinidade poderiam estar presentes em bovinos vacinados com *Brucella*. É importante ressaltar que animais do grupo GI pertencem quase exclusivamente a um perfil cronicamente infectado, considerando seus perfis sorológicos determinados por SAT/2-ME e iELISA, bem como seus dados epidemiológicos. Estes resultados estão de acordo com a alta avidéz de anticorpos IgG para os principais componentes imunodominantes encontrados neste grupo. Portanto, estes dados enfatizam o uso do conjugado Proteína A/peroxidase na caracterização de anticorpos de baixa avidéz gerados após a vacinação, possibilitando melhor distinção sorológica entre os grupos de animais infectados e vacinados.

Estudos anteriores têm utilizado Proteína A, Proteína G ou proteína recombinante A/G marcadas com peroxidase em ELISAs como reagentes de detecção de anticorpos anti-*Brucella* em várias espécies animais (NIELSEN et al., 2004; NIELSEN et al., 2007). É amplamente conhecido que Proteína G reage com ambas as subclasses de IgG bovinas (IgG1 e IgG2), enquanto Proteína A reage mais especificamente com a subclasse IgG2 (LAWMAN et al., 1986). Desta forma, em nosso estudo recente, utilizando iELISA com antígeno S-LPS (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010), o uso do conjugado Proteína A/peroxidase foi capaz de detectar predominantemente o isotipo IgG2 em amostras soropositivas de bovinos não vacinados, correlacionando esse perfil de isotipo IgG com o aumento dos níveis de exposição antigênica, que é geralmente visto em infecção por *Brucella* (SAEGERMAN et al., 2004). É interessante salientar que soros de novilhas vacinadas de GII foram obtidos 90 dias após a

vacinação, período no qual ocorre o maior pico de produção de anticorpos após a vacinação. Portanto, a presença de anticorpos IgG2 de alta avidéz reativos a um amplo espectro de componentes antigênicos do antígeno solúvel TX-114 em amostras soropositivas de animais não vacinados (GI) em adição à presença de anticorpos IgG2 de baixa avidéz com perfil de sororeatividade mais restrito aos componentes antigênicos em amostras soropositivas de animais vacinados (GII), ambos detectados pela Proteína A/peroxidase, indicam uma diferenciação no perfil da afinidade dos anticorpos IgG2 em resposta à infecção ou vacinação. Estes dados confirmam a hipótese proposta em nossos estudos anteriores, utilizando ensaios de avidéz com diferentes conjugados, para o papel da subclasse IgG2 como um anticorpo de alta afinidade de maturação após a infecção, reforçando que os isotipos IgG1 e IgG2 possuem diferentes perfis de afinidade e que a taxa de IgG2/IgG1 é mais elevada em infecção (PAJUABA; SILVA; MINEO, 2010). Desta forma, a avaliação dos níveis de avidéz de anticorpos IgG2 específicos a marcadores antigênicos de *B. abortus* pode ser uma ferramenta adicional para o sorodiagnóstico diferencial da brucelose bovina.

Em resumo, estes resultados indicam que cinco bandas antigênicas imunodominantes (24, 28, 35, 47 e 52 kDa) predominantemente reconhecidas por anticorpos IgG de alta avidéz em amostras soropositivas de bovinos não-vacinados em adição a três componentes antigênicos não-imunodominantes (10, 12 e 17 kDa) reconhecidas exclusivamente por amostras de soros deste grupo (GI) e reativas com anticorpos IgG de alta avidéz (12 e 17 kDa) ou baixa avidéz (10 kDa), podem ser consideradas potenciais marcadores moleculares antigênicos de infecção por *Brucella* e exclusão de anticorpos vacinais. Além disso, ambos os conjugados analisados foram capazes de detectar anticorpos IgG de alta avidéz em amostras de bovinos infectados, enquanto que o conjugado Proteína A/peroxidase foi mais potente em detectar anticorpos de baixa avidéz do isotipo IgG2 em amostras de soro de bovinos vacinados, evidenciando uma distinção no perfil de afinidade funcional de anticorpos IgG em resposta à infecção e vacinação.

A caracterização proteômica do novo antígeno solúvel de *B. abortus* obtido pela extração com TX-114 revelou 42 *spots* no gel 2-D, sendo possível identificar 22 proteínas hipotéticas com sublocalização citoplasmática e prováveis funções moleculares analisadas no banco de dados. Geralmente, a extração com TX-114 é utilizada para preparações antigênicas enriquecidas com proteínas de membrana integrais, como as proteínas periplasmáticas ou OMPs, que são predominantemente encontradas na fase hidrofóbica da extração com TX-114 como previamente descrito para *B. melitensis* (TIBOR; DECELLE; LETESSON, 1999). No presente estudo, foi empregado a fase aquosa solúvel da extração de *B. abortus* por TX-114,

visto que a fração hidrofóbica revelou densa e indistinta marcação das bandas antigênicas, quando analisadas pelo *immunoblot* (dados não demonstrados), sendo sugestivo de interação com a fração LPS da bactéria. Em contraste, a fração hidrofílica demonstrou um perfil mais distinto e claramente definido de bandas antigênicas. Portanto, a identificação de proteínas hipotéticas com sublocalização citoplasmática reitera a aplicabilidade dessa preparação hidrofílica para a pesquisa da antigenicidade de componentes intracelulares de *B. abortus*.

Quando *Brucella* apresenta transição da fase de crescimento logarítmico para a fase fisiológica estacionária dentro do fagossomo da célula hospedeira, ela adquire resistência a uma variedade de condições desfavoráveis, incluindo a exposição a pH ácido, enzimas lisossomais, reativos intermediários do oxigênio e redução de nutrientes, através da expressão de genes que auxiliam na sua adaptação e sobrevivência (KO; SPLITER, 2003). Dentre as proteínas induzidas para esta adaptação, destacam-se as proteínas de *heat shock*, incluindo a recombinase A (RecA), a superóxido dismutase (Sod) e uma proteína de proteção da fase estacionária na carência de nutrientes (Dps). Estas proteínas apresentaram, no presente estudo, correspondência aos *spots* #18, 39 e 38, respectivamente, no gel 2-D como também uma proteína relacionada com o metabolismo do íon ferro, a bacterioferritina (Bfr) (*spot* #37).

Outras proteínas de *heat shock* também tiveram seus valores estimados, como as proteínas da família ClpATPases, as proteases ClpP (*spot* #16) e Hsl (*spot* #17) dependentes de ATP, com alto grau de conservação e descritas com função molecular de chaperonas (EKAZA et al., 2001), concordando com os achados obtidos da análise proteômica global de *B. melitensis* (WAGNER et al., 2002) e da análise proteômica comparativa entre a cepa vacinal Rev1 e virulenta de *B. melitensis* (ESCHENBRENNER et al., 2002). A proteína hipotética DnaJ (*spot* #26), com função de transporte de várias outras proteínas intracelulares, e a proteína ubiE (*spot* #32) foram também identificadas na análise proteômica do envelope celular de *B. abortus* (CONNOLLY et al., 2006). Pequenas alterações no *pI* e *Mr* podem ser causadas por variações na mobilidade da eletroforese 2-D de diferentes produtos de uma mesma ORF devido a modificações pós-translacionais (ESCHENBRENNER et al., 2002).

O antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* analisado por *immunoblot* 2-D com diferentes *pools* de soros bovinos de cada grupo (GI, GII e GIII) revelou vários *spots* individuais e seriados, dos quais 21 *spots* tiveram seus valores de *pI* e *Mr* relacionados no gel 2-D. Na tentativa de identificar marcadores antigênicos diferenciais entre os grupos, foram estabelecidas diferentes regiões de padrões de reatividade de anticorpos IgG de acordo com as faixas de massa molecular. Desta forma, foi evidenciado que a maioria dos polipeptídeos antigênicos das regiões I (*Mr* 65-70 kDa, *pI* heterogêneo), II (*Mr* 24-45 kDa, *pI* heterogêneo)

e IV (M_r 50-79 kDa, pI 6,4-7,2) foram reconhecidos concomitantemente por amostras de soros bovinos de GI e GII, especialmente quando detectados pelo conjugado anti-IgG bovina/peroxidase. Assim, estes marcadores moleculares não podem ser considerados para o sorodiagnóstico diferencial entre animais infectados e vacinados, embora a maioria destes marcadores tivesse sua proteína hipotética relacionada no banco de dados.

Foi interessante observar que a região II apresentou uma marcação mais densa, com a presença de *spots* seriados com valores muito próximos de M_r e pI heterogêneo. Esta marcação característica pode ser devido a modificações pós-traducionais de proteínas, com a incorporação de moléculas de carboidratos em epítomos reconhecidos por anticorpos IgG específicos e que não aparecem corados no gel 2-D, pois o método de coloração do gel enfatiza a detecção de proteínas (BACHRACH et al., 1997).

Além disso, vários polipeptídeos antigênicos das regiões I e IV também foram reconhecidos por amostras soronegativas de animais não vacinados (GIII) somente quando utilizado o conjugado de detecção anti-IgG bovina/peroxidase. Estes soros apresentaram fraca marcação a um perfil restrito de reatividade (de 50 a 79 kDa) em ambos *immunoblots* 1-D e 2-D, indicando possivelmente reatividade cruzada às proteínas conservadas dentro de microorganismos procarióticos, como a GMP sintase ou glutamina transferase (*spot* #2) que já foi caracterizada em *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* (LAVIGNE et al., 2005), como também em *Salmonella dublin* (MCFARLAND et al., 1987). Neste sentido, várias proteínas antigênicas de *B. abortus* podem apresentar homologia na sequência de aminoácidos para outras proteínas de várias bactérias e a presença de anticorpos com reatividade cruzada em amostras soronegativas de bovinos não vacinados, estabelecidos em condições de campo, deve ser considerada devido ao contato freqüente com outras bactérias. É importante ressaltar, entretanto, que a utilização do conjugado de detecção Proteína A/peroxidase em ambos *immunoblots* 1-D e 2-D possibilitou a exclusão dessa reatividade cruzada em animais soronegativos não vacinados.

Por outro lado, os polipeptídeos identificados na região III (M_r <20 kDa, pI heterogêneo) foram reconhecidos exclusivamente por amostras de animais soropositivos não vacinado (GI), predominantemente quando utilizado o conjugado de detecção anti-IgG bovina/peroxidase. Entretanto, não foi possível relacionar estes marcadores com proteínas hipotéticas no banco de dados. Dos *spots* identificados na região III, quatro *spots* (#37, 38, 39, 40) tiveram seus peptídeos identificados por espectrometria de massa e analisados posteriormente no banco de dados do programa Blastp. Desta maneira, a associação do *immunoblot* 2-D e o sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massa permitiu a

identificação de proteínas antigênicas reconhecidas distintamente por anticorpos IgG de amostras de bovinos soropositivos vacinados e não vacinados.

A proteína Bfr (ferritina bacteriana ou citocromo B1, *spot* #37), pertence à superfamília das proteínas diferro-carboxiladas, sendo constituída pela associação de subunidades protéicas de 26,5 a 28 kDa, resultando em uma proteína oligomérica nativa de 560 kDa (BARCELÓ; MIRALLES; AREÁN, 1997). As ferritinas são proteínas conservadas desde procariotos até eucariotos, desempenhando um papel fundamental no metabolismo celular, com a função de reservar ferro de uma forma segura e biodisponível, devido às suas propriedades oxidorrredutoras (BRIAT; LOBREAUX, 1997). No presente estudo, a Bfr demonstrou marcante antigenicidade, sendo reconhecida somente por anticorpos IgG de amostras soropositivas de bovinos não vacinados. Estudos anteriores identificaram através da técnica de microsequenciamento de proteínas, a expressão de Bfr em *B. melitensis* em resposta ao estresse oxidativo e também como uma proteína imunogênica que estimula a proliferação de linfócitos B (DENOEL et al., 1995; TEIXEIRA-GOMES et al., 2000). Estes dados colaboram com a relevância do uso de Bfr como antígeno para novos ensaios de diagnóstico.

A análise de aminoácidos do *spot* #38 foi correlacionada com duas proteínas de *Brucella*, a Dps e a NdpK-I, com *Mr* inferior a 20 Kda. A Dps é uma proteína conservada e está relacionada com a manutenção do metabolismo da bactéria associado com a resistência ao estresse na fase estacionária, sendo sua expressão benéfica para a adaptação da bactéria no compartimento fagossomal da célula hospedeira (ROOP II et al., 2004). Evidência da expressão de Dps foi relatada em recente estudo sobre as adaptações fisiológicas sofridas por *B. abortus* S19 (cepa vacinal atenuada) e 2308 (cepa virulenta) durante a infecção de macrófagos murinos (LAMONTAGNE et al., 2009). Domínios NdpK-I estão presentes em uma grande família de proteínas estruturalmente e funcionalmente conservadas, tanto em humanos como em bactérias, e são responsáveis pela transferência de fosfatos do nucleosídeo trifosfato (NTP) para o nucleosídeo difosfato (NDF). Estudos anteriores, utilizando sequenciamento de aminoácidos N-terminal, identificaram a NdpK em *B. melitensis* (TEIXEIRA-GOMES et al., 1997). No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez, a antigenicidade das proteínas Dps/ NdpK-I para soros bovinos infectados e não vacinados.

A análise de espectrometria de massa identificou também a proteína antigênica Sod (*spot* #39), apresentando a maior identidade de cobertura das seqüências peptídicas (36,4%) e um forte reconhecimento por amostras soropositivas de animais não vacinados, detectadas por ambos os conjugados de detecção no *immunoblot* 2-D. Sod é uma proteína *heat shock* que participa do sistema de defesa antioxidante, protegendo a *Brucella* dos efeitos tóxicos dos

reativos intermediários do oxigênio (ROIs), através da conversão dos radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio (KO; SPLITER, 2003). Foi interessante observar que um dos peptídeos sequenciados da Sod apresentou um epítopo imunogênico previamente caracterizado em ensaios de imunização em camundongos BALBc (TABATABAI; PUGH, 1994), enfatizando o perfil marcante de reconhecimento do peptídeo por amostras de soro de bovinos não vacinados e infectados.

A identificação de peptídeos com perfil alcalino correspondeu à proteína B de invasão (*spot* #40) que ainda não tinha sido relatada em *B. abortus* S19, sendo reconhecida como antigênica por soros de bovinos não vacinados e infectados, utilizando ambos os conjugados de detecção. Esta proteína foi descrita como um dos principais fatores de virulência em *Bartonella bacilliformis*, estando diretamente relacionada com o parasitismo de eritrócitos humanos, sendo sua expressão diretamente regulada em resposta às alterações ambientais da célula hospedeira, como pH, temperatura, estresse oxidativo. A proteína B de invasão foi identificada na análise proteômica de *B. melitensis* e também foi relacionada como antígeno protetor em ensaio de desafio de camundongos com *B. melitensis* (COMMANDER et al., 2007) e, até o presente, o papel dessa proteína em *B. abortus* S-19 ainda não foi descrito.

Um estudo imunoproteômico 2-D do antígeno do envelope celular da cepa virulenta *B. abortus* 2308 identificou 42 *spots*, sendo que 33 proteínas foram reconhecidas como antigênicas ao serem testadas com amostras de soros de pacientes infectados com *B. suis* e de bovinos infectados com *Brucella* (CONNOLLY et al., 2006). Todas as proteínas identificadas neste último estudo não apresentaram relação com as proteínas sequenciadas no presente trabalho.

Na análise 2-D de preparações antigênicas utilizadas para o sorodiagnóstico da brucelose, oito diferentes proteínas foram também identificadas, como a superóxido dismutase (Sod), as proteínas *heat shock* (GroEL, GroES, and DnaK), HtrA, proteína ribossomal L7/L12, precursor da proteína imunogênica BCSP31 e a proteína 60 kDa (AL DAHOUK et al., 2006; LIN et al., 1995; RAFIE-KOLPIN et al., 1996). Recentemente, foi realizado um estudo comparativo de proteínas antigênicas sorodominantes entre amostras de soros de humanos e caprinos, ambos infectados com *B. melitensis* cepa 16M, para um melhor esclarecimento das diferenças na resposta imune entre humanos e caprinos (LIANG et al., 2010). Dois antígenos foram sorodiagnosticados para ambos (proteína periplasmática de 26 kDa e Protease DO, também designada de HtrA), onze antígenos exclusivamente sorodiagnosticados para humanos e dezesseis para caprinos. A maioria desses antígenos são lipoproteínas, proteínas transportadoras e proteínas relacionadas com a patogenicidade.

Quando foi analisado o perfil de sororeatividade obtido pelos *immunoblots* 1-D e 2-D, foi possível estabelecer uma relação entre as três bandas antigênicas não imunodominantes (10, 12 e 17 kDa) que foram reconhecidas exclusivamente por anticorpos de baixa avidéz de soros bovinos não-vacinados (GI) pelo *immunoblot* 1-D e quatro polipeptídeos com *Mr* inferior a 20 kDa e *pI* 5,1-8,4 (*spots* #37, 38, 39 e 40) que apresentaram forte marcação no *immunoblot* 2-D e puderam ser caracterizados por análise proteômica como proteínas de *Brucella* já descritas na literatura (Bfr, Dps/Ndpk-KI, Sod e Proteína B de invasão). Destas proteínas, Ndpk-I e proteína B de invasão foram identificadas, pela primeira vez no presente estudo, em cepa vacinal de *B. abortus* S-19 e relacionadas com a antigenicidade em amostras soropositivas de bovinos não vacinados.

Portanto, a análise imunoproteômica deste novo antígeno solúvel de *B. abortus* obtido pela extração com o detergente TX-114 permitiu a caracterização de várias proteínas antigênicas de *B. abortus* S-19, algumas ainda não descritas na literatura, que podem ser utilizadas como ferramentas para o sorodiagnóstico da brucelose em bovinos e diferenciação entre animais vacinados com a cepa atenuada S19 e infectados.

6. CONCLUSÕES

- Os perfis eletroforéticos 1-D e 2-D do antígeno solúvel de *B. abortus* obtido pela extração com TX-114 demonstraram amplo espectro de polipeptídeos variando de 10 a 79 kDa, que foram reativos com amostras soropositivas de bovinos não vacinados e vacinados, utilizando os conjugados de detecção anti-IgG bovina/peroxidase e Proteína A/peroxidase.
- Um extenso perfil de sororeatividade foi detectado por *immunoblots* 1-D e 2-D do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* em amostras soropositivas de bovinos não vacinados, comparado a um perfil mais restrito em amostras soropositivas de bovinos vacinados, independente do conjugado de detecção empregado.
- Cinco componentes antigênicos imunodominantes (24, 28, 35, 47 e 52 kDa) do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* foram predominantemente reconhecidos por anticorpos IgG de alta avidéz em amostras soropositivas de bovinos não-vacinados e podem ser considerados como potenciais marcadores imunodominantes de infecção.
- Três componentes antigênicos não imunodominantes (10, 12 e 17 kDa) do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* foram exclusivamente reconhecidos por amostras soropositivas de bovinos não-vacinados e podem ser considerados como marcadores adicionais para caracterizar infecção por *Brucella* e excluir resposta vacinal.
- Os dois conjugados de detecção analisados foram capazes de detectar anticorpos IgG específicos de alta avidéz em amostras soropositivas de bovinos não-vacinados, enquanto que o conjugado Proteína A/peroxidase apresentou maior capacidade em detectar anticorpos IgG2 específicos de baixa avidéz em amostras soropositivas de bovinos vacinados.
- A avaliação dos níveis de avidéz de anticorpos IgG2 específicos a marcadores antigênicos do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* pode ser uma ferramenta adicional para o sorodiagnóstico diferencial da brucelose bovina, possibilitando melhor distinção sorológica no perfil de afinidade funcional de anticorpos IgG em resposta à infecção e vacinação.

- A caracterização proteômica do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* revelou 42 *spots* no gel 2-D e permitiu a identificação de 22 proteínas hipotéticas com sublocalização citoplasmática e prováveis funções moleculares.
- A análise do perfil de sororeatividade em *immunoblot* 2-D revelou que polipeptídeos com *Mr* inferior a 20 kDa foram reativos exclusivamente com amostras soropositivas de bovinos não-vacinados, empregando ambos os conjugados de detecção, reforçando o valor deste grupo de marcadores moleculares no sorodiagnóstico de infecção por *B. abortus* e exclusão de resposta vacinal.
- A análise por espectrometria de massa dos peptídeos do antígeno solúvel TX-114 de *B. abortus* que apresentaram reconhecimento distinto entre amostras soropositivas de bovinos não-vacinados e vacinados permitiu a identificação de cinco proteínas antigênicas de *B. abortus* S19 (Bfr, Dps/Ndpk-I, Sod e Proteína B de invasão).
- As proteínas Ndpk-I e proteína B de invasão foram identificadas pela primeira vez, no presente estudo, em cepa vacinal de *B. abortus* S19 e relacionadas com a antigenicidade em amostras soropositivas de bovinos não vacinados.
- A análise imunoproteômica deste novo antígeno solúvel de *B. abortus* obtido pela extração com o detergente TX-114 permitiu a caracterização de várias proteínas antigênicas de *B. abortus* S-19, sendo que a Bfr, Dps/Ndpk-KI, Sod e Proteína B de invasão foram reconhecidas exclusivamente por anticorpos IgG de bovinos soropositivos não-vacinados, podendo portanto, ser utilizadas como ferramentas para o sorodiagnóstico da brucelose bovina e diferenciação entre animais vacinados com a cepa atenuada S19 e infectados.

REFERÊNCIAS¹

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.

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. 71, n.1-2, p. 161-167, 2000.

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, n. 5, 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**, Heidelberg, 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**. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, Samuel Baron, cap.28, 1996. Disponível em :<<http://www.ncbi.nlm/books/htm>>. Acesso em: 10 fevereiro 2006.

ALTON, G. G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.190 p.

BACHRACH G, BANAI M, FISHMAN Y, BERCOVIER H. Delayed-type hypersensitivity activity of the *Brucella* L7/L12 ribosomal protein depends on posttranslational modification. **Infection and immunity**, Washington, v.1, p.267-271, 1997.

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

BARCELO, F.; MIRALLES, F.; AREAN, C.O. Purification and Characterization of Ferritin from Alfalfa Seeds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 66, n. 1, p. 23-27, 1997.

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.

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.

BÉLA, S. R.; OLIVEIRA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; REIS, F. C.; CARRIJO, T. O.; MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 62, n. 3, p 245-54, 2008.

BILLARD, E.; DORNAND, J.; GROSS, A. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 12, p. 5916-5923, 2007.

BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S. W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, Columbia, v. 11, n. 1, p. 41-44, 1999.

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.

BOSCHIROLI, M. L., FOULONGNE, V., O'CALLAGHAN, D., Brucellosis: a worldwide zoonosis. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, p. 58-64, 2001.

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**. Brasília, 2006a. 101 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Situação epidemiológica da brucelose bovina e bubalina no Brasil** (Primeiro relatório parcial). Brasília, 2006b. 83p.

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

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

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 6, de 08 de Janeiro de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 jan. 2004. Seção 1, p. 6-10.

BRIAT, J. F.; LOBRÉAUX, S. Iron storage and ferritin in plants. **Metal ions in biological systems**, New York, v. 35, p.563-584, 1998.

CAMPOS, M. A.; ROSINHA, G. M.; ALMEIDA, I. C.; SALGUEIRO, X. S.; JARVIS, B. W.; SPLITTER, G. A.; QURESHI, N.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 72, n. 1, p.176-186, 2004.

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, n. 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.

CARVALHO-NETA, A.V.; MOL, J. P.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T.A.; LAGE, A.P.; SANTOS, R L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **Veterinary Journal**, London, v. 184, n.2, 146-55, 2010.

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.

CASTAÑEDA-ROLDÁN, E. I.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; SALDAÑA, Z.; AVELINO, F.; RENDÓN, M. A.; DORNAND, J.; GIRÓN, J. A. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 1877-1887, 2006.

CHAIN, P. S.; COMERCI, D. J.; TOLMASKY, M. E.; LARIMER, F. W.; MALFATTI, S. A.; VERGEZ, L. M.; AGUERO, F.; LAND, M. L.; UGALDE, R. A.; GARCIA, E. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 12, p. 8353–8361, 2005.

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**, Amsterdam, 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. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 5, n. 6, p. 862- 870, 1998.

COMMANDER, N.J.; SPENCER, S.A.; WREN, B.W.; MACMILLAN, A. P. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. **Vaccine**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 43-54, 2007.

CONNOLLY, J. P.; COMERCI, D.; ALEFANTIS, T. G.; WALZ, A.; QUAN, M.; CHAFIN, R.; GREWAL, P.; MUJER, C. V.; UGALDE, R. A.; DELVECCHIO, V.G. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 13, p. 3767-3780, 2006.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an Overview. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

CORBEL, M.J. **Brucellosis in humans and animals**. Genova: **World Health Organization Press**, 2006.102 p.

CRASTA, O. R.; FOLKERTS, O.; FEI, Z.; MANE, S. P.; EVANS, C.; MARTINO-CATT, S.; BRICKER, B.; YU, G.; DU, L.; SOBRAL, B. W. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. 2193-2204, 2008.

DELVECCHIO, V. G.; WAGNER, M. A.; ESCHENBRENNER, M.; HORN, T. A.; KRAYCER, J. A.; ESTOCK, F.; ELZER, P.; MUJER, C. V. *Brucella* proteomes - a review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 593-603, 2002.

DENOEL, P.A.; ZYGMUNT, M.S.; WEYNANTS, V.; TIBOR, A.; LICHTFOUSE, B.; BRIFFEUIL, P.; LIMET, J. N.; LETESSON, J. J. Cloning and sequencing of the bacterioferritin gene of *Brucella melitensis* 16M strain. **FEBS letters**, Amsterdam, v.361, n. 2-3, p. 238-242, 1995

EKAZA, E.; TEYSSIER, J.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; LIAUTARD, J. P.; KÖHLER, S. Characterization of *Brucella suis* clpB and clpAB mutants and participation of the genes in stress responses. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, n. 8, p. 2677-2681, 2001.

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

ESCHENBRENNER, M.; WAGNER, M. A.; HORN, T. A.; KRAYCER, J. A.; MUJER, C. V.; HAGIUS, S.; ELZER, P.; DELVECCHIO, V. G. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain, 16M. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, n. 18, p. 4962-4970, 2002.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Brucellosis. Genova. 1986. 132 p.

FRANCO, M. P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; SMITS, H.L. Human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, p. 775-786, 2007.

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.

GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P. M.; VIZMANOS, J. L.; LÓPEZ-GOÑI, I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 779-781, 2006.

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**, Paris, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2001.

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.

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

GUZMAN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; PARRA, A.; CLOECKAERT, A.; GARIN, J.; GORVEL, J. P.; MORIYON, I.; MORENO, E.; LOPEZ-GONI, I. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 19, p.12375-12380, 2002

HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; ZUERNER, R. L.; QING, Z.; LI, L. L.; KAPUR, V.; ALT, D. P.; OLSEN, S. C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 187, n. 8, p. 2715–2726, 2005.

HANSEN, K. R.; NIELSEN, L. R.; LIND, P. Use of IgG avidity ELISA to differentiate acute from persistent infection with *Salmonella* Dublin in cattle. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 1, p.144-152, 2006.

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

KAUFMANN, A. F.; MELTZER, M. I.; SCHIMID, G. P. The economics 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.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K.L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p. 202-212, 2008

LAMONTAGNE, J.; FOREST, A.; MARAZZO, E.; DENIS, F.; BUTLER, H.; MICHAUD, J. F.; BOUCHER, L.; PEDRO, I.; VILLENEUVE, A.; SITNIKOV, D.; TRUDEL, K.; NASSIF, N.; BOUDJELTI, D.; TOMAKI, F.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; BRUNET, S.; CÔTÉ-MARTIN, A.; HUNTER, J.; MORENO, E.; PARAMITHIOTIS, E. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. **Journal of Proteome Research**, Washington v.8, n. 3, p.1594-1609, 2009.

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.

LAVIGNE, J.P.; VERGUNST, A. C.; BOURG, G.; O'CALLAGHAN, D. The IncP Island in the genome of *Brucella suis* 1330 was acquired by Site-Specific Integration. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, p. 7779-7783, 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. In: PASTORET, P.P.; GOVAERT, A.; BAZIN, H. (Ed.). **Immunologie Animale, medicine-sciences**. Paris: Flammarion, 1990. p. 596-599.

LIANG, L.; LENG, D.; BURK, C.; NAKAJIMA-SASAKI, R.; KAYALA, M.A.; ATLURI, V.L.; PABLO, J. UNAL, B.; FICHT, T.A.; GOTUZZO, E.; SAITO, M.; MORROW, W.J.; LIANG, X.; BALDI, P.; GILMAN, R.H.; VINETZ, J.M.; TSOLIS, R.M.; FELGNER, P.L. Large scale immune profiling of infected humans and goats reveals differential recognition of *Brucella melitensis* antigens. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v.4, n. 5, p. 673-674, 2010.

LIN, J.; FICHT, T. A. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1409-1414, 1995.

LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; MORIYÓN, I.; MORENO, E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 329-339, 2002.

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, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCERO, N.E.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I.; JACOB, N.R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiology and infection**. Cambridge, v.136, n .4, p. 496-503, 2008.

MACEDO, G. C.; MAGNANI, D. M.; CARVALHO, N. B.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, n. 2, p. 1080-1087, 2008.

MANTECÓN, M. de L. A.; GUTIÉRREZ, M. P.; ZARZOSA, M. del P.; FERNÁNDEZ-LAGO, L.; COLMENERO, J.de D.; VIZCAÍNO, N.; BRATOS, M. A.; ALMARAZ, A.; CUBERO, A.; MUÑOZ, M. F.; RODRÍGUEZ; TORRES, A.; ORDUÑA, A. Influence of brucellosis history on serological diagnosis and evolution of patients with acute brucellosis. **The Journal of infection**, London, v.57, n. 5, p. 397-403, 2008.

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.

MCFARLAND, W .C; STOCKER, B.A. Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 3, p.129-41,1987.

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, n. 1-2, p. 171-178, 2003.

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.

MICHAUX, S.; PAILLISSON, J.; CARLES-NURIT, M. J.; BOURG, G.; ALLARDET-SERVENT, A.; RAMUZ, M. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 175, n. 3, p.701-705, 1993.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

MONTOYA, Y.; LEON, C.; TALLEDO, M.; NOLASCO, O.; PADILLA, C.; MUÑOZ-NAJAR, U.; BARKER, D. C. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 91, n. 6, 674-676, 1997.

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

MORENO, E.; MORIYON, I.; *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 1, p. 1-3, 2002.

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.; 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.

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. ; SMITH, P.; YU, W.L.; ELMGREN, C.; HALBERT, G.; NICOLETTI, P. ; PEREZ, B. ; CONDE, S.; SAMARTINO, L.; NICOLA, A.; BERMUDEZ, R.; RENTERIA, T. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v. 125, p.246-250, 2008.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.L.; ELMGREN, C.; NICOLETTI, P.; PEREZ, B.; BERMUDEZ, R.; RENTERIA, T. Second generation competitive enzyme immunoassay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n.1-2, p. 173-177, 2007.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. 2009, cap.2.3.1 . Disponível em: <<http://www.oie.int> >

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.

PAJUABA, A. C. M.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Evaluation of Indirect ELISA and IgG Avidity Assays Using Protein A-Peroxidase Conjugate for Serological Distinction between *Brucella abortus* S19-Vaccinated and Infected Cows. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, n.4, p. 588-595, 2010.

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.

PAULIN, L. M.; FERREIRA-NETO, J. S. O combate à brucelose bovina. **Situação brasileira**. Jaboticabal: Funep, 2003. 154p.

PAULSEN, I. T.; SESHADRI, R.; NELSON, K. E.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, J. F.; READ, T. D.; DODSON, R. J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L. M.; BEANAN, M. J.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; DURKIN, A. S.; KOLONAY, J. F.; MADUPU, R.; NELSON, W.; C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S. E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S. R.; WHITE, O.; SALZBERG, PAULSEN, I. T., SESHADRI, R., NELSON, K.E., EISEN, J.A., HEIDELBERG, J.F., READ, T.D., DODSON, R. J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L. M.; BEANAN, M. J.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; DURKIN, A. S.; KOLONAY, J. F.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S. E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S. R.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; HOOVER, D. L.; LINDLER, L. E.; HALLING, S. M.; BOYLE, S. M.; FRASER, C. M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington , v. 99, n. 20, p. 13148-13153, 2002.

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.

PHILLIPS, R. W.; ROOP, R. M. 2nd. *Brucella abortus* HtrA functions as an authentic stress response protease but is not required for wild-type virulence in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5911-5913, 2001.

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

RAFIE-KOLPIN, M.; ESSENBERG, R. C.; WYCKOFF, J. H. 3rd. Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 64, n. 12, p. 5274-5283, 1996.

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.

ROOP, R. M. ; BELLAIRE, B. H.; VALDERAS, M. W.; CARDELLI, J. A. Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 621-630, 2004.

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.

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.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O. N.; PODTELEJNIKOV, A. V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 25, p. 14440-14445, 1996.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; NESVADBOVA, J.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; LE FLÈCHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; KRÜGER, M.; LODRI, C.; PFEFFER, M. Isolation of *Brucella microti* from soil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1316-1317, 2008.

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.

TABATABAI, L. B.; PUGH, G. W. Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. **Vaccine**, Guildford, v. 12, n. 10, p. 919-924, 1994.

TEIXEIRA-GOMES, A. P.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M. S. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. **Infection and immunity**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2954-2961, 2000.

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, 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.; STAEGELIN, 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.

TSOLIS, R. M.; SESHADRI, R.; SANTOS, R. L.; SANGARI, F. J.; LOBO, J. M.; DE JONG, M. F.; REN, Q.; MYERS, G.; BRINKAC, L. M.; NELSON, W. C.; DEBOY, R. T.; ANGIUOLI, S.; KHOURI, H.; DIMITROV, G.; ROBINSON, J. R.; MULLIGAN, S.; WALKER, R. L.; ELZER, P. E.; HASSAN, K. A.; PAULSEN, I. T. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 5, e5519, 2009.

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.; 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.

WAGNER, M. A.; ESCHENBRENNER, M.; HORN, T. A.; KRAYCER, J. A.; MUJER, C. V.; HAGIUS, S.; ELZER, P.; DELVECCHIO, V. G. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: Identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, n. 8, p. 1047-1060, 2002.

WEISS, D. S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A.; MORENO, E. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 8, p. 5137-5143, 2005.

WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, Netherlands, v. 9, p. 1168–1184, 2009.

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.