

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA SOROLÓGICA DE BEZERRAS DA RAÇA
TABAPUÃ RECÉM-VACINADAS COM AMOSTRA B19 DE
*Brucella abortus***

Thalita Masoti Blankenheim

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA SOROLÓGICA DE BEZERRAS DA RAÇA
TABAPUÃ RECÉM-VACINADAS COM AMOSTRA B19 DE
*Brucella abortus***

Thalita Masoti Blankenheim

Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias

Coorientadora: Prof. Dra. Raphaella Barbosa Meirelles Bartoli

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

Jaboticabal – São Paulo

Julho de 2012

Blankenheim, Thalita Masoti
B642r Resposta sorológica de bezerras da raça Tabapuã recém-
vacinadas com amostra B19 de Brucella abortus / Thalita Masoti
Blankenheim. -- Jaboticabal, 2012
x, 81 f.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Luis Antonio Mathias
Banca examinadora: Samir Issa Samara, Anna Monteiro Correia
Lima Ribeiro.
Bibliografia

1. Brucelose. 2. Sorologia. 3. Polarização Fluorescente.
4. Vacinação I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THALITA MASOTI BLANKENHEIM – nascida em São Paulo – SP, em 15 de abril de 1987, é Médica Veterinária formada pelo Centro Universitário de Rio Preto – Unirp, situado na cidade de São José do Rio Preto – SP, em dezembro de 2009. Durante o primeiro ano de formada, de março 2010 a fevereiro de 2011, obteve uma bolsa de treinamento técnico nível III da Fapesp, com as atividades realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Iniciou o curso de pós-graduação em março de 2011, durante o qual contou com o apoio do CNPq, com bolsa de mestrado durante o período de maio 2011 a julho 2012.

Há quem diga que todas as noites são de sonhos

Mas há quem garanta que nem todas...

Só as de verão!

Mas, no fundo, isso não tem muita importância.

O que interessa mesmo não são as noites em si.

Mas, sim, os sonhos...

Sonhos que o homem sonha sempre

Em todos os lugares

Em todas as épocas do ano

Dormindo ou acordado...

WILLIAM SHAKESPEARE.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô
Alcebíades, *in memoriam*, que mesmo “ausente” se
manteve constante em meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **João e Ana**, pelo apoio, incentivo e “puxões de orelha” durante todas as fases da minha vida. MUITÍSSIMO obrigada pela maior herança que pais podem dar aos filhos: uma base sólida, bons exemplos, excelente caráter, dignidade e o estudo... Essa herança ninguém nunca poderá roubar de mim...

Ao grande orientador, **Luis Antonio Mathias**, exemplo de ética e de profissional. Com certeza gostaria de seguir seus exemplos durante toda a minha vida. Muito obrigada pela atenção, pela confiança e pelas oportunidades de crescimento.

À minha coorientadora **Raphaella**, que além de amiga e madrinha foi uma irmã me indicando a direção e o caminho certo a seguir. Que segurou as minhas mãos enquanto meus passos não eram firmes... Com certeza quero ser parecida com você “quando crescer”...

À minha irmã, **Gabriela**, por ter me ensinado o real valor de uma irmã... Por ter enxugado minhas lágrimas nos momentos de felicidade e por estar ao meu lado nos momentos de ansiedade...

Ao meu cunhado, **Clodoaldo**, mais que um amigo... Um irmão que sempre me estendeu a mão e me ofereceu um ombro amigo. Que me fez rir nos momentos tensos de contagens das tabelas... “Crô”,... você é um anjinho bom nas nossas vidas...

Ao meu marido, **Maicon**... Por ser meu amigo, companheiro e confidente para todas as horas... Por me apoiar, me incentivar, me criticar e por acima de

tudo me amar... Sem você as coisas seriam bem mais complicadas... Sei que a distância não foi e nunca será empecilho para nós... Já que teremos uma vida inteira pela frente... Te amo e te amarei eternamente...

Ao técnico **Nivaldo Aparecido Assis**, que se tornou membro da minha família e com quem aprendi muito... Não só na prática de laboratório... Mas também na vida... Com quem compartilhei horas incríveis de conversas... Com quem aprendi o valor de escutar e ajudar ao próximo...

A todos os **professores** e **funcionários** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva... Muito obrigada pelo agradável convívio todos esses meses...

À minha amiga **Mirelle**, que iniciou o mestrado junto comigo e compartilhou de vários momentos e disciplinas... Muito obrigada pela estadia... Muito obrigada pelas horas maravilhosas de conversas... Muito obrigada por me transmitir calma nos momentos de tensão... E pode ter certeza que estaremos juntas no doutorado “pro que der e vier”...

Aos meus companheiros de laboratório **Rafael, Gian, Glaucenyra, Renata** e **Felipe**... Com certeza vocês foram mais que irmãos nessa jornada. Sem vocês as coisas teriam sido bem mais sem graça e sem emoção... Muito obrigada pelos baldes intermináveis de tubos, pelas incontáveis pipetas para embalar, pelas tardes de polarização, pelas noites de mercaptoetanol e pelas farras quase que diárias de sorvete e milk shake... Amo vocês do fundo do meu coração...

Ao **Guilherme Tricca**, pela paciência nos dias de coleta, pela imensa compreensão, pelo acolhimento... Obrigada pela confiança...

À **Isabela Tricca**, pelo apoio nas coletas, pela preparo das listas de coleta, pela organização dos tubos para armazenagem das amostras e pela paciência constante...

Ao professor **Daniel**, que me cedeu o espaço físico do laboratório para o processamento das amostras. Além disso, muito obrigada pelo exemplo indiscutível de caráter e ética...

A todos os **residentes** e **professores** do hospital veterinário da UNIRP, por permitirem que eu os acompanhasse nos dias de visita à fazenda onde as coletas foram realizadas... Meu eterno muito obrigada... Sem vocês, com certeza, tudo seria muito mais difícil...

A todos os **funcionários** da fazenda que auxiliaram no manejo e na contenção dos animais...

Muito obrigada sempre...

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
APÊNDICES	v
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Brucelose	3
2.2 Vacinação dos animais com a cepa B19.....	4
2.3 Diagnóstico.....	6
2.3.1 Antígeno acidificado tamponado (AAT)	7
2.3.2 Soroaglutinação lenta + 2-mercaptoetanol (SAL/2-ME).....	8
2.3.3 Reação de fixação de complemento (RFC)	9
2.3.4 Teste de polarização fluorescente (TPF)	11
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Rebanho.....	15
4.2 Obtenção das amostras	15
4.3 Vacinação.....	16
4.4 Técnicas laboratoriais.....	16
4.4.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)	16
4.4.2 Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)	17
4.4.3 Teste de soroaglutinação lenta (SAL).....	18
4.4.4 Reação de fixação de complemento (RFC)	20
4.4.5 Teste de polarização fluorescente (TPF)	20
4.5 Análise de dados.....	22

5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	42
8. REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas com <i>Brucella abortus</i> B19 entre três e oito meses de idade (adaptado de BRASIL, 2004a)	19
Quadro 2 -	Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas não vacinadas com <i>Brucella abortus</i> B 19 e machos com idade superior a oito meses (adaptado de BRASIL, 2004a)	19
Quadro 3 -	Resultados possíveis de um teste de diagnóstico em comparação com a condição verdadeira do indivíduo testado	22
Quadro 4 -	Comparação entre os resultados de dois testes de diagnóstico ...	23
Quadro 5 -	Interpretação da concordância pelo coeficiente kappa, segundo PEREIRA (2000)	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de bezerras da raça Tabapuã vacinadas com <i>Brucella abortus</i> B19, segundo o resultado dos testes para diagnóstico de brucelose e o tempo (dias) após a vacinação	26
Tabela 2 -	Valores de especificidade (em porcentagem) para cada teste de diagnóstico de brucelose, de acordo com os dias após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com <i>Brucella abortus</i> B19	28
Tabela 3 -	Número e porcentagem de bezerras da raça Tabapuã que apresentaram resultado negativo nos testes de diagnóstico de brucelose até 180 dias após a vacinação com <i>Brucella abortus</i> B19.	29
Tabela 4 -	Valores de kappa entre os testes realizados para diagnóstico de brucelose conforme o tempo após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com <i>Brucella abortus</i> B19	31
Tabela 5 -	Resultados do teste de χ^2 de McNemar ($\chi^2 > 3,84$: $P < 0,05$; $\chi^2 > 6,64$: $P < 0,01$) na comparação entre os resultados dos testes para diagnóstico de brucelose 30 dias após a vacinação e os resultados obtidos no mesmo teste a partir de 60 dias após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com <i>Brucella abortus</i> B19	32
Tabela 6 -	Resultados do χ^2 de McNemar ($\chi^2 > 3,84$: $P < 0,05$; $\chi^2 > 6,64$: $P < 0,01$) na comparação entre os testes para diagnóstico de brucelose segundo o tempo após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com <i>Brucella abortus</i> B19	34

APÊNDICES

Apêndice 1 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x 2-ME (Inc+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	50
Apêndice 2 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x 2-ME (IncEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	51
Apêndice 3 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	52
Apêndice 4 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	53
Apêndice 5 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFvar (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	54
Apêndice 6 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFvar (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	55
Apêndice 7 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFvar (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	56
Apêndice 8 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	57

Apêndice 9 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	58
Apêndice 10 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	59
Apêndice 11 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	60
Apêndice 12 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPF (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	61
Apêndice 13 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPF (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	62
Apêndice 14 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPF (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	63
Apêndice 15 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPF (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	64
Apêndice 16 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPF (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	65
Apêndice 17 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPF (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	66

Apêndice 18 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de RFC x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	67
Apêndice 19 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de RFC x TPF (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	68
Apêndice 20 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de RFC x TPF (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	69
Apêndice 21 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de RFC x TPF (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	70
Apêndice 22 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de TPFfixo x TPF (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	71
Apêndice 23 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de TPFfixo x TPF (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	72
Apêndice 24 -	Grupo de tabelas de comparação dos testes de TPFfixo x TPF (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar	73
Apêndice 25 -	Grupo de tabelas de análise do teste de AAT de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	74
Apêndice 26 -	Grupo de tabelas de análise do teste de 2-ME (Inc+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	75

Apêndice 27 -	Grupo de tabelas de análise do teste de 2-ME (IncEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	76
Apêndice 28 -	Grupo de tabelas de análise do teste de RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	77
Apêndice 29 -	Grupo de tabelas de análise do teste de TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	78
Apêndice 30 -	Grupo de tabelas de análise do teste de TPFvar (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	79
Apêndice 31 -	Grupo de tabelas de análise do teste de TPFvar (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	80
Apêndice 32 -	Grupo de tabelas de análise do teste de TPFvar (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar	81

Resposta sorológica de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com amostra B19 de *Brucella abortus*

RESUMO – O trabalho teve como objetivo analisar a resposta sorológica induzida pela vacinação com a dose padrão de $60-120 \times 10^9$ organismos da amostra B19 de *Brucella abortus* em bezerras da raça Tabapuã, com idade entre 3 e 8 meses, pelos testes sorológicos preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) para diagnóstico da brucelose bovina. Foram examinadas amostras de soro sanguíneo de 72 animais em quatro provas sorológicas: antígeno acidificado tamponado (AAT), teste de soroaglutinação lenta juntamente com o teste de 2-mercaptoetanoll (2-ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF), o qual foi interpretado de duas formas: ponto de corte variável e ponto de corte fixo. As amostras de soro sanguíneo foram colhidas imediatamente antes da vacinação, e após 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 dias. Foi calculada a especificidade dos testes, e os resultados foram comparados pelo indicador kappa e pelo teste χ^2 de McNemar. O TPF apresentou especificidade mais elevada do que os outros testes nas amostras colhidas dos 30 aos 90 dias após a vacinação, mas com o passar do tempo a diferença entre a especificidade do TPF e a dos outros testes diminuiu. Aos 270 dias de vacinação, observou-se especificidade de 93,74% no AAT, no 2-ME e na RFC. No TPF com ponto de corte variável a especificidade foi 87,5%, e com ponto de corte fixo foi 100,0%. Foi possível concluir que o TPF apresentou maior capacidade de discriminação dos títulos de anticorpos vacinais logo após a vacinação, quando comparado com os outros testes preconizados pelo PNCEBT, apresentando-se, portanto, como uma ferramenta útil para o diagnóstico da brucelose bovina, além de ser de execução fácil e rápida.

Palavras-chave: Brucelose, Sorologia, Polarização Fluorescente, Vacinação.

Serological response of Tabapuã heifers recently vaccinated with *Brucella abortus* strain 19

ABSTRACT - The study aimed to analyze the antibody response induced by vaccination with the standard dose of $60-120 \times 10^9$ organisms of *Brucella abortus* strain 19 in Tabapuã heifers, aged between 3 and 8 months, by serological tests recommended by the National Program for Brucellosis and Tuberculosis Control and Eradication (PNCEBT) for the diagnosis of bovine brucellosis. Serum samples of 72 animals were examined by four serological tests: rose Bengal test (RBT), standard agglutination test with the 2-mercaptoetanol (2-ME) test, complement fixation test (CFT) and fluorescence polarization assay (FPA), which was interpreted in two ways: variable cutoff and fixed cutoff. Heifers were bled immediately prior to vaccination, and after 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 and 360 days. Specificity of the tests were calculated, and the results were compared using the kappa statistic and the McNemar's χ^2 test. The FPA had a higher specificity than the other tests on the samples collected from 30 to 90 days after vaccination, but over time this difference decreased. At 270 days of vaccination, the specificity of RBT, 2-ME and RFC was 93.74%. The specificity of the FPA with variable cutoff was 87.5%, and with fixed cutoff was 100.0%. It was concluded that FPA had a higher discrimination ability for vaccination antibody titers shortly after vaccination, when compared with other tests recommended by the PNCEBT, and is a useful tool for the diagnosis of bovine brucellosis, besides being easy and quick to perform.

Keywords: Brucellosis, Serology, Fluorescence polarization, Vaccination.

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma enfermidade de grande importância econômica, responsável por consideráveis prejuízos para a pecuária, além de risco para a saúde humana, especialmente para grupos ocupacionais que mantêm contato mais estreito com essa espécie animal.

Trata-se de infecção distribuída mundialmente, embora a grande maioria dos países desenvolvidos tenha conseguido erradicá-la ou reduzir significativamente sua taxa de prevalência.

Essa grande importância tem motivado a adoção de programas sanitários visando a erradicar ou pelo menos a controlar a enfermidade como forma de minimizar os prejuízos causados e restringir a adoção de barreiras que limitam a colocação da produção pecuária em mercados mais exigentes e de maior poder aquisitivo.

Esses programas têm como base a vacinação das bezerras com a amostra B 19 de *Brucella abortus*, além do diagnóstico para a identificação e eliminação dos animais infectados. Por sua praticidade, rapidez e baixo custo, a pesquisa de anticorpos é o recurso usado nesses programas para identificar as fontes de infecção, pois é a única maneira viável de examinar um grande número de animais, como exige esse tipo de programa sanitário.

Da combinação dessas duas medidas sanitárias resulta um problema ocasionado pelo fato de a amostra B19 induzir títulos de anticorpos que podem causar resultados falso-positivos nos testes de diagnóstico sorológico. Por possuir composição antigênica semelhante à das amostras de *Brucella* de campo, a amostra vacinal dá origem a anticorpos que reagem nos testes rotineiros de diagnóstico.

Inúmeras investigações já foram desenvolvidas com o objetivo de diferenciar anticorpos induzidos pela vacina B19 daqueles induzidos pela infecção, e têm sido obtidos testes mais específicos, com maior poder de discriminação,

mas a diferenciação absoluta entre a resposta vacinal e a resposta à infecção ainda está por ser obtida.

No Brasil foi implantado, em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que também adota a vacinação obrigatória das bezerras de três a oito meses de idade com a amostra B19 e testes sorológicos como métodos de diagnóstico. O programa prevê o uso do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) como método de triagem, e os resultados positivos nesse teste podem ser confirmados pela combinação do teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAL) com o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) ou então pela reação de fixação de complemento (RFC), sendo adotado o esquema de interpretação dos resultados em série para a conclusão do diagnóstico.

Mais recentemente, foi aprovado também o uso do teste de polarização fluorescente (TPF), o qual pode ser empregado como teste único ou como teste confirmatório no caso de resultado positivo no teste de triagem.

Para reduzir a influência dos títulos vacinais nos testes de diagnóstico, o programa brasileiro estabelece que as fêmeas vacinadas sejam examinadas somente após os 24 meses de idade, ocasião em que, na grande maioria dos animais, o título de anticorpos induzidos pela vacina já deverá ter reduzido acentuadamente.

No entanto, embora excepcionalmente, pode haver necessidade de testar animais antes daquela idade em razão de exigências comerciais, como, por exemplo, normas de países importadores, de associações de registros de animais, além de eventuais exigências por parte de compradores receosos de introduzir a infecção em seu rebanho.

Diante dessa situação, pretendeu-se, no presente estudo, avaliar o comportamento dos títulos vacinais induzidos pela amostra B19 em bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas, detectados pelos testes adotados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o diagnóstico da brucelose no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Brucelose

A brucelose é uma das antropozoonoses mais importantes e difundidas pelo mundo (POESTER et al., 2002). É uma doença de evolução crônica, causada por bactérias do gênero *Brucella*, Gram-negativas e intracelulares facultativas. Nos animais, é uma enfermidade que acomete principalmente o sistema reprodutivo e o sistema osteoarticular. Quando localizada no sistema reprodutivo, pode ocasionar aborto no terço final da gestação, orquite e epididimite nos touros; já no ser humano pode causar infecção generalizada. É conhecida nos animais como doença de Bang, mal de Bang ou aborto enzoótico, e no ser humano é conhecida como febre ondulante, febre de Malta ou ainda como febre do Mediterrâneo (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

No Brasil, a brucelose humana foi detectada pela primeira vez em 1913, por Gonçalves e Carneiro (POESTER et al., 2002; KOLODA, 2005). O diagnóstico clínico da brucelose bovina foi descrito em 1914 por Danton Seixas. No Estado de São Paulo, a primeira descrição da brucelose bovina foi feita por Tinaciro Icibani, em 1922, por meio de exames em tecidos de fetos abortados (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

A brucelose bovina (*Brucella abortus*) é causada por uma bactéria intracelular facultativa, pertencente ao gênero *Brucella* que comporta outras nove espécies, associadas a diferentes hospedeiros: *Brucella melitensis* (caprinos e ovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella neotomae* (rato-do-deserto), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella canis* (cães), *Brucella ceti* (cetáceos), *Brucella pinnipedialis* (pinípedes), *Brucella microti* (ratazana) e *Brucella inopinata* (BANAI e CORBEL, 2010).

A *Brucella abortus* possui oito biótipos diferentes quanto à patogenicidade e à virulência, sendo igualmente importantes em estudos de epidemiologia molecular. São bacilos curtos, medindo 0,5-0,7 mm x 0,6-1,55 mm, encontrados isolados e raramente formando cadeias curtas, não formam cápsula nem esporos, imóveis, Gram-negativos, pleomórficos e crescem em condições microaerófilas (CAMPAÑA et al., 2003).

2.2. Vacinação dos animais com a cepa B19 de *Brucella abortus*

A vacina B19 é produzida com uma amostra de *Brucella abortus* lisa, que em 1923 foi isolada do leite de uma vaca Jersey. Depois de esquecida acidentalmente por mais de um ano à temperatura ambiente, a amostra perdeu a virulência e desde a década de 1930 tem sido utilizada como vacina. Essa vacina foi empregada em vários países que erradicaram a doença como, por exemplo, Austrália, Canadá, Dinamarca, Inglaterra, Holanda, Suécia, entre outros. Além desses países, os Estados Unidos também utilizaram essa vacina no programa de controle até a primeira metade da década de 1990. No Brasil, é a vacina obrigatória para bezerras com idade entre três e oito meses (BRASIL, 2006), exceto no Estado de Santa Catarina, onde, por causa da prevalência baixíssima, a vacinação com essa amostra deixou de ser adotada (BRASIL, 2004b).

A vacina pode também ser conhecida popularmente como anabortina e, como toda vacina, pode apresentar vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens pode-se observar ser uma vacina estável que não se multiplica em presença do eritritol e as reações locais e sistêmicas são mínimas após a inoculação (ALTON et al., 1988). Outro ponto vantajoso é a estimulação do sistema imune do animal vacinado, permitindo assim que o mesmo resista à infecção, pelo desenvolvimento de imunidade contra o lipossacarídeo (LPS) liso da parede celular da *Brucella abortus*. Normalmente um animal vacinado pode ser

resistente à doença por um longo período, contudo os anticorpos detectáveis desaparecem em poucos meses (FIGUEIREDO, 2008), embora alguns poucos animais possam manter título sorológico persistente (ALTON, 1981).

A vacina B19 é atenuada para fêmeas bovinas e bubalinas e pode ser perigosa para machos de quaisquer espécies, devido à virulência residual, expondo esses animais ao risco de desenvolver orquites consideráveis. Se as fêmeas forem vacinadas com idade superior a oito meses, há maior probabilidade de produção de anticorpos que perdurem e interfiram no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade. Quando a vacinação ocorre até os oito meses de idade, tais anticorpos desaparecem rapidamente, e os animais acima de 24 meses são geralmente negativos nas provas sorológicas (BRASIL, 2006).

Apesar de a vacinação de vacas adultas ter sido utilizada em alguns programas internacionais de erradicação, o PNCEBT preconiza apenas a vacinação de bezerras entre três e oito meses de vida, o que permite que a reação vacinal praticamente desapareça antes de um ano (RIBEIRO et al., 1997; MATHIAS et al., 2001; BRASIL, 2006; JARDIM et al., 2006).

Estudos demonstram que a cepa B19 é 65 a 70% efetiva na proteção contra a maioria dos níveis de exposição à *Brucella*, se utilizada na dose correta e na idade recomendada. Também têm demonstrado que a proteção conferida com a cepa B19 ocorre por pelo menos cinco anos, e, provavelmente por toda a vida (PAHO/WHO, 1999).

O objetivo da utilização de vacinas com a cepa B19 de *Brucella abortus* é baixar a taxa de infecção em zonas de alta prevalência, propiciando a erradicação da doença. Quando a imunização é aplicada metodicamente numa região, existe uma redução gradual da frequência da brucelose. Quando a cobertura vacinal atinge 80%, a prevalência da doença estará em patamares inferiores a 2% (PAULIN, 2003).

2.3. Diagnóstico

Desde o reconhecimento original do agente causador da brucelose, *Brucella* spp., um grande número de métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos. O padrão-ouro para o diagnóstico é o isolamento e identificação da bactéria, no entanto, devido a inúmeras razões, métodos alternativos têm sido desenvolvidos. Os métodos alternativos incluem a identificação do ácido nucleico a partir da bactéria por tecnologia de biologia molecular e um grande número de testes sorológicos. Os testes sorológicos são geralmente divididos em três áreas: testes clássicos ou testes convencionais, principais ensaios de ligação e em desenvolvimento tecnológico (POESTER et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial da brucelose pode ser feito por método direto e indireto. O método direto consiste no isolamento do agente em cultura a partir de materiais biológicos de animais infectados por *Brucella* spp. Embora seja o método de diagnóstico mais confiável, requer habilidade quanto à colheita e conservação das amostras e na execução da técnica, além de expor o profissional ao agente. Técnicas mais recentes como a reação em cadeia da polimerase (PCR) produzem melhores resultados quando realizadas a partir de bactérias isoladas em cultivo e exigem mão de obra experiente e equipamentos caros (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003). O sucesso da PCR diretamente de material biológico (tecido placentário e fetal, sêmen, leite, sangue e outros) depende de mais dados a respeito da escolha da amostra e em quanto tempo o DNA bacteriano ainda pode ser detectado na amostra selecionada (FIGUEIREDO, 2008).

Testes sorológicos baseiam-se na reação entre antígenos de *Brucella* spp., células inteiras inativadas ou suas frações purificadas, e anticorpos produzidos em resposta à infecção (ALTON et al., 1988).

A detecção de anticorpos é o recurso mais utilizado quando se trabalha com rebanhos, pois os métodos são rápidos, de fácil execução e baixo de custo, além de apresentarem boa sensibilidade e especificidade. Estes testes são a base da luta contra a brucelose, por permitirem tanto o monitoramento de rebanhos como de regiões inteiras (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Com a origem das campanhas de combate à brucelose, foi necessário um maior incentivo para o desenvolvimento de uma grande variedade de testes para o diagnóstico da brucelose (FARIA, 2010), já que o sucesso de um programa de erradicação da brucelose depende em grande parte de diagnóstico preciso da doença (CHAPPEL, 1989).

De acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2004a), no Brasil, o diagnóstico sorológico da brucelose é constituído dos seguintes testes: teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) como teste de triagem, sendo os resultados positivos confirmados ou pelo teste de 2-mercaptoetanol (2-ME), que é realizado em paralelo com a soroaglutinação lenta em tubos (SAL), ou pelo teste de fixação de complemento (RFC). Posteriormente, foi aprovado também o uso do teste de polarização fluorescente, que pode ser empregado como teste único ou como teste confirmatório para as amostras com resultado positivo no teste de triagem (BRASIL, 2010).

2.3.1. Antígeno acidificado tamponado (AAT)

O AAT apresenta alta sensibilidade e é de fácil execução, empregado como teste de triagem. A suspensão de antígeno utilizada é preparada com *Brucella abortus* amostra 119/3, na concentração de 8%, tamponada em pH ácido (3,65) e corada com rosa de Bengala. É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado, que detecta com maior precocidade as infecções

recentes, quando comparada com a SAL. A presença de grumos após a mistura do soro com a solução de antígeno indica reação positiva, e a ausência, negativa. O pH ácido permite que somente os isótipos da classe IgG₁ aglutinem o antígeno. Podem ocorrer reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19 ou de reações cruzadas com outras bactérias. As reações positivas neste teste devem ser confirmadas por teste de maior especificidade (BRASIL, 2006).

Em função de sua alta sensibilidade, os resultados negativos no teste do AAT são considerados como sendo de animais livres da infecção por *B. abortus*. Entretanto, pela baixa especificidade do teste do AAT em alguns rebanhos, os resultados positivos devem ser confirmados por outros testes quantitativos mais específicos, como o SAL juntamente com o 2-ME ou pela RFC (BRASIL, 2004a).

2.3.2. Soroaglutinação lenta + 2-mercaptoetanol (SAL/2-ME)

O teste do 2-ME é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro suspeito. Esta imunoglobulina indica o estado de infecção ativa. É um teste mais específico, feito em paralelo com a SAL, e deve ser utilizado como confirmatório em animais reagentes no teste de triagem. O tratamento do soro com solução de 2-ME, composto que contém radical tiol, degrada os isotipos IgM. Assim, soros com predomínio de IgM não apresentarão anticorpos suficientes para formação de grumos e a reação será considerada negativa nesta prova (MEGID et al., 2000; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003). A técnica baseia-se no emprego de antígeno de célula total preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração final de 0,045% de volume celular.

Na prova de SAL não há degradação dos isotipos IgM, e estes podem ser responsáveis pela formação de grumos que caracterizam a reação positiva (BRASIL, 2006).

A interpretação dos resultados é feita pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME. Os resultados positivos na prova lenta e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou devido a anticorpos residuais de vacinação com amostra B19 de *Brucella abortus*. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com a infecção, devendo os animais serem considerados infectados (BRASIL, 2004a).

O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições deve ser classificado como: completo (+), incompleto (I) ou negativo (-); reação completa é aquela em que a mistura soro-antígeno aparece translúcida, e a agitação suave não rompe os grumos; reação incompleta é aquela em que a mistura soro-antígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos; reação negativa é aquela em que a mistura soro-antígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos (BRASIL, 2006).

2.3.3. Reação de fixação de complemento (RFC)

A RFC é o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais e tem sido utilizada com sucesso em muitos países nos programas de controle e erradicação. Estudos realizados em bovinos infectados, natural ou experimentalmente, indicaram que a RFC apresenta boa correlação com o isolamento do agente etiológico, fato que embasou sua adoção como teste de referência para a avaliação de outros testes sorológicos (MEIRELLES-BARTOLI e MATHIAS, 2010).

A reação consiste no princípio de que a IgG₁ ligada aos antígenos bacterianos é capaz de sequestrar frações hemolíticas do sistema complemento. É um dos testes mais específicos para a brucelose, detectando precocemente apenas a IgG₁. É aceito como teste padrão para trânsito internacional, mas, por

ser caro e laborioso, é utilizado para animais previamente triados com o teste de AAT ou que irão transitar entre regiões ou países com *status* sanitários diferentes para brucelose (PIRES, 2010).

Deve ser realizado em laboratórios oficiais credenciados, para efeito de trânsito internacional de animais, sendo recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). É um teste confirmatório para animais reagentes no teste de triagem ou para diagnóstico de casos inconclusivos no teste do 2-ME. É um teste trabalhoso e complexo, que exige pessoal treinado e laboratório bem equipado (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

Caso o soro do animal apresente o anticorpo correspondente à infecção, o complemento será fixado ao complexo antígeno-anticorpo específico. Porém, se o soro não contiver anticorpos específicos, o complemento permanecerá livre. O indicador é uma suspensão de 3% de células sanguíneas vermelhas de ovelha (SRBC) sensibilizadas com um volume igual de soro de coelho anti-SRBC (hemolisina), preparada numa diluição previamente determinada contendo a concentração mínima de hemolisina requerida. Com a adição das SRBC sensibilizadas, o sistema hemolítico se completará e ocorrerá hemólise. Ao contrário, se o complemento estiver ligado ao complexo antígeno-anticorpo, não ocorrerá hemólise, pois não haverá complemento livre para se ligar com os eritrócitos sensibilizados (OIE, 2000).

Entretanto, mesmo sendo um teste extremamente útil, a RFC também apresenta vários contratempos. Trata-se de teste complexo, bastante trabalhoso e que exige pessoal treinado, além de exigir o uso de reagentes lábeis, com necessidade de renovação e, portanto, titulação frequente, o que aumenta o trabalho envolvido em sua realização. Além disso, pode ser influenciada pela presença de imunoglobulinas séricas que se ligam ao antígeno sem fixar complemento, mormente IgG₂. Dessa forma, poucos laboratórios realizam esse teste, aumentando as chances de soros que percorrem longas distâncias chegarem aos laboratórios em más condições de conservação, o que, no caso desse teste, é especialmente problemático, em razão da ocorrência de atividade

anticomplementar em soros mal conservados. Outro ponto a ser analisado é que existe uma variação muito grande de técnicas utilizadas, não havendo uma padronização internacional (MEIRELLES, 2008).

2.3.4. Teste de polarização fluorescente (TPF)

O TPF tem um curto histórico de uso e ainda tem de se estabelecer dentro dos procedimentos de testes de rotina da maioria dos laboratórios nacionais de referência (NIELSEN et al., 1996). É um teste já padronizado em vários países, sendo de rápida realização, fácil metodologia e que possui altos valores de especificidade e sensibilidade quando comparado com os testes de rotina (SAMARTINO et al., 1999).

Foi desenvolvido e validado no Canadá, onde a brucelose foi erradicada há mais de uma década, sendo um teste para ser realizado no campo, permitindo o diagnóstico rápido, preciso e barato (NIELSEN et al., 1998; NIELSEN e GALL, 2001).

É um dos testes desenvolvidos recentemente para o diagnóstico da brucelose (McGIVEN et al., 2003; PIRES, 2010). Baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel (marcado com fluorocromo) e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. Uma molécula menor gira aleatoriamente a uma velocidade maior, resultando em rápida despolarização da luz, ao passo que um complexo maior gira mais lentamente, e a despolarização da luz ocorre a uma taxa mais reduzida. Essa mudança na despolarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente (NIELSEN et al., 2000).

O teste de polarização de fluorescência para a detecção de anticorpos contra *Brucella spp.* já foi validado para uso no diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos (NIELSEN et al., 1996; DAJER et al., 1999; SAMARTINO et al., 1999), suínos (NIELSEN et al., 1999), bisão e várias espécies de veados

(GALL et al., 2000). No Brasil, o teste também foi validado pela execução paralela em quatro laboratórios (MATHIAS et al., 2010).

Os diversos estudos de avaliação do TPF mostram que o teste apresenta elevada sensibilidade e elevada especificidade. Também tem sido observado que o teste apresenta especificidade mais elevada do que a dos testes convencionais quando aplicado em fêmeas vacinadas com a amostra B19 de *Brucella abortus* (NIELSEN et al., 1996; SAMARTINO et al., 1999; AGUIRRE et al., 2002; FARIA, 2010).

O mecanismo da prova se baseia na rotação aleatória das moléculas suspensas na solução. O tamanho molecular é o principal fator que influencia a velocidade da rotação, com uma relação de proporcionalidade inversa. Assim, uma molécula pequena gira mais depressa que uma grande. Se uma molécula é marcada com o fluorocromo, pode-se determinar o tempo de rotação através de um ângulo de 68,5° medindo a intensidade da luz em planos verticais e horizontais. Uma molécula grande emite mais luz em um único plano (mais polarizada) que uma pequena que gira mais depressa e emite luz despolarizada. Para o diagnóstico da brucelose, utiliza-se como antígeno um fragmento de baixo peso molecular (média de 22 kD) de *Brucella abortus* marcado com isotiocianato de fluoresceína. Este antígeno é acrescentado ao soro diluído ou ao sangue completo e em dois minutos (para o soro) ou 15 segundos (para o sangue) se obtém uma média do conteúdo de anticorpos por um analisador de polarização fluorescente. Uma leitura superior ao limiar estabelecido (em miliunidades de polarização - mP) indica uma reação positiva (BARBONI et al., 2009).

Dentre as vantagens do teste de polarização fluorescente pode-se citar o fato de ser rápido, ou seja, necessita de aproximadamente dois minutos para a obtenção da resposta, não requer etapas de lavagens para a remoção de reagentes, como o equipamento para a realização do teste é portátil, pode ser levado ao campo (NIELSEN et al., 2001). O teste, de fácil execução, pode ser considerado relativamente barato, e está validado para o sorodiagnóstico da brucelose em várias espécies de animais (NIELSEN, 2002). Para a execução do

teste, é necessário um pequeno volume de soro sanguíneo e o resultado não é afetado pela hemólise (SAMARTINO et al., 1999). A única desvantagem de grande importância é o investimento inicial para a aquisição do aparelho e do kit para a execução do teste.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Analisar a resposta sorológica induzida pela vacinação com a amostra B19 de *Brucella abortus* em bezerras da raça Tabapuã pelos testes sorológicos preconizados pelo PNCEBT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a especificidade dos testes de AAT, soroaglutinação lenta juntamente com o 2-ME, RFC e TPF na diferenciação precoce dos anticorpos induzidos pela vacinação com a amostra B19 de *Brucella abortus* em bezerras da raça Tabapuã.
- Comparar os resultados do TPF com aqueles dos testes de AAT, SAL juntamente com 2-ME e RFC em bezerras da raça Tabapuã vacinadas com *Brucella abortus* amostra B19.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Rebanho

Foram utilizadas 72 fêmeas bovinas da raça Tabapuã, clinicamente saudáveis, com idade de quatro meses no início do projeto. Esses animais foram divididos em grupos, que se mantinham organizados, de acordo com a data de nascimento.

Os animais pertenciam a uma propriedade rural localizada no Município de Novais no Estado de São Paulo. Essa propriedade se dedica à criação de animais de elite, em sistema de criação semi-intensivo.

4.2. Obtenção das amostras

Foram obtidas amostras de sangue imediatamente antes da vacinação e após 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 dias.

Em cada colheita o número de animais ascendia, já que os lotes eram formados de acordo com a data de nascimento dos animais.

O sangue foi obtido por punção da veia jugular com auxílio de tubos Vacutainer® de 10 mL, agulhas descartáveis próprias para o tipo de tubo utilizado e acopladores. Após a retração do coágulo, o soro foi separado e mantido à temperatura de -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

4.3. Vacinação

A vacinação foi realizada por via subcutânea, com dose de 2 mL, conforme recomendações do laboratório fabricante da vacina. Os animais foram vacinados sempre com a mesma marca de vacina, utilizando como dose padrão $60 - 120 \times 10^9$ organismos da amostra B19 de *Brucella abortus*.

4.4. Técnicas laboratoriais

Todas as amostras de soro sanguíneo foram submetidas aos testes de AAT, SAL/2-ME, RFC e TPF.

4.4.1. Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)

Esse método, também conhecido como “card test” ou teste rosa de Bengala, foi realizado com antígeno preparado, pelo Instituto Biológico de São Paulo, com *Brucella abortus* amostra 1119/3, corado com rosa de Bengala, na concentração de 8,0% de volume celular, pH 3,63, conforme recomendado no Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

O AAT teve sua origem no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. O desenvolvimento do teste ocorreu a partir da observação de que a IgG₁ bovina é menos ativa em pH neutro, mudando o seu comportamento bioquímico em meio ácido. O pH $3,65 \pm 0,05$ aumenta o poder da aglutinação da IgG₁, reduz a reatividade da IgM e destrói aglutininas inespecíficas (KOLODA, 2005).

A técnica consistiu em depositar 30µL do soro que foi homogeneizado com 30µL do antígeno com bastão de vidro, em uma placa de vidro quadriculada. Posteriormente à homogeneização da amostra com o antígeno, a placa foi agitada em movimentos lentos, circulatorios e contínuos pelo período de quatro minutos. Após esse período, procedeu-se à leitura, com o auxílio de uma caixa com luz, também conhecida como aglutinoscópio. Os resultados foram interpretados a partir da presença de reação de aglutinação, indicado pela formação de grumos nos animais reagentes e pela ausência dos grumos nos animais não reagentes.

4.4.2. Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)

Esta técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

No estudo foi empregado antígeno de célula total (antígeno para SAL, produzido e comercializado pelo Instituto Biológico de São Paulo), preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração final de 0,045% de volume celular. Como diluente foi empregada solução salina 0,85%, com uma concentração final de 0,1 M de 2-mercaptoetanol. As amostras de soro sanguíneo foram testadas em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2 mL da mistura diluente-soro-antígeno. A leitura foi realizada após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação. O teste do 2-ME foi realizado simultaneamente ao teste de SAL.

4.4.3. Teste de soroaglutinação lenta (SAL)

Conhecida também como teste de soroaglutinação em tubos, esta prova é utilizada em associação com o teste do 2-ME para confirmar resultados positivos na prova de triagem. Foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

A técnica baseia-se na utilização de antígeno de célula total (antígeno para soroaglutinação lenta, produzido e comercializado pelo Instituto Biológico de São Paulo), preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração final de 0,045% de volume celular. Foi utilizada como diluente solução salina 0,85%, com uma concentração final de 0,5% de fenol. As amostras de soro sanguíneo foram testadas em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2 mL da mistura diluente-soro-antígeno. A leitura foi realizada após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação.

A interpretação dos resultados da prova de soroaglutinação lenta é sempre realizada juntamente com a prova do 2-mercaptoetanol, conforme os quadros 1 e 2, analisando o grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições, devendo a reação ser classificada como: completa (+), incompleta (I) ou negativa (-), de acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2004a).

Quadro 1. Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas com *Brucella abortus* B19 entre três e oito meses de idade (adaptado de BRASIL, 2004a).

SAL (UI/mL)	2-ME (UI/mL)	Interpretação
≤ 50	< 25	Negativo
≥ 100	< 25	Inconclusivo
≥ 25	≥ 25	Positivo

SAL: teste de soroaglutinação lenta

2-ME: teste de 2-mercaptoetanol

UI: unidade internacional

Quadro 2. Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas não vacinadas com *Brucella abortus* B 19 e machos com idade superior a oito meses (adaptado de BRASIL, 2004a).

SAL (UI/mL)	2-ME (UI/mL)	Interpretação
≤ 25	< 25	Negativo
≥ 50	< 25	Inconclusivo
≥ 25	≥ 25	Positivo

SAL: teste de soroaglutinação lenta

2-ME: teste de 2-mercaptoetanol

UI: unidade internacional

Pelo fato de se conhecer a condição vacinal dos animais avaliados, os resultados dos testes de SAL e 2-ME foram interpretados de acordo com o quadro do PNCEBT (BRASIL, 2004a) correspondente a animais vacinados (QUADRO 1).

Para a análise dos resultados dicotomizados foram adotadas duas interpretações diferentes: excluindo os resultados inconclusivos e também considerando os inconclusivos como positivos.

4.4.4. Reação de fixação de complemento (RFC)

Foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988). Foi utilizado antígeno produzido e comercializado pelo Instituto Biológico de São Paulo com *Brucella abortus* amostra 1119/3, para a prova de soroaglutinação lenta em tubos. Como complemento foi utilizado soro de cobaia, titulado conforme a técnica descrita por ALTON et al. (1988). Foi empregado sistema hemolítico formado por hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo de coelho contra hemácia de ovino) titulada conforme a recomendação de ALTON et al. (1988). Para a interpretação dos resultados, foram considerados positivos os soros com pelo menos 25% de fixação de complemento na diluição 1:4.

4.4.5. Teste de polarização fluorescente (TPF)

O procedimento deste teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por NIELSEN et al. (1999), utilizando o “*Brucella abortus* Antibody Test Kit” produzido por Diachemix, USA.

Foram separados dois tubos para os controles positivos e negativos mais 48 tubos para as amostras; dessa maneira, em cada rodada de teste eram analisadas 48 amostras. Os tubos foram numerados de um a cinquenta com caneta de tinta permanente. Nos tubos de ensaio referentes aos soros de controle (positivo e negativo), foram colocados 990µL de solução-tampão e 10µL dos soros de controle; nos demais tubos foram depositados 990µL de solução-tampão e 10µL de soros sanguíneos dos bovinos. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em um agitador de tubos, os tubos foram limpos com papel absorvente e, após pelo menos cinco minutos, as amostras foram submetidas a um primeiro ciclo de

leitura, em um analisador de polarização fluorescente modelo Sentry 100 (Diachemix, USA).

Após a primeira leitura, em cada tubo foi adicionada uma quantidade de 10µL de conjugado (antígeno lipopolissacarídeo marcado com fluoresceína) e aguardou-se um tempo de incubação de pelo menos dois minutos à temperatura ambiente. Passado esse período, os tubos foram novamente limpos com papel absorvente e agitados, e após esse procedimento foi realizado o segundo ciclo de leitura, respeitando a mesma ordem em que foi feita a primeira leitura.

A taxa de despolarização da luz é captada pelo aparelho de polarização fluorescente, e o resultado do teste é expresso em unidades de milipolarização (mP). O valor em mP será maior quanto maior for a quantidade de anticorpos no soro analisado.

Para a interpretação dos resultados com ponto de corte variável, o valor em mP obtido no soro de controle negativo foi subtraído do resultado obtido no soro em análise. Foram consideradas negativas as amostras de soro sanguíneo com até 9,9 mP acima da diferença entre o valor observado para o controle negativo testado no mesmo lote da amostra em questão, suspeitos aqueles com diferença de 10,0 a 19,9 mP acima, e positivos os soros com diferença igual ou superior a 20 mP acima do valor do controle negativo, conforme recomenda o fabricante.

Para a dicotomização dos resultados do teste, foram analisados os resultados excluindo os suspeitos e também considerando os inconclusivos como positivos e considerando os inconclusivos como negativos.

Foi feita também a interpretação usando um ponto de corte fixo. Para isso, foi adotado o valor de 87,3 mP (MATHIAS et al., 2010).

4.5. Análise de dados

Foram analisados os dados dicotômicos, ou seja, após interpretação e classificação do resultado em positivo e negativo.

A especificidade dos testes foi calculada pela relação entre o número de resultados negativos e o total de animais examinados, uma vez que todos os animais eram livres da infecção, conforme o quadro abaixo (THRUSFIELD, 2005).

Quadro 3. Resultados possíveis de um teste de diagnóstico em comparação com a condição verdadeira do indivíduo testado.

Resultado do teste	Condição verdadeira		Total
	Infectado	Não infectado	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Especificidade = $d/(b+d)$. No presente estudo, o valor foi multiplicado por 100, de modo que o resultado fosse expresso em porcentagem.

Para a observação da concordância entre os resultados dos testes foi calculado o indicador Kappa, usando a seguinte fórmula (LANDIS e KOCK, 1977), conforme o quadro abaixo.

Quadro 4. Comparação entre os resultados de dois testes de diagnóstico.

Resultado do teste 1	Resultado do teste 2		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

$$Po \text{ (proporção de concordâncias observadas)} = \frac{a + b}{N}$$

$$Pe \text{ (proporção de concordâncias esperadas)} = \frac{\{(a+b) \cdot (a+c)\} + \{(c+d) \cdot (b+d)\}}{N^2}$$

A interpretação dos resultados do indicador kappa foi realizada de acordo com os critérios adotados por PEREIRA (2000), apresentados no quadro 5.

Quadro 5. Interpretação da concordância pelo coeficiente Kappa, segundo PEREIRA (2000).

Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Os resultados dos testes sorológicos também foram comparados utilizando o teste χ^2 McNemar (JEKEL et al., 1999), indicado para a comparação de duas amostras relacionadas. Foi feita a comparação entre os testes, com os variados critérios de interpretação, em cada colheita, e foi feita também a comparação entre os resultados dos testes aos 30 dias de vacinação, momento em que se esperava a especificidade mais baixa, com os resultados do mesmo teste nas colheitas seguintes.

5. RESULTADOS

Todos os 72 animais testados acusaram ausência de reação nas quatro provas sorológicas no dia da vacinação (dia zero), indicando ausência de contato com o microrganismo. Devido ao manejo na fazenda onde as colheitas foram realizadas, os animais foram divididos por lotes de acordo com a data de nascimento. Do mesmo modo eram agrupados em lotes para a venda em leilões; dessa maneira, o número de animais em cada colheita era decrescente, conforme os animais eram vendidos.

Os números de animais em cada colheita classificados como negativos, suspeitos, inconclusivos, ou positivos por teste estão demonstrados na tabela 1.

Os pontos de corte do teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável durante todo o experimento oscilaram de 64,8 a 75,5 mP.

Tabela 1 – Número de bezerras da raça Tabapuã vacinadas com *Brucella abortus* B19, segundo o resultado dos testes para diagnóstico de brucelose e o tempo (dias) após a vacinação.

Dias após vacinação	AAT		2-ME			RFC		TPFvar			TPFfixo		Total
	Neg	Pos	Neg	Inc	Pos	Neg	Pos	Neg	Susp	Pos	Neg	Pos	
0	72	0	72	0	0	72	0	72	0	0	72	0	72
30	0	70	3	7	60	6	64	11	20	39	26	44	70
60	4	61	9	2	54	8	57	9	22	34	22	43	65
90	7	47	10	2	42	14	40	5	19	30	23	31	54
120	13	41	17	1	36	25	29	12	18	24	29	25	54
150	21	24	26	2	17	25	20	11	18	16	28	17	45
180	18	13	20	2	9	20	11	11	12	8	23	8	31
210	16	5	17	0	4	17	4	16	1	4	17	4	21
240	12	5	16	0	1	16	1	15	2	0	16	1	17
270	15	1	15	0	1	15	1	14	2	0	16	0	16
300	4	0	4	0	0	4	0	4	0	0	4	0	4
330	5	0	5	0	0	5	0	5	0	0	5	0	5
360	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Neg: Negativo; Pos: Positivo; Inc: Inconclusivo; Susp: suspeito.

Analisando os dados obtidos, pode-se observar que com o passar do tempo os grupos apresentaram valores crescentes de animais com resultado negativo, embora isso possa ficar mascarado pelo número instável de animais em cada coleta.

Outro ponto que deve ser analisado é a diferença apresentada entre os testes de polarização com ponto de corte variável e o teste de polarização fluorescente com ponte do corte fixo. Essa diferença entre os valores pode ser

atribuída à uniformização obtida quando se utiliza o ponto de corte fixo. Na interpretação com ponto de corte variável observou-se uma considerável proporção de animais suspeitos até 180 dias após a vacinação.

Nas amostras colhidas 180 dias após a vacinação, dois animais ainda apresentaram resultados inconclusivos no teste de 2-ME. Dos 31 animais analisados nesta coleta, 18 foram negativos no teste de AAT, 20 foram negativos nos testes 2-ME e RFC. Desses 18 animais, 11 apresentaram resultado negativo no teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável e 23 foram negativos no teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo.

Após 270 dias da vacinação, dos 16 animais analisados, um foi positivo no AAT, no teste 2-ME e na fixação de complemento e dois foram suspeitos na polarização fluorescente com ponto de corte variável.

Os valores de especificidade encontrados para cada teste conforme o tempo após a vacinação podem ser observados na tabela 2. Aos 30 dias, nota-se que a especificidade do AAT foi zero, uma vez que todos os animais apresentaram resultado positivo. Observa-se também que os testes RFC e 2-ME apresentaram especificidade mais baixa que aquela apresentada pelo TPF nas diferentes formas de interpretação analisadas. No entanto, conforme o tempo passou, a diferença entre as especificidades dos testes tradicionais e a do TPF diminuiu, o que se deveu principalmente à observação de muitos animais com resultado suspeito no TPF. Conforme se pode observar na tabela, a exclusão dos suspeitos e a interpretação com ponto de corte fixo resultam em especificidade superior à verificada nos outros testes aos 180 dias de vacinação.

Observa-se que as maiores especificidades constatadas durante o período analisado para os diversos testes foram: AAT aos 270 dias (93,75%); 2-ME aos 240 dias (94,12%); RFC aos 240 dias (94,12%); e TPFvar e TPFfixo aos 240 dias após a vacinação (88,24% e 94,12%, respectivamente), segundo os dados que constam na tabela 2.

Tabela 2 – Valores de especificidade (em porcentagem) para cada teste de diagnóstico de brucelose, de acordo com os dias após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com *Brucella abortus* B19.

Dias após a vacinação	Testes utilizados							
	AAT	2-ME Inc+	2-ME Inc Ex	RFC	TPFvar Sus +	TPFvar Susp Ex	TPFvar Sus -	TPFfixo
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
30	0,00	4,29	4,76	8,57	15,71	22,00	44,29	37,14
60	6,15	13,85	16,67	12,31	13,85	20,93	47,69	33,85
90	12,96	18,52	19,23	25,93	9,26	14,29	44,44	42,59
120	24,07	31,48	32,08	46,30	22,22	33,33	55,55	53,70
150	46,67	57,78	60,47	55,56	24,44	40,74	64,44	62,22
180	58,06	64,52	68,97	64,52	35,48	57,89	74,19	74,19
210	76,19	80,95	80,95	80,95	76,19	80,00	80,95	80,95
240	70,59	94,12	94,12	94,12	88,24	100,00	100,00	94,12
270	93,75	93,75	93,75	93,75	87,50	100,00	100,00	100,00
300	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
330	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
360	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Susp-: animais suspeitos considerados negativos; Susp+: animais suspeitos considerados positivos; Inc+: animais inconclusivos considerados positivos; Inc-: animais inconclusivos considerados negativos; SuspEx: animais suspeitos excluídos da contagem; IncEx: animais inconclusivos excluídos da contagem.

Dos 72 animais examinados após a vacinação, 34 (47,89%) apresentaram resultado negativo no AAT até os 180 dias. Já no teste 2-ME quando os animais inconclusivos foram considerados positivos, 37 animais (52,11%) apresentaram em algum momento desses 180 dias uma resposta negativa. Excluindo da análise as amostras inconclusivas, 36 (59,02%) de um total de 61 animais chegaram a apresentar resultado negativo em até 180 dias. Na RFC, 37 animais (52,11%)

apresentaram-se negativos ao teste neste período. No TPF com ponto de corte variável, as proporções de animais com resultados negativos até 180 dias oscilaram de 40,85% a 82,61%. No TPF com ponto de corte fixo, 44 animais (61,97%) foram negativos em algum momento desses 180 dias após a vacinação (tabela 3).

Tabela 3 – Número e porcentagem de bezerras da raça Tabapuã que apresentaram resultado negativo nos testes de diagnóstico de brucelose até 180 dias após a vacinação com *Brucella abortus* B19.

Testes de diagnóstico	Nº Neg	% Neg	Total
AAT	34	47,89	71
2-ME Inc +	37	52,11	71
2-ME IncEx	36	59,02	61
RFC	37	52,11	71
TPFvar Susp-	48	67,61	71
TPFvar Susp+	29	40,85	71
TPFvar SuspEx	19	82,61	23
TPF fixo	44	61,97	71

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Susp-: animais suspeitos considerados negativos; Susp+: animais suspeitos considerados positivos; Inc+: animais inconclusivos considerados positivos; Inc-: animais inconclusivos considerados negativos; SuspEx: animais suspeitos excluídos da contagem; IncEX: animais inconclusivos excluído da contagem.

A tabela 4 mostra a concordância entre os diversos testes nos diversos momentos de observação. Quando se compara o AAT com os outros testes tradicionais, observa-se crescimento da concordância com o transcorrer do tempo, observação essa que não é confirmada nas últimas colheitas, em decorrência da diminuição expressiva do número de observações. Aos 30 dias, não foi possível obter o valor de kappa, porque todas as amostras foram negativas no AAT. Essa comparação assinalou um coeficiente kappa de 0,86, indicando concordância

ótima, quando o AAT foi comparado com a combinação de 2-ME e com a RFC aos 210 dias após a vacinação.

Comparando os resultados de 2-ME com os da RFC, observou-se concordância ótima aos 60 e aos 180 dias após a vacinação (tabela 4).

Aos 30 dias após a vacinação, a concordância entre os resultados do TPF e os dos demais testes variou de fraca a regular, na grande maioria das comparações (tabela 4).

Os menores valores desse coeficiente foram observados nas comparações: AAT x TPFvar quando os animais suspeitos foram considerados negativos na colheita aos 60 dias após a vacinação; 2-ME x TPFvar quando os animais inconclusivos foram considerados positivos na colheita do dia 30; RFC x TPFvar quando os animais suspeitos foram considerados negativos na colheita do dia 30. Os maiores coeficientes de concordância foram observados entre as provas de: AAT x TPF na colheita do dia 210; 2-ME x TPF na colheita do dia 210; RFC x TPF na colheita do dia 210; e 2-ME x RFC aos 210 dias após a vacinação (tabela 4).

Tabela 4 – Valores de kappa entre os testes realizados para diagnóstico de brucelose conforme o tempo após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com *Brucella abortus* B19.

Testes comparados	Dias após vacinação									
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
AAT x 2-ME (Inc+)	*	*	0,53	0,79	0,63	0,78	0,73	0,86	0,26	*
AAT x 2-ME (IncEx)	*	*	0,58	0,79	0,63	0,77	0,78	0,86	0,26	-0,07
AAT x RFC	*	*	0,64	0,62	0,54	0,82	0,86	0,86	0,26	-0,07
AAT x TPF fixo	*	*	0,23	0,33	0,37	0,69	0,18	0,86	0,26	*
AAT x TPFvar (Susp-)	*	*	0,13	0,31	0,4	0,65	0,65	0,82	0	*
AAT x TPFvar (Susp+)	*	*	0,58	0,44	0,53	0,45	0,44	1	0,49	0,64
AAT x TPFvar (SuspEx)	*	*	0,57	0,72	0,72	0,92	0,89	1	*	*
2-ME (Inc+) x RFC	*	0,41	0,86	0,79	0,62	0,86	0,72	1	1	1
2-ME (IncEx) x RFC	*	0,47	0,8	0,78	0,61	0,85	0,76	1	1	1
2-ME (Inc+) x TPF fixo	*	0,14	0,4	0,47	0,49	0,72	0,77	1	1	*
2-ME (IncEx) x TPF fixo	*	0,15	0,39	0,52	0,52	0,7	0,92	1	1	*
2-ME (Inc+) x TPF (Susp+)	*	0,23	0,48	0,31	0,58	0,38	0,51	0,86	0,64	0,63
2-ME (Inc+) x TPF (Susp-)	*	0,04	0,31	0,44	0,57	0,86	0,77	1	*	*
2-ME (Inc+) x TPF (SuspEx)	*	0,21	0,66	0,53	0,87	1	1	1	*	*
2-ME (IncEx) x TPF (Susp+)	*	0,28	0,52	0,31	0,58	0,37	0,43	0,86	0,64	*
2-ME (IncEx) x TPF (Susp-)	*	0,04	0,31	0,52	0,56	0,8	0,91	1	*	*
2-ME (IncEx) x TPF (SuspEx)	*	0,25	0,72	0,62	0,87	1	1	1	*	*
RFC x TPF fixo	*	0,27	0,35	0,7	0,7	0,68	0,62	1	1	*
RFC x TPF (Susp+)	*	0,66	0,4	0,33	0,5	0,41	0,34	0,86	0,64	0,64
RFC x TPF (Susp-)	*	0,23	0,56	0,61	0,67	0,82	0,62	1	*	*
RFC x TPF (SuspEx)	*	0,65	0,66	0,88	0,88	1	0,78	1	*	*
TPFfixo x TPF (Susp+)	*	0,48	0,39	0,2	0,39	0,32	0,32	0,86	0,64	-0,06
TPF fixo x TPF (Susp-)	*	0,73	0,69	0,96	0,89	0,86	1	1	*	*
TPFfixo x TPF (SuspEx)	*	0,89	0,93	1	0,94	0,92	1	1	*	*

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Susp-: animais suspeitos considerados negativos; Susp+: animais suspeitos considerados positivos; Inc+: animais inconclusivos considerados positivos; Inc-: animais inconclusivos considerados negativos; SuspEx: animais suspeitos excluídos da contagem; IncEx: animais inconclusivos excluídos da contagem.

*Não calculável.

Comparando os resultados do AAT observados 30 dias após a vacinação com os resultados nas outras ocasiões, nota-se que aos 60 dias a diferença não foi significativa, mas aos 90 dias os resultados diferiram significativamente daqueles observados aos 30 dias ($P < 0,05$) e essa diferença aumentou nas observações feitas aos 120 e 150 dias ($P < 0,01$), conforme se observa na tabela 5. No caso do 2-ME, já foi observada diferença significativa aos 60 dias ($P < 0,05$), o que persistiu aos 90 dias ($P < 0,05$) e aumentou a partir daí ($P < 0,01$). Na RFC, observou-se diferença significativa entre os resultados obtidos aos 30 dias e aqueles obtidos aos 120 dias e após ($P < 0,01$). Também no TPF com ponto de corte fixo não se observou diferença significativa entre os resultados aos 30 dias de vacinação e os resultados aos 60 e 90 ($P < 0,05$); a partir do 120 dias, os resultados diferiram daqueles obtidos aos 30 dias ($P < 0,05$).

Tabela 5 – Resultados do teste de χ^2 de McNemar ($\chi^2 > 3,84$: $P < 0,05$; $\chi^2 > 6,64$: $P < 0,01$) na comparação entre os resultados dos testes para diagnóstico de brucelose 30 dias após a vacinação e os resultados obtidos no mesmo teste a partir de 60 dias após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com *Brucella abortus* B19.

Teste de diagnóstico	60	90	120	150
AAT	2,25	5,14	12,07	18,05
2 ME (Inc+)	5,14	5,14	16,05	22,04
2 ME (IncEx)	4,16	5,14	14,06	18,05
RFC	0,25	3,12	13,05	17,05
TPFfixo	0	0	5,78	4,08
TPF (Susp+)	0,1	1,45	0,08	0,12
TPF (Susp-)	0	0,36	0,26	0,9
TPF (SuspEx)	0	---	---	---

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Susp-: animais suspeitos considerados negativos; Susp+: animais suspeitos considerados positivos; Inc+: animais inconclusivos considerados positivos; Inc-: animais inconclusivos considerados negativos; SuspEx: animais suspeitos excluídos da contagem; IncEx: animais inconclusivos excluídos da contagem.

---Não se pode calcular.

Os resultados do AAT não diferiram significativamente daqueles do 2-ME em todo o período de observação. Já na comparação do AAT com a RFC observou-se diferença significativa pelo teste de McNemar aos 90 dias ($P < 0,05$) e aos 120 dias ($P < 0,01$). Os resultados do AAT, quando comparados com os do TPF com ponto de corte fixo, foram significativamente diferentes em todas as colheitas. Também é interessante observar que os resultados do TPF apresentaram maior diferença com os resultados dos outros testes, principalmente aos 30 dias de vacinação (tabela 6).

Tabela 6 – Resultados do χ^2 de McNemar ($\chi^2 > 3,84$: $P < 0,05$; $\chi^2 > 6,64$: $P < 0,01$) na comparação entre os testes para diagnóstico de brucelose segundo o tempo após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com *Brucella abortus* B19.

Testes comparados	Dias após vacinação					
	0	30	60	90	120	150
AAT x 2-ME (Inc+)	0	1,33	3,2	1,33	1,12	3,2
AAT x 2-ME (IncEx)	0	1,33	3,2	1,33	1,12	3,2
AAT x RFC	0	2,28	2,25	5,14	10,08	2,25
AAT x TPFfixo	0	4,16	16,05	14,06	16,05	5,14
AAT x TPF (Susp-)	0	29,03	25,03	15,05	15,05	6,12
AAT x TPF (Susp+)	0	9,09	3,2	0,16	0	6,75
AAT x TPF (SuspEx)	0	9,09	3,2	---	---	---
2-ME (Inc+) x RFC	0	0,8	0	2,25	4,9	0
2-ME (IncEx) x RFC	0	0,25	0	2,25	4,9	0
2-ME (Inc+) x TPF fixo	0	21,04	9,6	11,07	8,64	0,16
2-ME (IncEx) x TPFfixo	0	19,04	8,64	9,09	7,69	0,16
2-ME (Inc+) x TPF (Susp+)	0	4,9	0,12	1,77	1,77	13,06
2-ME (Inc+) x TPF (Susp-)	0	24,3	19,04	12,07	10,08	1,33
2-ME (Inc+) x TPF (SuspEx)	0	4,9	2,25	---	---	---
2-ME (IncEx) x TPF (Susp+)	0	3,12	0	1,77	1,77	13,06
2-ME (IncEx) x TPF (Susp-)	0	22,32	19,04	9,09	10,08	2,25
2-ME (IncEx) x TPF (SuspEx)	0	3,12	1,33	---	---	---
RFC x TPFfixo	0	18,05	10,56	1,12	1,12	0,57
RFC x TPF (Susp+)	0	3,2	0	5,81	11,07	12,07
RFC x TPF (Susp-)	0	21,04	5,81	8,1	1,77	2,25
RFC x TPF (SuspEx)	0	3,2	2,25	---	---	---
TPFfixo x TPF (Susp+)	0	13,06	9,6	16,05	15,05	15,05
TPFfixo x TPF (Susp-)	0	1,77	8,1	0	0	0
TPFfixo x TPF (SuspEx)	0	0,5	0	---	---	---

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Susp-: animais suspeitos considerados negativos; Susp+: animais suspeitos considerados positivos; Inc+: animais inconclusivos considerados positivos; Inc-: animais inconclusivos considerados negativos; SuspEx: animais suspeitos excluídos da contagem; IncEx: animais inconclusivos excluídos da contagem.

--- Não se pode calcular.

6. DISCUSSÃO

A indução de anticorpos pela vacina com amostra B19 de *Brucella abortus* tem sido motivo de preocupação há várias décadas devido às reações falso-positivas que esses anticorpos podem acarretar, resultando em redução na especificidade do diagnóstico sorológico. Daí advém o desenvolvimento de um grande número de investigações científicas destinadas a elucidar esse problema, usando várias estratégias, como a limitação da faixa etária dos animais vacinados e a criação de novas técnicas sorológicas que possam proporcionar maior especificidade ao diagnóstico.

De um modo geral, as investigações realizadas mostram uma forte resposta sorológica, que se mantém ao longo de alguns meses, porém que, para a maioria dos animais, se reduz significativamente com o transcorrer do tempo, e os dados do presente estudo também apontam nesse sentido.

Cumprе ressaltar que, mesmo após um período curto de tempo, nem todos os animais apresentaram reação significativa em todos os testes. Observou-se que 30 dias após a vacinação o único teste que apontou resultado positivo em todos os animais foi o AAT, justamente o teste de triagem e do qual se espera menor especificidade. Já os testes que podem ser usados como confirmatórios apontaram número variável de resultados negativos. Nesse particular, deve-se destacar o desempenho do teste de polarização fluorescente, que apresentou o maior número de resultados negativos aos 30 dias de vacinação (tabela 1).

Embora a grande maioria dos animais possa ter o título vacinal significativamente reduzido ao longo do tempo, há animais que mantêm títulos persistentes, o que está relacionado com a persistência da infecção pela amostra vacinal (CHAPPEL, 1989).

A B19, sendo uma cepa de baixa virulência de *Brucella abortus* biovar 1, induz resposta imunológica idêntica àquela resultante da infecção por cepa de campo. Quando os bovinos são vacinados na idade correta (de três a oito meses

de idade), todos os animais têm o título de anticorpos resultantes diminuído dentro de pouco tempo, geralmente com um ano de idade. Porém, a vacina pode induzir títulos sorológicos vacinais persistentes e infecção permanente pela cepa B19 numa pequena porcentagem de animais vacinados (PAHO/WHO, 1999).

De acordo com ALTON (1981), ao redor de uma em cada 200 bezerras vacinadas mantém reação sorológica por um período de tempo prolongado. Os dados do presente estudo não permitem obter conclusões seguras a respeito dessa persistência, porque não foi possível acompanhar todos os animais ao longo de todo o período, uma vez que animais foram vendidos pelo proprietário no momento em que ainda apresentavam reação positiva nos vários testes sorológicos avaliados.

Segundo NICOLETTI (1990), em geral, as vacinas vivas com antígeno de *Brucella* promovem imunidade mais duradoura do que as inativadas, sendo que a bactéria se multiplica no hospedeiro, geralmente, por períodos limitados e a resistência conferida é do tipo celular. Os anticorpos têm menor papel na proteção, e estudos em bovinos têm mostrado baixa relação de anticorpos pós-vacinais circulantes com a imunidade subsequente.

Como esperado, o AAT foi o teste com menor especificidade aos 30 dias de vacinação, uma vez que nenhum animal apresentou resultado negativo, o que tem sido observado em vários outros estudos (MATHIAS et al., 2001). Já a maior especificidade foi observada no TPF, o que também está de acordo com os dados encontrados na literatura. No primeiro artigo científico a descrever o uso desse teste no diagnóstico sorológico da brucelose bovina, NIELSEN et al. (1996) relataram elevada especificidade do teste ao examinar soro de animais adultos que haviam sido vacinados com *Brucella abortus* B19, e, particularmente em animais recém-vacinados, SAMARTINO et al. (1999) observaram especificidade de 64,9% aos 26 dias após a vacinação, acima dos valores variando de 15,71% a 44,29%, dependendo do critério de interpretação, observados no presente estudo (tabela 2).

A especificidade observada nos testes confirmatórios aos 30 dias de vacinação condiz com os valores obtidos por SAMARTINO et al. (1999). No presente estudo, observou-se especificidade de 4,29% e 8,57%, respectivamente, nos testes 2-ME e RFC, ao passo que aqueles autores constataram 3,2% e 7,0% de especificidade para os dois testes que o programa brasileiro recomenda para a confirmação de resultados que foram positivos na triagem.

Destacando a especificidade observada aos 90 dias de vacinação, para a qual se encontram dados correspondentes na literatura, observou-se o valor de 12,96% no AAT, ao passo que FARIA (2010) observou valor bem superior, 41,94% de animais com resultado negativo.

Nos testes confirmatórios do programa brasileiro, os valores observados no presente estudo também foram inferiores aos observados por outros autores aos 90 dias de vacinação. Aos 89 dias de vacinação, SAMARTINO et al. (1999) obtiveram 61,3% e 75,1% de especificidade, respectivamente, nos testes 2-ME e RFC, FARIA (2010) observou valores de 62,37% e 69,89%, aos 90 dias, enquanto neste estudo os valores foram bem inferiores, 18,52% e 25,93%, respectivamente.

No TPF, aos 90 dias, a especificidade encontrada neste trabalho também foi inferior à observada por aqueles autores. FARIA (2010) analisou também dois critérios de interpretação do TPF. Adotando o ponto de corte variável, obtiveram especificidade de 70,97% se os resultados suspeitos forem considerados positivos, enquanto no presente estudo se observou apenas 9,26%, e 87,1% com ponto de corte fixo, ao passo que no presente estudo o valor obtido foi 42,59% e no de SAMARTINO et al. (1999), aos 89 dias, foi de 92,1%. No presente estudo, nesta ocasião, obteve-se uma grande proporção de resultados suspeitos, reduzindo a especificidade do teste.

Destaque-se ainda que no trabalho de SAMARTINO et al. (1999) a dose vacinal, adotada na Argentina, foi de $3-5 \times 10^9$ organismos vivos, ao passo que no Brasil a dose utilizada é de $60-120 \times 10^9$, dose esta utilizada no presente estudo e no estudo de FARIA (2010).

Aos 180 dias de vacinação, no presente estudo se observou especificidade de 58,06%, 64,52% e 64,52%, respectivamente, nos testes AAT, 2-ME e RFC, enquanto FARIA (2010) observou 87,1%, 88,17% e 91,4%, respectivamente. No que diz respeito ao TFP, FARIA (2010) encontrou especificidade de 83,7% e 87,1% com ponto de corte variável e fixo, respectivamente, ao passo que, na mesma situação, constatou-se especificidade de 35,48% e 74,19%, respectivamente, na presente pesquisa.

Embora, de um modo geral, os valores de especificidade observados tenham sido inferiores aos constatados nas duas pesquisas discutidas acima, os três estudos mostram que logo após a vacinação a especificidade do TPF é bastante superior à dos outros testes avaliados, mas, com o passar do tempo, essa diferença vai diminuindo, ao ponto de FARIA (2010) ter observado praticamente a mesma especificidade entre o AAT e o TPF após 12 meses de vacinação. Os dados do presente estudo não permitem tirar conclusões seguras a respeito do comportamento dos testes após 12 meses, devido à grande redução no número de animais observados.

Analisando a proporção de animais que chegaram a ter um resultado negativo durante o período de observação pode-se chegar a uma especificidade global do teste. Verificou-se que essa especificidade variou de 47,89% para o AAT a 82,61% para o TPF com ponto de corte fixo e excluindo da análise os suspeitos (tabela 3). FARIA (2010) constatou que essa especificidade variou de 83,19% para o AAT a 90,73% para a RFC, embora os dados não sejam comparáveis porque no estudo desse autor não houve perda de observações e, portanto, todos os animais foram examinados pelo mesmo período e, com isso, tiveram maior oportunidade de chegar a um resultado negativo.

Neste ponto, é interessante comentar que bezerras vacinadas e que ainda estão longe de atingir a idade prevista para serem submetidas ao diagnóstico sorológico tendem a apresentar resultado negativo. No presente trabalho, embora prejudicado pela redução no número de animais, observou-se que aos 270 dias após a vacinação a especificidade dos testes avaliados foi relativamente alta,

variando de 87,5% para o TPF com ponto de corte móvel e considerando positivos os suspeitos até 100,0% no TPF com ponto de corte fixo. Essa observação é confirmada pelos dados de FARIA (2010), que constataram especificidade variando de 92,47% (AAT e TPF com ponto móvel e sem descartar os suspeitos) a 94,62% (2-ME e RFC). Note-se que esses valores não estão distantes daqueles constatados em estudos realizados com animais adultos. DAJER et al. (1999), em um estudo realizado no México, verificaram especificidade de apenas 68,8% no teste rosa de Bengala (que é similar ao AAT) e de 96,9% no TPF, e MATHIAS et al. (2010) relatam especificidade variando de 82,6% a 98,3% no TPF interpretado com ponto de corte fixo e realizado em quatro diferentes laboratórios no Brasil.

Resultados semelhantes foram encontrados por RIBEIRO et al. (1997), os quais verificaram que bezerras vacinadas de 3 a 8 meses de idade apresentaram resultados negativos após 10 meses de vacinação nas provas do 2-ME, AAT, soroaglutinação em tubos e soroaglutinação rápida, teste este que deixou de ser utilizado no Brasil. Também KOLODA (2005) assinalou que 45 bezerras bovinas (100%) tornaram-se não reagentes no AAT aos 360 dias pós-vacinais.

Comparando os resultados dos testes aos 30 dias após a vacinação, não se observou concordância boa na grande maioria das situações. Somente se constatou kappa acima de 0,61 entre RFC e TPF. Aos 60 dias, a concordância aumentou na maioria das comparações e foi observado kappa 0,86, caracterizando concordância ótima, na comparação entre 2-ME e RFC. Noventa dias após a vacinação observou-se kappa 0,79 entre AAT e 2-ME, 0,62 entre AAT e RFC e 0,79 entre 2-ME e RFC; nessas mesmas comparações e com o mesmo período de observação FARIA (2010) verificou, respectivamente, 0,64, 0,64 e 1,0, ou seja, esse autor verificou concordância perfeita entre 2-ME e AAT aos 90 dias de vacinação, valor acima daquele observado no presente estudo.

A comparação entre o TPF e os outros testes mostrou concordância crescente ao longo do tempo, a não ser nas últimas colheitas, quando o número de animais foi pequeno, prejudicando essa tendência (tabela 4). Os dados obtidos

por FARIA (2010) também mostraram aumento da concordância entre os testes conforme se distanciava a data da vacinação.

Os artigos científicos publicados que abordaram a avaliação do teste de polarização fluorescente utilizaram ponto de corte fixo (NIELSEN et al., 1996; NIELSEN et al., 1998; SAMARTINO et al., 1999; DAJER et al., 1999; MCGIVEN et al., 2003). Entretanto, NIELSEN e GALL (2001) afirmaram que a adoção de um ponto de corte determinado pelo valor obtido no teste de soros negativos adicionado a uma constante, ou seja, ponto de corte variável, talvez seja mais vantajoso do que adotar um ponto de corte fixo, porque leva em consideração as variações do dia a dia, embora esse critério também tenha seus inconvenientes.

Na comparação entre as duas formas de interpretação do TPF, com ponto de corte variável e com ponto de corte fixo, observou-se concordância variando de ótima a perfeita quando as amostras com resultado suspeito foram excluídas da análise. Já em outras interpretações a concordância foi menor, como resultado de um número considerável de amostras com resultado suspeito. Quando as amostras suspeitas não foram excluídas, sendo contadas no total examinado, o valor de kappa resultou em concordância fraca ou regular, enquanto FARIA (2010) observou concordância de boa a ótima nessa mesma comparação.

Quando se compararam os resultados do teste aos 30 dias com os resultados do teste nas colheitas seguintes (tabela 5), verificou-se, para os testes AAT, 2-ME e RFC, uma tendência de aumento da significância dessa diferença ao longo do tempo, o que não se observou para o TPF. Isso talvez esteja relacionado com o fato de o TPF já ter apresentado menor proporção de animais negativos nas primeiras colheitas, o que ocorreu apenas posteriormente nos outros testes.

Os dados obtidos mostram que o problema da resposta induzida pela vacinação é mais acentuado logo após a aplicação da vacina, podendo-se afirmar que após os 24 meses de idade, quando o animal normalmente é submetido ao diagnóstico, uma parcela pouco significativa de animais apresentará reação vacinal, embora não se possa deixar de considerar que isso pode resultar na condenação de animais de alto valor zootécnico, com perdas para o produtor, mas

de baixo impacto populacional. Acrescente-se que os resultados foram observados em bezerras da raça Tabapuã, e AGUIRRE et al. (2002) observaram resultados similares com diversos testes sorológicos, inclusive o TPF, avaliando a resposta sorológica de bezerras Holandesas vacinadas com a dose de 3×10^{10} organismos vivos, o que se faz mister destacar porque FARIA (2010) verificou diferença significativa de resposta vacinal em função da raça ao estudar animais Girolandos e mestiços variando de 3/4 Zebu até Holandês PO.

7. CONCLUSÕES

- O teste de polarização fluorescente apresentou maior capacidade de discriminação dos títulos de anticorpos vacinais logo após a vacinação;
- Com o passar do tempo, a especificidade dos outros testes avaliados aproximou-se daquela do teste de polarização fluorescente;
- Embora a resposta de anticorpos induzida pela amostra vacinal seja causa de reações sorológicas falso-positivas, esse problema é mais acentuado logo após a vacinação;
- O teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo promove uma padronização dos valores finais do teste, permitindo assim maior uniformização dos valores obtidos;
- O teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável pode ser uma ferramenta indicada, por levar em consideração as variações de leitura do aparelho que ocorrem no dia a dia;

8. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, N.P.; VANZINI, V.R.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; VALENTINI, B.S.; DE LUCCA, G.; AUFRANC, C.; CANAL, A.; VIGLIOCCO, A.; NIELSEN, K. Antibody dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 23, n.4, p.471-478, 2002.

ALTON, G. G. The control of bovine brucellosis. Recent Developments. **World Animal Review**, v. 39, p.17-24, 1981.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut Nacional de la Recherche Agronomique, 1988. 190p.

BANAI, M.; CORBEL, M. Taxonomy of *Brucella*. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 85-101, 2010.

BARBONI, A. M.; BARANDIARAN, S.; CAIRÓ, F.; D'ALESSIO, F.; DI GENNARO, E.; GUIDA, N.; IRIBARREN, F.; KOTSIAS, F.; GUILLEMI, E.; MARCHETTI, S.; MARTICORENA, D. H.; MARTINEZ, V. M.; MESPLET, M.; MORAS, E. V.; MUÑOZ, A.; PARODI, L.; PIDRE, G.; ROSSANO, M.; VILAR, G. **Manual de enfermedades infecciosas**. 1 ed. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Veterinarias. 2009, 308 p.

*De acordo com as normas da ABNT-NR 6023

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa SDA nº 6, de 08 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de janeiro de 2004a. Seção 1, p. 6-10.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 11, de 26 de janeiro de 2004. Exclui o Estado de Santa Catarina da obrigatoriedade de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinas contra brucelose. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 29 de janeiro de 2004b. Seção 1, p. 3.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 27, de 20 de outubro de 2010. Aprova o teste de polarização fluorescente para utilização no Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose, no diagnóstico da brucelose bovina e bubalina. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 22 de outubro de 2010, Seção 1.

CAMPAÑA, R. C.; GOTARDO, D. J.; ISHIZUKA, M. M. **Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo, 2003. Disponível em: <http://www.zoonews.com.br/noticias2/noticia.php?id_noticia=33079>. Acesso em: 15 jul 12.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, v.16, n.2, p.3-5, 1989.

DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIERREZ, E.; PENA, G.; GURRIA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 40, p. 67-73, 1999.

FARIA, G. C. **Avaliação do teste de polarização fluorescente para discriminar títulos sorológicos de bezerras vacinadas com amostra B19 de *Brucella abortus***. 2010. 31 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FIGUEIREDO, A. O. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina. 2008. 28p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Brasília, Campo Grande, 2008.

GALL, D.; NIELSEN, K.; FORBES, L.; DAVIS, D.; ELZER, P.; OLSEN, S.; BALSEVICIUS, S.; KELLY, L.; SMITH, P.; TAN, S.; JOLY, D. Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, p.469-476, 2000.

JARDIM, G. C.; PIRES, P. P.; MATHIAS, L. A.; RIBEIRO, O. C.; KUCHEMBUCK, M. R. G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 177-182, 2006.

JEKEL, J. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Artmed, Porto Alegre, 1999. 328 p.

KOLODA, M. **Cinética de produção de anticorpos em bezerras imunizadas com a CEPA B19 de *Brucella abortus***. 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LANDIS, J. R.; KOCK, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v.33, n.1, p. 159-174, 1977.

MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; CHEN, A. A.; GIRIO, R. J. S.; VALÉRIO NETO, W. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado, e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 21, n. 4, p. 139-142, 2001.

MATHIAS, L. A.; CORBELLINI, L. G.; MAIA, L.; NASCIMENTO, K. F.; PAULIN, L. M. S.; SAMARTINO, L. E.; SERQUEIRA, M. A.; SOARES FILHO, P. M.; SOUZA, M. M. A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

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 and comparison to SAT, CFT, and iELISA. **Journal of Immunological Methods**, v.278, p.171 - 178, 2003.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A. J.; Avaliação das provas de soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 5, 2000.

MEIRELLES, R. B. **Avaliação do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina.** 2008. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.11-17, 2010.

NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis.** Boca Raton: CRC Press, p. 283-299, 1990.

NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 195, p. 161-168, 1996.

NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGIL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 66, p. 321-329, 1998.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; VIGLIOCCO, A.; PEREZ, B.; SAMARTINO, L.; NICOLETTI, P.; DAJER, A.; ENRIGHT, F. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v.68, p.245-253, 1999.

NIELSEN, K.; LIN, M.; GALL, D.; JOLLEY, M. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. **Methods**, v.22, p. 71-76, 2000.

NIELSEN, K.; GALL, D. ; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L. E.; DAGER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v.21, n.80, p.163-170, 2001.

NIELSEN, K.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.22, p.183-201, 2001.

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

OIE. Brucellosis, 2000. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>>. Acesso em: 19 mar 12.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate à brucelose bovina**. Situação brasileira, 1 ed. Funep, Jaboticabal, 154p, 2003.

PAHO/WHO – Pan American Health Organization/ World Health Organization. **Brucellosis PAHO/WHO Experts Consultation Meeting on Vaccines and Vaccination Strategies**, 1999.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia. Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 596 p.

PIRES, A. V. **Bovinocultura de corte**, v. 2. 1 ed. FEALQ: Piracicaba, 2010, 1510 p.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 90, pag 55-62, 2002.

POESTER, F. P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L. E.; YU, W. L. Diagnosis of brucellosis. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 46 – 60, 2010.

RIBEIRO, M. G.; SPAGO, N.; RATTI, J. R.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, p. 137-150, 1997.

SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Journal of Immunoassay**, v.20, p.115-126, 1999.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. Oxford: Blackwell Science, 3 ed. 2005. 610 p.

APÊNDICE

Apêndice 1. Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x 2-ME (Inc+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	0	+	67	3	+	56	5	+	44	3
-	0	72	-	0	0	-	0	4	-	0	7
Total		72	Total		70	Total		65	Total		54

120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	35	6	+	19	5	+	10	3	+	4	1
-	2	11	-	0	21	-	1	17	-	0	16
Total		54	Total		45	Total		31	Total		21

240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)			2-ME (Inc+)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	1	4	+	0	2	+	0	0	+	0	0
-	0	12	-	0	14	-	0	4	-	0	5
Total		17	Total		16	Total		4	Total		5

360 dias		
2-ME (Inc+)		
AAT	+	-
+	0	0
-	0	1
Total		1

Apêndice 2. Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x 2-ME (IncEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	0	+	59	3	+	54	5	+	42	3
-	0	72	-	0	0	-	0	4	-	0	7
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	34	6	+	17	5	+	9	3	+	4	1
-	2	11	-	0	21	-	0	17	-	0	16
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)			2-ME (IncEx)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	1	4	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	12	-	1	14	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
2-ME (IncEx)											
AAT	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 3. Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	0	+	64	6	+	57	4	+	41	7
-	0	72	-	0	0	-	0	4	-	0	8
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	29	12	+	20	4	+	11	2	+	4	1
-	0	13	-	0	21	-	0	18	-	0	16
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	1	4	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	12	-	1	14	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
RFC											
AAT	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 4. Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
		TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	0	+	44	6	+	43	18	+	31	16
-	0	72	-	0	0	-	0	4	-	0	7
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
		TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	24	18	+	17	7	+	8	25	+	4	1
-	0	12	-	0	21	-	0	18	-	0	16
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
		TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	1	4	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	12	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
		TPFfixo									
AAT	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 5. Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFvar (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	0	+	39	31	+	34	27	+	30	17
-	0	72	-	0	0	-	0	4	-	0	7
Total		72	Total		70	Total		65	Total		54
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	24	17	+	16	8	+	8	5	+	3	1
-	0	13	-	0	21	-	0	18	-	0	13
Total		54	Total		45	Total		31	Total		21
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)			TPFvar (Susp-)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	5	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	12	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total		17	Total		16	Total		4	Total		5
360 dias											
TPFvar (Susp-)											
AAT	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total		1									

Apêndice 6. Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFvar (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	0	+	59	11	+	56	5	+	45	2
-	0	72	-	0	0	-	0	4	-	4	3
Total		72	Total		70	Total		65	Total		54
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	37	4	+	23	1	+	12	1	+	6	0
-	5	8	-	11	10	-	8	10	-	0	15
Total		54	Total		45	Total		31	Total		21
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)			TPFvar (Susp+)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	2	3	+	1	0	+	0	0	+	0	0
-	0	12	-	14	1	-	0	4	-	0	5
Total		17	Total		16	Total		4	Total		5
360 dias											
TPFvar (Susp+)											
AAT	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total		1									

Apêndice 7. Grupo de tabelas de comparação dos testes de AAT x TPFvar (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	0	+	39	11	+	42	5	+	30	2
-	0	72	-	0	0	-	0	4	-	0	3
Total		72	Total		50	Total		51	Total		35
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	24	4	+	16	1	+	8	1	+	4	0
-	0	8	-	0	10	-	0	10	-	0	16
Total		36	Total		27	Total		19	Total		20
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-	AAT	+	-
+	0	3	+	0	0	+	0	0	+	0	0
-	0	12	-	0	13	-	0	4	-	0	5
Total		15	Total		13	Total		4	Total		5
360 dias											
TPF (SuspEx)											
AAT	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total		1									

Apêndice 8. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	63	4	+	55	1	+	40	4
-	0	72	-	1	2	-	2	12	-	0	10
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	28	9	+	18	1	+	9	2	+	4	0
-	1	16	-	2	24	-	2	18	-	0	17
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	1	0	+	1	0	+	0	0	+	0	0
-	0	16	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
RFC											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 9. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	57	3	+	53	1	+	38	4
-	0	72	-	1	2	-	2	7	-	0	10
Total	72		Total	63		Total	63		Total	52	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	27	9	+	16	1	+	8	1	+	4	0
-	1	16	-	2	24	-	2	18	-	0	17
Total	53		Total	43		Total	29		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
RFC			RFC			RFC			RFC		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	1	0	+	1	0	+	0	0	+	0	0
-	0	16	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
RFC											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 10. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	44	23	+	42	14	+	31	3
-	0	72	-	0	3	-	1	8	-	0	10
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	24	13	+	15	4	+	8	3	+	4	0
-	1	16	-	2	24	-	0	20	-	0	17
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	1	0	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	16	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
TPFfixo											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 11. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
	TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo	
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	39	21	+	42	13	+	31	11
-	0	72	-	0	3	-	1	7	-	0	10
Total	72		Total	63		Total	63		Total	52	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
	TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo	
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	24	12	+	13	4	+	8	1	+	4	0
-	1	16	-	2	24	-	0	20	-	0	17
Total	43		Total	43		Total	29		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
	TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo	
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	1	0	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	16	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
	TPFfixo										
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 12. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPF (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	58	9	+	52	4	+	42	2
-	0	72	-	1	2	-	4	5	-	7	3
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	35	2	+	19	0	+	11	0	+	4	0
-	7	10	-	15	11	-	8	12	-	1	16
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	1	0	+	1	0	+	0	0	+	0	0
-	1	15	-	1	14	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
TPF (Susp+)											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 13. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPF (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	38	29	+	35	21	+	30	14
-	0	72	-	1	2	-	0	9	-	0	10
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	25	12	+	16	3	+	8	3	+	3	0
-	0	17	-	0	26	-	0	20	-	0	18
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	1	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	16	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
TPF (Susp-)											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 14. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (Inc+) x TPF (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	38	9	+	34	4	+	30	3
-	0	72	-	1	2	-	0	5	-	0	2
Total		72	Total		50	Total		43	Total		35

120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	24	2	+	16	0	+	8	0	+	4	0
-	0	10	-	0	11	-	0	11	-	0	16
Total		36	Total		27	Total		19	Total		20

240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0
-	0	15	-	0	14	-	0	4	-	0	5
Total		15	Total		14	Total		4	Total		5

360 dias		
TPF (SuspEx)		
2-ME	+	-
+	0	0
-	0	1
Total		1

Apêndice 15. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPF (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	53	7	+	51	3	+	40	2
-	0	72	-	1	2	-	4	5	-	7	3
Total	72		Total	63		Total	63		Total	52	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	34	2	+	17	0	+	9	0	+	4	0
-	7	10	-	15	11	-	9	11	-	1	16
Total	53		Total	43		Total	29		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)			TPF (Susp+)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	1	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0
-	1	15	-	1	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
TPF (Susp+)											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 16. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPF (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	33	27	+	33	21	+	31	11
-	0	72	-	1	2	-	0	9	-	0	10
Total	72		Total	63		Total	63		Total	52	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	24	12	+	14	4	+	8	1	+	4	0
-	0	17	-	0	25	-	0	20	-	0	17
Total	72		Total	63		Total	63		Total	52	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)			TPF (Susp-)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	1	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	16	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	72		Total	63		Total	63		Total	52	
360 dias											
TPF (Susp-)											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 17. Grupo de tabelas de comparação dos testes de 2-ME (IncEx) x TPF (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	33	7	+	33	3	+	30	3
-	0	72	-	1	2	-	0	5	-	0	3
Total	72		Total	43		Total	41		Total	36	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	24	2	+	14	0	+	8	0	+	4	0
-	0	10	-	0	12	-	0	11	-	0	16
Total	36		Total	26		Total	19		Total	20	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)			TPF (SuspEx)		
2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-	2-ME	+	-
+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0
-	0	15	-	0	14	-	0	4	-	0	5
Total	15		Total	14		Total	4		Total	5	
360 dias											
TPF (SuspEx)											
2-ME	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 18. Grupo de tabelas de comparação dos testes de RFC x TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de kappa e para o cálculo do χ^2 de McNemar.

Dia 0			30 dias			60 dias			90 dias		
TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo		
RFC	+	-	RFC	+	-	RFC	+	-	RFC	+	-
+	0	0	+	44	20	+	42	15	+	23	6
-	0	72	-	0	6	-	1	7	-	2	23
Total	72		Total	70		Total	65		Total	54	
120 dias			150 dias			180 dias			210 dias		
TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo		
RFC	+	-	RFC	+	-	RFC	+	-	RFC	+	-
+	23	6	+	15	5	+	7	4	+	4	0
-	2	23	-	2	23	-	1	19	-	0	17
Total	54		Total	45		Total	31		Total	21	
240 dias			270 dias			300 dias			330 dias		
TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo			TPFfixo		
RFC	+	-	RFC	+	-	RFC	+	-	RFC	+	-
+	1	0	+	0	1	+	0	0	+	0	0
-	0	16	-	0	15	-	0	4	-	0	5
Total	17		Total	16		Total	4		Total	5	
360 dias											
TPFfixo											
RFC	+	-									
+	0	0									
-	0	1									
Total	1										

Apêndice 25. Grupo de tabelas de análise do teste de AAT de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

AAT		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	59	4
-	0	0
Total		63

AAT		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	45	7
-	0	0
Total		52

AAT		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	40	14
-	0	0
Total		54

AAT		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	22	20
-	0	0
Total		42

AAT		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	13	18
-	0	0
Total		31

Apêndice 26. Grupo de tabelas de análise do teste de 2-ME (Inc+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

2-ME (Inc+)		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	60	7
-	0	2
Total	69	

2-ME (Inc+)		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	43	7
-	0	2
Total	52	

2-ME (Inc+)		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	37	18
-	0	1
Total	56	

2-ME (Inc+)		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	19	24
-	0	1
Total	44	

2-ME (Inc+)		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	11	18
-	0	1
Total	30	

Apêndice 27. Grupo de tabelas de análise do teste de 2-ME (IncEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

2-ME (IncEx)		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	49	16
-	0	2
Total	67	

2-ME (IncEx)		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	37	7
-	0	2
Total	46	

2-ME (IncEx)		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	33	16
-	0	1
Total	50	

2-ME (IncEx)		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	15	20
-	0	1
Total	36	

2-ME (IncEx)		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	8	17
-	0	1
Total	26	

Apêndice 28. Grupo de tabelas de análise do teste de RFC de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

RFC		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	53	3
-	1	7
Total	64	

RFC		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	38	7
-	1	7
Total	53	

RFC		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	28	18
-	1	7
Total	54	

RFC		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	19	19
-	0	6
Total	44	

RFC		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	11	14
-	0	6
Total	31	

Apêndice 29. Grupo de tabelas de análise do teste de TPFfixo de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

TPFfixo		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	34	6
-	7	17
Total	64	

TPFfixo		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	26	5
-	4	18
Total	53	

TPFfixo		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	27	12
-	2	19
Total	60	

TPFfixo		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	15	10
-	2	16
Total	43	

TPFfixo		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	6	11
-	2	11
Total	30	

Apêndice 30. Grupo de tabelas de análise do teste de TPFvar (Susp+) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

TPFvar (Susp+)		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	48	4
-	6	5
Total	63	

TPFvar (Susp+)		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	40	3
-	8	2
Total	53	

TPFvar (Susp+)		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	37	7
-	5	5
Total	54	

TPFvar (Susp+)		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	30	5
-	3	6
Total	44	

TPFvar (Susp+)		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	18	4
-	1	7
Total	30	

Apêndice 31. Grupo de tabelas de análise do teste de TPFvar (Susp-) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

TPFvar (Susp-)		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	24	10
-	9	21
Total	64	

TPFvar (Susp-)		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	22	4
-	7	20
Total	53	

TPFvar (Susp-)		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	18	9
-	6	21
Total	54	

TPFvar (Susp-)		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	13	7
-	3	20
Total	43	

TPFvar (Susp-)		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	6	9
-	3	14
Total	32	

Apêndice 32. Grupo de tabelas de análise do teste de TPFvar (SuspEx) de bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* para obtenção dos valores utilizados para o cálculo de McNemar.

TPFvar (SuspEx)		
	60 dias	
30 dias	+	-
+	24	2
-	1	5
Total	32	

TPFvar (SuspEx)		
	90 dias	
30 dias	+	-
+	22	1
-	1	2
Total	26	

TPFvar (SuspEx)		
	120 dias	
30 dias	+	-
+	18	3
-	0	5
Total	26	

TPFvar (SuspEx)		
	150 dias	
30 dias	+	-
+	13	2
-	1	6
Total	22	

TPFvar (SuspEx)		
	180 dias	
30 dias	+	-
+	5	1
-	1	7
Total	14	