

GUSTAVO COELHO JARDIM

Avaliação comparativa das técnicas de ELISA indireto, antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta e fixação de complemento para o diagnóstico da brucelose em rebanho bovino não vacinado, rebanho vacinado com dose padrão e rebanho vacinado com dose reduzida da amostra 19 de *Brucella abortus*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração de Clínica Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista-UNESP, para a obtenção do Título de Mestre.

**BOTUCATU
2003**

GUSTAVO COELHO JARDIM

Avaliação comparativa das técnicas de ELISA indireto, antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta e fixação de complemento para o diagnóstico da brucelose em rebanho bovino não vacinado, rebanho vacinado com dose padrão e rebanho vacinado com dose reduzida da amostra 19 de *Brucella abortus*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração de Clínica Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista-UNESP para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Rubens Graf Kuchembuck

**BOTUCATU
2003**

*Dedico este trabalho aos meus familiares:
esposa Veridiana; pais Newton e Martha; irmãos
Paulo, João e, por consideração, Juju; avós
Martinha e Wanda; cunhadas, cunhados e
sogros Luiz e Clô, que sempre me proporcionam
amor, fé, dedicação, ensinamentos, bons
exemplos e muitas bênçãos.*

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Márcio Rubens Graf Kuchembuck por proporcionar a realização do mestrado, pela orientação e ensinamentos de vida.

Ao Dr. Pedro Paulo Pires pelo incentivo, amizade, apoio e co-orientação no decorrer de todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Antonio Mathias pela colaboração na realização de testes laboratoriais e sugestões pertinentes.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Corte Dr. Cláudio Roberto Madruga, Dr. Cleber Oliveira Soares e Dra. Sheila da Silva Moraes por oportunidades oferecidas que contribuíram para um amadurecimento profissional, por materiais cedidos e dúvidas esclarecidas.

Ao pesquisador da Embrapa Gado de Corte Dr. Roberto Augusto de Almeida Torres Júnior pelo tratamento estatístico dos resultados obtidos e pela valiosa ajuda.

Aos colegas Leticia Monteiro, Rita Paes, aos estagiários Alexandra, André, Andrey, Augusto, Júnior, Lenara, Simone e Tarcis, ao laboratorista José Gomes, à colega de sala Yvelise Possiede, aos funcionários da Embrapa Gado de Corte Carlos, Diná, Gisele, Quintino, Marcela e muitos outros, pelo acompanhamento, torcida e auxílios durante minha permanência nesta empresa.

Aos serviços técnicos da Biblioteca e Documentação da Unesp de Botucatu pelo auxílio na normalização das referências bibliográficas.

JARDIM, G. J. Avaliação comparativa das técnicas de ELISA indireto, antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta e fixação de complemento para o diagnóstico da brucelose em rebanho bovino não vacinado, rebanho vacinado com dose padrão e rebanho vacinado com dose reduzida da amostra 19 de *Brucella abortus*. Botucatu, 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Palavras-chave: brucelose bovina; diagnóstico sorológico; vacinação; amostra B19; ELISA indireto.

RESUMO

O presente trabalho avaliou o desempenho das técnicas de ELISA indireto, de antígeno acidificado tamponado (AAT) e de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), comparando-as com a de fixação de complemento (FC), para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos adultos de diferentes condições sanitárias: r1- rebanho não vacinado; r2- rebanho vacinado com dose padrão da vacina produzida com a amostra 19 de *Brucella abortus*; r3- rebanho vacinado com dose reduzida da mesma vacina. A prova que apresentou sensibilidade e especificidade mais próximas às da FC, considerada como padrão nesse estudo, foi a de AAT com especificidade relativa (ER) = 95,5% em r1 e ER = 98,9% em r2, seguida da 2-ME com SAL com ER = 94% em r1 e ER = 94,7% em r2, seguida do ELISA com ER = 81% em r1 e ER = 16,8% em r2. Todas as técnicas alcançaram sensibilidade relativa igual a 100% em r1 e r2; nenhuma, incluindo a FC, apresentou especificidade adequada para o diagnóstico em r3. A vacinação de bovinos adultos influenciou no diagnóstico sorológico. O ELISA indireto não apresentou nenhuma vantagens sobre o AAT para uso como teste de triagem. Seu uso como técnica de diagnóstico confirmatório requer mais estudos.

JARDIM, G. J. Comparative evaluation of indirect ELISA, rose bengal, mercaptoethanol with standard agglutination test and complement fixation techniques for the brucellosis diagnosis in bovine herd not vaccinated, herd vaccinated with standard dose and herd vaccinated with reduced dose of *Brucella abortus* strain 19. Botucatu, 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Keywords: bovine brucellosis; serological diagnosis; vaccination; strain 19; indirect ELISA.

ABSTRACT

This study evaluated the performance of the indirect ELISA, the rose bengal (RB) and the mercaptoethanol (ME) with standard agglutination test (SAT) techniques, comparing them to the complement fixation (CF), for the brucellosis serological diagnosis in adult bovines with different sanitary terms: h1- not vaccinated herd; h2- herd vaccinated with standard dose of the vaccine produced with the strain 19 of *Brucella abortus*; h3- herd vaccinated with reduced dose of the same vaccine. The test which presented closer sensitivity and specificity to the ones of the CF, considered as standard in this research, was the RB with relative specificity (SR) = 95,5% in h1 and SR = 98,9% in h2, followed by ME with SAT with SR = 94% in h1 and SR = 94,7% in h2, followed by ELISA with SR = 81% in h1 and SR = 16,8% in h2. All techniques reached relative sensitivity equal to 100% in h1 and h2; none, including the CF, presented suitable specificity for diagnosis in h3. Adult animals vaccination influenced the serological diagnosis. The indirect ELISA didn't show any advantage on RB for use as screening test. Its use as a final diagnosis technique requires more study.

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo.....	4
Abstract.....	5
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Avaliação de diferentes técnicas sorológicas para o diagnóstico da brucelose.....	15
2.2. Avaliação do uso de uma dose reduzida da vacina produzida com a amostra 19 de <i>Brucella abortus</i> em bovinos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODO.....	39
3.1. Rebanho.....	39
3.1.1. Grupo de animais não vacinados.....	39
3.1.2. Grupo de animais vacinados com dose padrão da vacina B19.....	39
3.1.3. Grupo de animais vacinados com dose reduzida da vacina B19.....	39

3.2. Colheita de soros sanguíneos.....	40
3.3. Vacinação.....	40
3.4. Contagem de bactérias viáveis em suspensão da vacina.....	40
3.5. Acompanhamento clínico.....	40
3.6. Provas imunológicas.....	41
3.6.1. Provas de soroaglutinação.....	41
3.6.2. Fixação de complemento.....	41
3.6.3. Ensaio indireto de imunoadsorção enzimática.....	41
3.7 Antígenos.....	42
3.8. Etapas de avaliação de técnicas sorológicas.....	42
3.8.1. Avaliação comparativa dos testes de AAT, 2-ME com SAL, FC e ELISA ID em rebanho adulto não vacinado e em rebanho adulto vacinado com dose padrão.....	42
3.8.2. Avaliação comparativa dos testes de AAT, 2-ME com SAL, FC e ELISA ID em rebanho adulto vacinado com dose reduzida.....	43
3.9. Determinação da sensibilidade e especificidade relativas.....	43
3.10. Análise estatística.....	44
4. RESULTADO.....	45

5. DISCUSSÃO.....	53
5.1. Avaliação do desempenho das provas de antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta, fixação de complemento e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática.....	53
5.2. Avaliação do uso de uma dose reduzida da vacina produzida com a amostra 19 de <i>Brucella abortus</i> , em rebanho bovino negativo para a brucelose.....	60
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado.....pág.45

Tabela 2. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado.....pág.46

Tabela 3. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado.....pág.46

Tabela 4. Análise estatística dos resultados das especificidades relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado.....pág.47

Tabela 5. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão.....pág.47

Tabela 6. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão.....pág.48

Tabela 7. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão..... pág.48

Tabela 8. Análise estatística dos resultados das especificidades relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão..... pág.49

Tabela 9. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose reduzida..... pág.49

Tabela 10. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose reduzida..... pág.50

Tabela 11. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose reduzida..... pág.50

Tabela 12. Números de reagentes positivos e negativos obtidos pelos métodos de fixação de complemento (FC), antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), em rebanho vacinado com dose reduzida..... pág.51

Tabela 13. Análise estatística das frequências de resultados positivos dos métodos de diagnóstico de fixação de complemento (FC), antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), em rebanho vacinado com dose reduzida..... pág.51

Tabela 14. Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL) e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho: não vacinado (NV), vacinado com dose padrão (DP) e vacinado com dose reduzida (DR).....pág.52

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma zoonose, cujo agente etiológico, bactéria do gênero *Brucella*, é responsável por problemas sanitário e econômico, particularmente nos trópicos e em países com pouco investimento nas áreas de produção de leite e carne, onde sua incidência é alta (MEGID et al., 2000).

A brucelose dos bovinos tem distribuição mundial, exceto nos países que a erradicaram por meio de trabalho sistemático (MOLNÁR et al., 1997). Sua importância é devida à diminuição na produção animal e à repercussão da infecção sobre a saúde humana.

Enfermidade também conhecida por febre ondulante, febre de Malta, febre Mediterrânea, febre de Gibraltar, aborto contagioso, como é mais conhecida por criadores e doença de Bang, tem como principal agente nos bovinos *Brucella abortus*, responsável principalmente por aborto em vacas (TEIXEIRA et al., 1998).

Agente conhecido desde 1896, *B. abortus* teve sua primeira referência e constatação clínica em bovinos, no Brasil, em 1922, por Icibaci. A demonstração definitiva da existência da doença no País foi efetuada por Mello e Neiva em 1930, que encontraram o índice de 38,27% de reações positivas em 81 soros bovinos no Estado de São Paulo, com resultados comprovados pelo isolamento do agente (PALMQUIST, 1952).

Atualmente, não há dados confiáveis sobre os prejuízos econômicos determinados pela brucelose bovina no Brasil. Nos Estados Unidos da América (EUA), estimou-se, em 1983, perdas da ordem de 32 milhões de dólares, apesar do programa americano ter-se iniciado há mais de 40 anos (BRASIL, 2003).

No Brasil, estudos mostram que a brucelose bovina parece estar disseminada por todo o território nacional, com menor ou maior prevalência dependendo da região estudada. Em 1975 foram verificadas as seguintes prevalências em animais por região: Sul, 4%; Sudeste, 4,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Nordeste, 2,5%; e Norte, 4,1% (BRASIL, 2003). O aborto é prejuízo total em rebanhos de corte com média de prevalência da doença entre 5% a 10% de animais infectados, porque o bezerro é a única renda (KUCHEMUCK, 1997).

Esta enfermidade se constitui ainda em barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal; seus prejuízos resultam em custos diretos ou indiretos, como honorários médicos, e impossibilidade total ou parcial para o trabalho, para os indivíduos que se infectam pela ingestão de produtos contaminados, e da manipulação de vacinas, de animais enfermos e de amostras utilizadas para o exame diagnóstico, especialmente o bacteriológico. Também geram perdas na indústria animal, tais como: condenação do leite e da carne; queda de preços da carne, leite e derivados; desvalorização para o mercado externo; e altos custos com programas de controle, erradicação e pesquisas.

Samara et al. (1996) e Lopes et al. (1999) citam que, de acordo com alguns autores, estima-se que a brucelose, na espécie bovina, determina, entre outros, a redução láctea de 20% a 25%, perda da produção cárnea de 10% a 15%, perda de bezerros ocasionada por aborto de 15%, rompimento ou perda nas linhas genéticas nos rebanhos infectados e conseqüente redução de seu valor comercial. Uma em cada cinco vacas que abortam torna-se estéril, e a necessidade de repor animais em um rebanho infectado aumenta em aproximadamente 30%. Vacas livres de brucelose dão em média um bezerro a cada 11,5 meses, enquanto vacas infectadas dão em média um bezerro a cada 20 meses.

Reconhecendo os problemas ligados a esta doença, a maioria dos países desenvolvidos adotaram, há mais de vinte anos, medidas sanitárias destinadas à sua erradicação, obtendo êxito, como o Canadá, Dinamarca, Austrália, Inglaterra, Holanda, Suécia e Japão, enquanto outros países, como a França e os EUA mantêm a mesma controlada, com diminuição de sua ocorrência (MOLNÁR et al., 2000). Até 1997, os EUA já haviam gasto mais de 3 bilhões de dólares com o programa de erradicação que iniciou em 1954 (FERRAZ, 1999). O custo benefício de um programa de erradicação é válido, demonstrando que erradicar é um dos investimentos mais rentáveis (LOPES et al., 1999).

As medidas sanitárias são fundamentadas em dois focos principais: o diagnóstico e a vacinação, pelos quais é possível reduzir ou prevenir a exposição dos animais ao agente infeccioso, e aumentar a resistência dos rebanhos.

No diagnóstico da maioria das doenças infecciosas o fator mais importante é o isolamento por meio de cultivo, com posterior identificação do patógeno. Assim, na atualidade, somente é possível dizer que uma enfermidade infecciosa é diagnosticada com segurança depois do isolamento e identificação do agente. Porém, no caso da brucelose, isso é um processo lento e

muito oneroso, principalmente pela necessidade de investigar muitos animais nos programas de vigilância. É uma doença tipicamente complexa, exigindo tempo para o isolamento e identificação (7 a 14 dias), além de ser trabalho perigoso, por se tratar de zoonose com alto risco de contaminação humana (MOLNÁR et al., 1997). Desta forma, as provas sorológicas ocuparam lugar de destaque no diagnóstico da enfermidade.

Quanto à vacinação, até o momento, apenas amostras vivas atenuadas da bactéria desencadearam proteção. A vacina mais utilizada, responsável pela erradicação da enfermidade em alguns países, é a da cepa 19 de *B. abortus* (vacina B19), que apresenta como inconveniente, a possibilidade de interferir no diagnóstico sorológico, além de poder infectar o homem, ocasionar orquite e epididimite nos machos e aborto em fêmeas vacinadas em final de gestação, como o fazem cepas de campo da bactéria (BRASIL, 2003).

Depois de um programa de erradicação em 1976, que não obteve os resultados esperados, o Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura do Brasil aprovou o ‘Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT’, publicado na Instrução Normativa nº2 de 10 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Apesar de a vacinação de vacas adultas ter sido utilizada em alguns programas internacionais de erradicação, o programa nacional vigente preconiza apenas, a vacinação de bezerras entre três e oito meses de vida (BRASIL, 2001).

A possibilidade de outros testes sorológicos de diagnóstico da brucelose serem utilizados pelo PNCEBT, em rebanhos com diferentes condições imunológicas, motivou a elaboração deste trabalho, que teve como objetivo “avaliar comparativamente, usando como referência a prova de fixação de complemento, a eficiência dos testes imunológicos: 1) ensaio indireto de imunoabsorção enzimática; 2) antígeno acidificado tamponado; e 3) 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta em tubos; em rebanhos adultos com diferentes condições vacinais: a) não vacinados; b) vacinados com dose padrão da vacina B19 ; e c) vacinados com dose reduzida da vacina B19”.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Avaliação de diferentes técnicas sorológicas para o diagnóstico da brucelose

O controle da brucelose depende, fundamentalmente, da identificação e separação dos animais positivos e suspeitos, daqueles não infectados, baseando-se na disponibilidade dos métodos de diagnóstico (MOLNÁR et al., 2000). O diagnóstico, para detecção da doença, é clínico e laboratorial no homem e nos animais (TEIXEIRA et al., 1998).

Nos bovinos, a sintomatologia clínica é restrita ao aborto. Em áreas endêmicas deve-se suspeitar da brucelose sempre que este fenômeno ocorrer após o sexto mês de gestação, bem como nos casos de neonatos enfermos, retenção de placenta, e nos machos, orquite e/ou epididimite. Em caso de aborto, a suspeita poderá ser confirmada pelas lesões do feto, entretanto, o diagnóstico positivo sempre será confirmado em laboratório pela demonstração direta ou indireta de *B. abortus* (MOLNÁR et al., 1997).

Nos casos individuais é importante a identificação direta de *B. abortus* com o isolamento, a comprovação do agente e a patologia, porém, a base para o diagnóstico são os testes sorológicos. Atualmente, são utilizadas diversas provas sorológicas e todas tentam identificar animais infectados. O sucesso das referidas técnicas depende, basicamente, de não se obter reações cruzadas que dão resultados falso-positivos e reações negativas a um título baixo de anticorpos, além da falta de qualidade e consistência na produção dos reagentes e das diferenças das provas entre os técnicos (MOLNÁR et al., 2000).

Na brucelose animal, assim como em outras infecções, o isolamento do microorganismo é o método diagnóstico mais seguro, mas, em virtude das dificuldades deste procedimento e da sua limitação para uso em grandes rebanhos, os métodos sorológicos são os mais utilizados (MEGID et al., 2000).

A infecção com *Brucella* nos animais, assim como imunizações ativas e passivas, induzem no hospedeiro uma resposta imune, tanto humoral quanto celular, sendo que a magnitude e a duração desta resposta pode ser afetada por fatores como: virulência da amostra, inóculo, idade, sexo, gestação, estado imune e espécie animal (FERRAZ, 1999; MEGID et al., 2000). Há alguns tipos de imunoglobulinas (Ig) dentre as quais podem ocorrer

isótipos. No caso da infecção por *B. abortus* formam-se as imunoglobulinas IgG1, IgG2, IgM e IgA em quantidades e tempos diferentes, prolongando-se durante tempo variado (MOLNÁR et al., 1997).

Segundo o *Center of Diseases Control*, vários componentes antigênicos da brucela foram caracterizados, contudo, considera-se que sejam constituídos, basicamente, por antígenos polissacarídicos, principalmente de natureza lipopolissacarídica (LPS). Estes LPS estão presentes nas cepas lisas por diferentes proporções de antígenos denominados A e M, responsáveis pela síntese de diferentes classes de imunoglobulinas anti-brucela, que são detectáveis em testes sorológicos convencionais (MEGID et al., 1999).

A atividade protetora dos anticorpos foi, primeiramente, demonstrada pela imunização passiva com soro hiperimune. A utilização de anticorpos monoclonais e de proteínas recombinantes permite caracterizar as frações responsáveis pelo estímulo da imunidade. O primeiro antígeno a ser claramente identificado, e que realmente desempenha o principal papel frente a amostras lisas da brucela foi a cadeia O. A especificidade desta cadeia, determinada pela predominância de epítomos A (predominam em *B. abortus*) ou M (predominam em *Brucella melitensis*), parece ter um pequeno papel na determinação da proteção frente a sorotipos homólogos, uma vez que todos reconhecem biotipos A ou M dominantes por meio de epítomos comuns (FERRAZ, 1999).

A composição antigênica das brucelas tem importância sorológica. As brucelas de colônias lisas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*) dão entre si reações antigênicas cruzadas completas no teste de aglutinação. Os principais antígenos das brucelas lisas, A e M, estão presentes nestas espécies em quantidades diferentes. Podem ocorrer também reações antigênicas cruzadas entre as cepas lisas de brucelas com outros microorganismos, tais como *Pasteurella*, *Francisella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Leptospira*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Yersinia* (MOLNÁR et al., 1997).

Tanto no homem como nos animais, a infecção natural estimula o aparecimento simultâneo ou ligeiramente diferenciado de imunoglobulinas das classes IgM e IgG. Durante a evolução da doença ocorre o declínio e tendência de desaparecimento da IgM, enquanto a IgG se estabelece e persiste. O desaparecimento da IgG significa, geralmente, a eliminação da infecção. Em bovinos classificados como positivos para brucelose foi observado que a maioria das imunoglobulinas séricas pertencem à subclasse IgG1, com pequenas quantidades da classe IgM (MEGID et al., 2000).

Após a vacinação com cepa 19 de *B. abortus* (B19), IgM e IgG1 são identificadas em uma semana, suas quantidades alcançam o máximo entre 2 a 3 semanas, depois diminuem e desaparecem em um ano. Quando *B. abortus* cepa 19 fixa-se na mama, podendo ser isolada no leite, a quantidade de IgG1 prolonga-se muito. Após infecção com a cepa virulenta, as IgM e IgG permanecem durante longo período em níveis elevados. Observa-se, no entanto, que a quantidade de IgG2 e IgA é maior depois da vacinação quando a cepa B19 não se fixou no organismo. Por outro lado, as IgG2 e IgA aparecem mais tarde que a IgG1 e IgM, e alcançam níveis menores que IgG1 e IgM; suas quantidades são muito diferentes de um animal para outro. Entre outros, este é o motivo pelo qual se utiliza com predileção o isótipo IgG1 em provas sorológicas, em especial nos ensaios do tipo ELISA (MOLNÁR et al., 1997).

O conhecimento do mecanismo da formação dos anticorpos é importante porque as provas diferentes podem demonstrar tipos ou isótipos diversos de Ig. Em geral, os testes sorológicos podem demonstrar classes de Ig, conforme especificado no Quadro 1 (MOLNÁR et al., 1997).

Quadro 1 – Provas sorológicas associadas às classes de imunoglobulinas que detectam

Provas sorológicas	Classes de Ig identificadas
Fixação de complemento	IgG1, IgM
Antígeno acidificado tamponado	IgG1, IgM
Soroaglutinação Lenta	IgM, IgG2, IgG1
Inativação com 2-ME	IgG1, IgG2
ELISA	IgM, IgG1, IgG2
Prova do anel no leite	IgM, IgG1, IgA

O diagnóstico da brucelose bovina se realiza por provas convencionais de aglutinação e fixação de complemento, as quais têm contribuído amplamente, em todo o mundo, para o controle e erradicação da enfermidade. Contudo, estas técnicas têm o inconveniente de serem subjetivas, de baixa especificidade e, sobretudo, de não diferenciarem animais vacinados com cepa B19 daqueles infectados com cepa de campo. Nos últimos anos, novas técnicas sorológicas têm sido desenvolvidas buscando superar os inconvenientes das provas convencionais (SAMARTINO et al., 2000). Outro problema apresentado pelos testes

de aglutinação é a reação cruzada com outras bactérias gram-negativas. A infecção por *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:9 representa a mais importante fonte de reações falso-positivas no diagnóstico sorológico da brucelose animal e humana. Testes baseados na imunidade celular têm sido desenvolvidos com o objetivo de diferenciá-las (FERRAZ, 1999).

O desenvolvimento das técnicas de ELISA e da fluorescência polarizada (FPA) demonstra a preocupação com os inconvenientes apresentados pelas provas convencionais, pois estas técnicas não só se apresentam mais sensíveis e específicas que as técnicas convencionais como também apresentam a capacidade de diferenciar animais vacinados dos infectados (SAMARTINO et al., 2000).

Dentre os testes sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose, destacam-se como os mais amplamente utilizados: soroaglutinação lenta em tubos (SAL), soroaglutinação rápida em placa (SAR), antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptopetanol (2-ME), fixação de complemento (FC) e ELISA (MEGID et al., 2000).

A SAL foi o teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico da brucelose bovina até o ano de 1967. Em anos recentes, com o melhor conhecimento das diferentes classes de imunoglobulinas, surgiram dúvidas com relação à sua eficácia. Esta prova possui como desvantagem a ocorrência de reações cruzadas com antígenos hetero-específicos e com aglutininas pós-vacinais, que podem decorrer da sua maior eficiência em detectar imunoglobulinas da classe IgM do que da subclasse IgG1. O teste da SAR é uma adaptação da SAL, e se baseia na visualização da aglutinação em placa. Alguns autores consideram que a SAR possui como vantagem a simplicidade de execução e precocidade de resultados em relação à SAL, porém com menor sensibilidade, detectando as mesmas classes de Ig, enquanto outros autores consideram-nas idênticas (MEGID et al., 2000).

A prova do AAT, também conhecida como teste do rosa bengala, consiste em uma soroaglutinação em placa, onde o antígeno é tamponado em pH baixo (3,65). Esta acidificação do antígeno reduz a atividade da IgM, tornando a prova seletiva para identificação da subclasse IgG1. O teste é utilizado como prova de triagem em rebanhos, e possui uma grande sensibilidade em animais vacinados com a B19. Recomenda-se, porém, que os positivos nesta prova sejam posteriormente testados por provas complementares (MEGID et al., 2000).

O 2-ME fundamenta-se na ação de certos compostos que contêm o radical tiol (2-ME), que degradam a conformação pentâmera da IgM, determinando assim a perda da sua atividade aglutinante. Este processo torna a prova sensível às aglutinações estabelecidas pela classe IgG, que não sofre alteração de conformação na sua atividade na presença deste

reagente. Alguns autores, citados pelo presente, sugerem que a prova do 2-ME gera reações falso-positivas em menor quantidade que as provas de SAL, SAR e AAT (MEGID et al., 2000).

O teste de fixação de complemento é vastamente utilizado para o diagnóstico da brucelose em bovinos, e também se mostra eficiente no diagnóstico da brucelose humana. Em ruminantes tem a vantagem de ser, relativamente, insensível aos anticorpos produzidos em resposta à vacinação com amostra 19 de *B. abortus*, sendo altamente sensível e específico em animais naturalmente infectados pela brucelose. O teste é um pouco complexo, sendo importante o uso prévio de um teste de estudo em massa, assim como é o AAT, que também é utilizado para reduzir o número de amostras a serem testadas pelo fixação de complemento (ALTON et al., 1988).

A prova de fixação de complemento é padronizada em titulações, seu título cai abaixo de um nível de diagnóstico de 1:40 ou 1:20 rapidamente após a vacinação. A técnica oferece uma vantagem para rebanhos adultos vacinados, já que possibilita a detecção de infectados, logo após a vacinação. A FC é tecnicamente mais difícil de executar e de ser padronizada entre diferentes laboratórios (NICOLETTI et al., 1978a). De particular importância para laboratórios de países em desenvolvimento, é um teste laborioso, de custo operacional alto, e requer padronizações cuidadosas dos reagentes (KERBY et al., 1997).

O teste ELISA é uma reação sorológica baseada no uso de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas, na qual o complexo resultante possui atividade imunológica e enzimática. Por estar um de seus componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e ligado a um suporte imunoabsorvente, o complexo formado torna-se imobilizado. Desta forma, com a adição de um substrato cromogênico específico para a enzima, ocorrerá o desenvolvimento de coloração. O produto colorimétrico formado pode ser mensurado com o auxílio de um fotolorímetro ou de um espectrofotômetro. Dentre os diversos ELISAs, o indireto (ID) é um ensaio amplamente utilizado para a detecção ou quantificação (titulação) de anticorpos em amostras de soro, especialmente em estudos soroepidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida, principalmente, pela qualidade do antígeno adsorvido em placa (MADRUGA et al., 2001).

Os ELISAs são os mais multifacetados entre os métodos diagnósticos, e detectam quase qualquer molécula imunoreativa. Diferentes formas de ELISA são utilizadas para diversos fins, e nos últimos vinte anos, têm sido empregadas para o diagnóstico de muitas enfermidades infecciosas, entre elas as bruceloses de diversas espécies animais e a do homem (MOLNÁR et al., 2002).

Desde 1934 quando começou o Programa de Erradicação da Brucelose nos EUA, a base dos programas tem sido a detecção e a eliminação dos animais infectados, pelo emprego dos testes de SAL e SAR. Com a diferenciação da imunoglobulina predominante houve interesse de se distinguir animais infectados de animais vacinados, e desde 1962 utilizam-se os chamados testes suplementares como o do rivanol e desde 1964 o do cartão (MCT) e o 2-ME. Em 1968 o FC provou ser o mais eficiente teste de diagnóstico (KUCHEMUCK, 1997).

A erradicação da brucelose na Hungria, entre 1970 e 1985, foi baseada na aglutinação lenta e FC, praticamente, todos os países utilizavam estas provas naquele tempo. Hoje, sabe-se que foram eliminados muitos animais falso-positivos; por outro lado, nem todos os infectados foram eliminados a tempo. Foi observado, freqüentemente, que as vacas velhas soronegativas (em primeiro lugar, negativas em aglutinação) eliminavam brucelas com o leite ou estas eram isoladas de linfonodos após o abate. Algumas vezes também, ocorreu que as bezerras infectaram-se de suas mães e permaneceram soronegativas até o primeiro parto (MOLNÁR et al., 1997).

Casas Olascoaga apud Megid et al. (2000), em 1976, relatou que o emprego do AAT como teste de triagem em campanhas de controle e erradicação da brucelose permitia reduzir o número de provas de diagnóstico, possibilitando a detecção de casos crônicos, a eliminação de suspeitos, além de ter apresentado boa correlação com a FC.

A capacidade de diversas provas sorológicas em detectar anticorpos varia muito segundo a sensibilidade e especificidade de cada uma. Embora a FC supere alguns problemas de falhas de identificação de animais em fases crônicas e agudas, e, na dificuldade de distinguir anticorpos vacinais de infecciosos, há o inconveniente de ser restrita a laboratórios especializados. Há uma boa correlação no aparecimento, desenvolvimento e persistência entre anticorpos fixadores do complemento e resistentes ao mercaptoetanol, sugerindo a possibilidade de substituir a FC pela prova de 2-ME. Contudo, nem sempre a associação de provas sorológicas é suficiente para elucidar todas as situações encontradas (POESTER et al., 1978).

Nicoletti et al. (1978b) observaram que o SAL e 2-ME provaram não apresentar vantagem no diagnóstico sobre outros testes sorológicos; que o MCT não tem valor diagnóstico em animais vacinados; que o rivanol é confiável em bovinos seis meses após a vacinação, mas que o FC é um teste mais útil, que corretamente permite identificar animais em qualquer tempo e em diferentes esquemas de vacinação.

Em outro estudo realizado por Nicoletti (1984) foi observado que o uso do teste FC é superior à aglutinação em tubo, ao teste do cartão e do rivanol, sendo necessário o uso daquele em bovinos adultos vacinados para prevenir a condenação causada por títulos vacinais.

O teste ELISA tem provado ser uma técnica válida que promove alta sensibilidade. Embora tenha uma boa correlação de resultados com o FC, seus resultados positivos aparecem antes e permanecem por um período significativamente maior, após a vacinação, comparado ao FC. Também ocorre maior número de reações positivas no ELISA, em rebanho não infectado, do que ocorre no FC. Se o ELISA fosse usado para detecção de animais infectados em condições a campo, muitas reações falso-positivas seriam esperadas, o que diminuiria a especificidade do teste (SUTHERLAND, 1985).

Embora o FC seja muitas vezes considerado superior aos outros testes, ele também, apresenta limitações. Primeiro, o FC demonstra com frequência reações de anticomplementariedade, assim como prozonas, onde as imunoglobulinas IgG2 bloqueiam IgG1 e IgM. Segundo, alguns bovinos infectados podem mostrar reações sorológicas aberrantes que não são detectadas. Terceiro, bovinos matematicamente infectados são difíceis de serem diferenciados daqueles recentemente vacinados. Finalmente, há variações no teste devido às diferenças de técnicas utilizadas (SUTHERLAND, 1985).

Alton et al. (1988) comentam que, em ruminantes, o principal anticorpo fixador de complemento é o IgG1; IgG2 não fixa o complemento de coaias e é capaz de impedir a fixação de complemento por outras imunoglobulinas, desta forma produzindo o efeito prozona. A IgM fixa o complemento, porém sua habilidade em fazê-lo é afetada pelo calor utilizado para inativar o soro. Neste caso, o soro bovino é inativado a 58 °C, já que temperatura de 62 °C causa inativação de IgM. Casos em que a amostra de soro der, por exemplo, positivo no AAT e negativo no FC pode estar indicando um efeito prozona no FC, neste caso novo FC deveria ser feito a frio ou então utilizar o resultado do AAT como indicativo de animal afetado pela brucelose.

Em 1992, Dajer et al. apud Molnár et al. (1997) sugeriram que o AAT deveria ser utilizado como teste de triagem, para a identificação inicial dos animais reagentes antes da utilização do FC, e que o método ELISA pudesse ser utilizado como alternativa à FC, e observaram que o rivanol e o 2-ME são pouco sensíveis, permitindo a não identificação de animais infectados. No mesmo ano, Mariño et al. apud Molnár et al. (1997), sugeriram que o método ELISA ID poderia ser utilizado em programas epidemiológicos da brucelose, em

regiões onde a prevalência fosse baixa, visto que o método de ELISA é mais sensível que o de FC.

O programa de erradicação da brucelose desenvolvido em 1992, na Argentina, é um exemplo clássico: inicialmente foi feita uma triagem no rebanho, utilizando-se o AAT ou BPA (*buffered plate antigen*), e todos os reagentes positivos foram testados novamente com 2-ME. Os negativos nestas provas foram considerados como não infectados e permaneceram no rebanho. Os positivos com 2-ME foram isolados do rebanho, e se eles ainda reagissem positivamente, na prova de FC eram descartados e encaminhados ao matadouro. Os animais positivos com 2-ME, porém negativos em FC, permaneciam em isolamento até se tornarem soronegativos com 2-ME e, depois disso, serem reintroduzidos no rebanho. Se eles se convertessem em soropositivos com FC, eram enviados ao matadouro. Para avaliar este programa, realizaram-se exames sobre os valores dos testes sorológicos AAT, 2-ME, BPA, FC e ELISA, com o soro coletado de rebanhos livres da infecção e de rebanhos conhecidamente infectados, e que utilizavam a vacina B19. As conclusões da investigação foram as seguintes: a sensibilidade relativa através de ELISA foi mais elevada, em todas as comparações, que a de outros testes confirmatórios (2-ME e FC), a especificidade do ELISA é a mesma que a das provas 2-ME e FC. Durante estas investigações a BPA mostrou-se mais sensível que o AAT como teste para selecionar os animais supostamente infectados. Desta forma, o método ELISA trouxe também alguns outros benefícios, tais como: não ser necessário tratar o soro com 2-ME ou com calor, não necessitar da utilização de complemento, hemolisina, nem hemácias; o ELISA trabalha só com uma diluição, e a cotização ocorrida no leitor de ELISA é bastante objetiva (MOLNÁR et al., 1997).

Nicoletti & Tanya (1993) levantaram contradições em relação à capacidade do ELISA em detectar infecções mais cedo que o fixação de complemento. Seu trabalho evidenciou que o ELISA possui maior sensibilidade, porém, menor especificidade, resultados também alcançados por outros autores a quem fazem referências. Molnár et al. (1997) citam referência de autores, datada de 1994, em que foi observada uma maior sensibilidade do ELISA em relação às provas AAT e FC em rebanhos infectados.

Ao compararem os testes imunoenzimáticos indireto e competitivo, Mathias et al. (1995), utilizando para ambos o conjugado BM-40, verificaram que o teste indireto revelou maior número de reagentes que o teste competitivo, e associaram seus resultados aos de outros autores que ao compararem o teste competitivo com o teste indireto, observaram maior especificidade, porém, menor sensibilidade daquele em relação a este último. Os resultados sugerem que o teste imunoenzimático indireto com o conjugado BM-40 seria mais

indicado como teste de triagem, enquanto o competitivo com o conjugado BM-40 seria mais indicado como método confirmatório no diagnóstico da brucelose bovina

A grande sensibilidade do ELISA para brucelose tem sido observada por diversos autores. Bovinos com infecção crônica sempre apresentam altos níveis de IgG2 circulantes, em adição aos IgG1 e IgM persistentes. Ao contrário do ELISA, o FC não detecta IgG2, e de fato, altos níveis de IgG2 podem bloquear as reações do FC com IgG1 e IgM. Finalmente, bovinos vacinados que se tornam infectados podem desenvolver resposta aberrante de anticorpos, as quais não são detectáveis pelo FC, porém detectáveis pelo ELISA. Quando foi utilizado um ponto de corte de 20% no ELISA, este apresentou mais reações positivas, resultando em alta sensibilidade e baixa especificidade em relação ao FC. Já com um ponto de corte de 40%, o ELISA teve resultados mais semelhantes ao FC, sendo que, neste caso, as reações positivas apenas no ELISA foram, de fato, de animais realmente positivos. Contudo, em rebanho vacinado, com ambos os pontos de corte utilizados, a especificidade do ELISA foi inadequada. Para evitar reações falso-positivas, especialmente em rebanhos vacinados com a amostra B19, o autor sugere que o ELISA seja utilizado como teste de triagem (KERBY et al., 1997).

Segundo Costa et al. (1999) a prova do 2-mercaptoetanol apresenta uma boa especificidade, isto se justifica pelo fato de que a técnica detecta, seletivamente, as imunoglobulinas da classe IgG, uma vez que a IgM é inativada. Seus estudos apresentaram alta sensibilidade para o teste, resultado não alcançado por outros autores a quem fazem referência. Quanto ao AAT, sua especificidade relativa, em rebanho vacinado, foi pequena comparada ao 2-ME, FC, imunodifusão em ágar gel (IDGA), SAR e SAL; entretanto, em rebanho não vacinado a concordância com a fixação de complemento foi absoluta. Esses dados vêm demonstrar a viabilidade de utilizar o de AAT como alternativa aos demais testes de aglutinação em rebanhos onde não se pratica a vacinação contra a brucelose, tendo em vista a boa eficiência do teste, maior facilidade de execução e menor custo. Embora o IDGA tenha apresentado alta especificidade em rebanho não vacinado livre para brucelose e em rebanho vacinado com dose padrão, não se apresentou satisfatório como teste complementar devido à baixa sensibilidade verificada para rebanho infectado. A utilização do IDGA, com o objetivo de diferenciar anticorpos vacinais dos associados à infecção, poderia levar à retenção de animais infectados no rebanho.

Um teste de imunodifusão utilizando polissacarídeo B, um extrato celular, como antígeno, foi o primeiro teste desenvolvido, capaz de reagir positivamente somente com soro de animais naturalmente infectados. Modificações introduzidas no teste de ELISA

competitivo (ELISA-C), já desenvolvido para brucelose, aumentaram consideravelmente a especificidade e a sensibilidade deste teste que permite a diferenciação de animais naturalmente infectados com *B. abortus* dos animais vacinados com B19. Mais recentemente, um teste denominado fluorescência polarizada (FPA) foi desenvolvido para o diagnóstico da brucelose bovina, também permitindo a diferenciação de animais vacinados e naturalmente infectados. O teste utiliza como antígeno um polissacarídeo de *B. abortus* hidrolizado e conjugado com isotiocianato de fluoresceína, uma diluição do soro teste, requerendo poucos minutos para ser realizado. Os resultados obtidos, quando comparados aos testes convencionais e ao ELISA-C, demonstraram que o FPA apresentou sensibilidade e especificidade superiores aos demais (FERRAZ, 1999).

Em rebanhos vacinados por duas vezes com dose padrão da vacina B19, após 90 dias do reforço vacinal, o teste FPA não detectou anticorpos em nenhum animal experimental, um ELISA competitivo detectou em apenas 22% dos animais. Já um ELISA indireto detectou anticorpos em 44%, e o 2-ME em 94% dos animais, sendo que o AAT e o FC detectaram em 100% dos animais experimentais. O ELISA ID e o FC não são capazes de diferenciar anticorpos vacinais daqueles induzidos por infecção a campo, já o ELISA competitivo e o FPA são capazes de fazer esta diferenciação na maioria dos casos, o que permite diminuir a porcentagem de resultados falso-positivos em rebanhos que possuem anticorpos vacinais residuais. O mecanismo pelo qual o ELISA competitivo e o FPA discriminam anticorpos vacinais daqueles causados por infecção a campo, não é conhecido (SAMARTINO et al., 1999).

Megid et al. (1999) constataram reações de precipitação na prova de imunodifusão em soros de animais com altos títulos de anticorpos. Os autores consideraram que animais naturalmente infectados, com baixos títulos de anticorpos em provas como soroaglutinação lenta, fixação de complemento e ELISA não apresentam reações de precipitação na prova de imunodifusão. O teste de imunodifusão demonstrou baixa sensibilidade a despeito da alta especificidade, quando comparado às provas comumente utilizadas no sorodiagnóstico da brucelose bovina. Dessa forma, os resultados obtidos não estimulam o uso da prova de imunodifusão em gel de ágar, utilizando como antígeno extrato polissacarídeo de parede de *Brucella* (POLI O) como técnica de diagnóstico de rotina, em virtude de sua baixa sensibilidade, o que possibilita manter animais infectados no rebanho e favorece a disseminação da doença.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) já desenvolvida com fins diagnósticos em humanos infectados por *B. abortus*, teve a sua especificidade comprovada por restrição enzimática e *Southern blot*, e pode se constituir, em um futuro próximo, numa importante ferramenta no diagnóstico confirmatório da brucelose bovina (FERRAZ, 1999).

Molnár et al. (2000) também reforçam as falhas que podem ocorrer quando se utiliza apenas o FC para diagnóstico da brucelose, e mesmo reconhecendo os problemas inerentes ao ELISA indireto, consideram-na a mais adequada técnica para diagnosticar esta doença, devido à sua alta sensibilidade e ao fato de que, num programa de erradicação, um animal infectado e não reconhecido a tempo, pode causar grandes danos. Mesmo considerando a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos, os resultados encontrados em pesquisa sugerem que as reações positivas no ELISA tenham sido específicas. Os autores exemplificam a ocorrência, em processo de erradicação da brucelose na Hungria, de várias observações de que bezerras infectadas no decorrer do parto ou aquelas recém nascidas tinham permanecido soronegativas nas provas de FC e soroaglutinação lenta até o seu primeiro parto, e tornaram-se soropositivas somente alguns dias após a parição. Acreditam que, por ser o ELISA mais sensível que o FC, o número de animais positivos diagnosticados por aquele teste, chegou a ser seis vezes superior ao detectado pelo outro teste.

Megid et al. (2000) constataram que a prova do 2-ME se caracterizou como prova complementar específica, comparada ao AAT, sugerindo a utilização daquela em substituição à FC nos laboratórios que não realizam esta última rotineiramente. A utilização do AAT elimina reações suspeitas e falso-positivas observadas na prova de SAR, apresentando maior facilidade de execução e baixo custo, possibilitando estratégias de controle da brucelose em menor período de tempo como prova de triagem.

Resultados de estudo sorológico de rebanho vacinado, com dose padrão da amostra B19, aos dezoito meses de idade, demonstraram ser o FC mais indicado como teste confirmatório, pois após os dezoito meses de vacinação, apenas 2,7% dos animais ainda apresentavam títulos, sendo que esse título era de apenas 1:4. Em comparação com a SAL, em que pese este teste ter apresentado menor proporção de positivos, com título a partir de 1:100, deve-se considerar que os títulos 1:50 geralmente causam bastante preocupação na interpretação dos resultados dessa prova (MATHIAS et al., 2001).

Guarino et al. (2001) acreditam não ser possível aferir, definitivamente, a eficácia do ELISA em diagnosticar a brucelose em búfalos, se a sua habilidade em detectar uma resposta primária de anticorpos, em animais infectados, não for avaliada. Todos os animais provenientes de rebanhos infectados deveriam ser testados pelo ELISA e testes

convencionais, e ainda, linfonodos mamários, tecidos do baço e amostras de soro de animais infectados abatidos deveriam ser testados por exames bacteriológicos, PCR para isolar e/ou detectar células de *Brucella*. Uma comparação entre o ELISA e o AAT como método de triagem demonstrou que o ELISA resultou em maior número de casos falso-positivos, enquanto o outro detectou maior número de falso-negativos em rebanhos infectados. Um método de triagem deveria minimizar os resultados falso-negativos, especialmente quando utilizado para detecção de infecções com sérias consequências para os animais e humanos, como é o caso da brucelose. O número de falso-positivos encontrado foi mais aceito pela subsequente confirmação por análises feitas pelo FC.

Segundo Guarino et al. (2001), a capacidade do ELISA ID em detectar resultados positivos não detectados pelo FC, considerados falso-positivos, podem ser decorrentes da presença de baixa resposta de anticorpos de animais que se encontram em fase inicial de infecção, sendo detectada apenas pelo ELISA, ou talvez de reações cruzadas com outras bactérias, ou ainda da detecção de traços de uma resposta imune humoral da vacina contra a brucelose.

O ELISA indireto, utilizando-se conjugado anti-bovino preparado com anticorpo monoclonal para cadeia leve, tem apresentado boa sensibilidade e especificidade, corroborando as recomendações oficiais do OIE (Escritório Internacional de Epizootias). As técnicas de ELISA ID e AAT têm apresentado resultados positivos e negativos muito semelhantes. Entretanto, no AAT alguns resultados foram falso-positivos e outros falso-negativos, sendo o número destes alto e surpreendente, já que o AAT é aceito como teste adequado para triagem da brucelose. Resultados obtidos na SAL demonstram que essa prova é inapta para proporcionar resultados confiáveis (MOLNÁR et al., 2002).

Segundo Molnár et al. (1997), as diferentes provas de soroaglutinação são adequadas para avaliar um rebanho, porém inseguras para verificar se um animal está infectado ou não. A avaliação dos rebanhos tem de ser a base da erradicação.

As dificuldades em diferenciar as reações oriundas de infecção das de origem vacinal, pelos métodos sorológicos convencionais, decorrentes, principalmente, da persistência de imunoglobulinas induzidas em animais vacinados com a amostra B19, são consideradas um dos maiores problemas no controle da brucelose, em países que adotam vacinas atenuadas aglutinogênicas (MEGID et al., 1999).

Um dos maiores problemas com relação ao diagnóstico da brucelose bovina em rebanhos vacinados diz respeito às reações de classificação incerta (reações suspeitas), que tanto podem estar associadas com reação vacinal residual, como com reações inespecíficas ou

com brucelose crônica, situações nas quais é comum a ocorrência de títulos sorológicos baixos e às vezes até ausentes. Um bom teste confirmatório deveria apresentar alta especificidade aliada a uma boa sensibilidade, a fim de que animais infectados detectados na triagem não permanecessem no rebanho, retardando ou mesmo inviabilizando o programa de controle da doença (COSTA et al., 1999).

Em condições práticas, fatores como prevalência da doença, custo dos testes e implicações dos resultados falso-positivos e falso-negativos é que irão determinar qual o melhor critério a ser adotado, ou seja, se é melhor maximizar a sensibilidade ou a especificidade do diagnóstico sorológico (COSTA et al., 1999).

Por meio da Instrução Normativa Nº 2 de 10 de janeiro de 2001, o Secretário de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil, considerando a necessidade de padronizar e garantir a qualidade dos instrumentos e das ações profiláticas, de diagnóstico, de saneamento de rebanhos e de vigilância sanitária ativa relacionadas ao combate da brucelose e tuberculose animal, aprovou o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Dentre as propostas técnicas do programa, as medidas sanitárias preconizam a vacinação obrigatória das fêmeas da espécie bovina e bubalina, e a utilização de técnicas de diagnóstico que permitam identificar os animais infectados, que devem ser sacrificados ou destruídos, a fim de reduzir ou prevenir a exposição dos animais não infectados ao agente infeccioso, e aumentar a resistência dos rebanhos (BRASIL, 2001).

A maioria dos países com programas consistentes de controle e erradicação da brucelose, emprega testes de diagnóstico sorológico em duas circunstâncias principais: provas de rotina, as quais demandam alta sensibilidade e provas confirmatórias, em que se busca maior especificidade (BRASIL, 2003).

A eficácia de um programa nacional de combate a qualquer doença depende, em parte, da qualidade e padronização dos procedimentos de diagnóstico utilizados. Com o conhecimento de que ainda não existe um teste sorológico perfeito que detecte infecção nos estágios iniciais de doença, antes da ocorrência do aborto, ou que discrimine anticorpos de vacinação e de infecção, ou que não apresente resultados falso-negativos ou falso-positivos, o PNCEBT preconiza a utilização de testes em série para o diagnóstico indireto da brucelose, estando reconhecidos como oficiais:

a) o teste do antígeno acidificado tamponado, que é muito sensível e de fácil execução, sendo o único teste de triagem que pode ser realizado por médicos veterinários credenciados;

b) o teste do 2-mercaptoetanol como confirmatório para os animais que reagirem ao teste anterior, que é mais específico, devendo ser executada em laboratórios credenciados ou em laboratórios oficiais credenciados, em paralelo com a prova de soroaglutinação lenta em tubos;

c) o teste de fixação de complemento, ou outro que o substitua, devendo ser executado por laboratórios oficiais para efeitos de trânsito internacional e para o diagnóstico de casos inconclusivos ao teste do 2-mercaptoetanol;

d) e o teste do anel em leite que deverá ser utilizado para monitoramento da condição sanitária de propriedades certificadas (BRASIL, 2003).

Os testes acima mencionados colocam o diagnóstico de brucelose no Brasil em sintonia com os padrões internacionais e, em particular, com as recomendações do Código Zoosanitário Internacional. Entretanto, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pretende atualizar e melhorar o padrão de diagnóstico, à medida que novos e melhores testes forem surgindo. O que vai permitir a introdução de novas técnicas de diagnóstico no programa são os benefícios que trará e o preço para o programa e para o produtor (BRASIL, 2003).

2.2. Avaliação do uso de uma dose reduzida da vacina produzida com a amostra 19 de *Brucella abortus* em bovinos

A brucelose pode ser prevenida pelo uso de vacina com a amostra 19 de *B. abortus* (B19), a qual induz resistência à infecção e aborto por vários anos em um número significativo de animais vacinados (POESTER et al., 2000). A vacina B19 é uma amostra de *B. abortus* lisa isolada de uma vaca Jersey em 1923. Depois de esquecida por acidente por mais de uma ano à temperatura ambiente, esta 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 brucelose como Austrália, Canadá, Dinamarca, Inglaterra, Holanda e Suécia, dentre outros (BRASIL, 2003).

A B19, uma vacina viva atenuada, é a mais utilizada atualmente, sendo a única liberada e aprovada no Brasil. Esta vacina produz uma proteção eficiente, duradoura, mas com alguns efeitos indesejáveis, como ser patogênica para o homem, causar produção de anticorpos que interferem no diagnóstico diferencial e causar aborto em fêmeas, especialmente quando animais adultos são vacinados (FERRAZ, 1999).

Em 1944 nos EUA, quando a situação do problema brucelose não era muito diferente a do Brasil hoje, em termos gerais, foi autorizada, temporariamente, mas de forma oficial, a vacinação de fêmeas adultas. Afirmava-se que a vacinação dos adultos teria mais êxito que em gado jovem. As principais objeções à vacinação consistiam na prolongada persistência da reação sorológica positiva e na conseqüente restrição de venda e transporte interestadual. Dizia-se porém que, como em rebanhos infectados, estas circunstâncias já existiam, a vacinação constituía-se num alívio das perdas ocasionadas pelo aborto (KUCHEMUCK, 1997).

Embora a vacinação de bovinos adultos com a amostra B19 em rebanhos infectados tenha sido vastamente praticada durante as décadas de 1940 e 1950, acarretando em substancial redução da ocorrência de infecções nestes rebanhos, esta prática entrou em desuso devido às interferências na interpretação de resultados de testes sorológicos. Contudo, os efeitos variaram, e dependeram em parte do método vacinal, da dosagem, e dos procedimentos dos testes sorológicos (NICOLETTI et al., 1978b). A persistência de anticorpos está relacionada à idade e à vacinação. Se animais forem vacinados com idade superior a oito meses há grande probabilidade de produção de anticorpos que perdurem e interfiram no diagnóstico da doença após os vinte e quatro meses de idade. Quando a vacinação ocorre até os oito meses de idade, estes anticorpos desaparecem até doze meses

após vacinação, estando os animais sorologicamente negativos aos 24 meses de idade (BRASIL, 2003).

Em 1952, Berman et al. apud Plommet & Fensterbank (1976), ao utilizarem reforço vacinal via subcutânea, não observaram um aumento na resistência, mas sim uma persistência excessiva nos títulos de aglutininas. A vacinação com injeção intracaudal, de doses reduzidas da vacina, foi praticamente tanto aglutinogênica quanto a via subcutânea, com o inconveniente de causar necrose nas unhas. Concluíram, então, que a vacinação por injeções intradérmicas com doses reduzidas é menos aglutinogênica, porém, este método foi abandonado por não ter oferecido uma proteção melhor que a da dose padrão.

No Brasil, pela portaria 438/58 do Ministério da Agricultura, foi instituída em 1958 a vacinação das bezerras entre seis a dez meses de idade na dose de 5mL e na concentração de 10×10^9 bactérias viáveis por mililitro, por via subcutânea (KUCHEMUCK, 1997).

Em 1970, o Comitê de Especialistas em Padrões Biológicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu as normas para produção da vacina viva da amostra B19 contra a brucelose. A dose recomendada deveria conter de 40 a 120×10^9 bactérias viáveis, para injeção subcutânea, como dose padrão (FERRARI, 2001).

A vacinação de bezerras entre quatro e oito meses de idade, segundo a OMS, com data de 1970, reduz o número de bovinos com aglutinações positivas à primeira gestação. Tais reações indesejáveis podem ser reduzidas ainda mais quando se administra a amostra B19 entre o terceiro e quarto mês de idade. O Departamento de Agricultura dos EUA, em 1972, estabeleceu os seguintes limites de idade de vacinação com a amostra B19: raças leiteiras dos três aos seis meses, e raças de corte dos três aos dez meses. Também enfatizou que a vacinação deveria ser feita logo após o terceiro mês de idade para reduzir o problema de títulos residuais (SANTOS et al., 1975).

Trabalhos realizados a partir de 1975, com a utilização da amostra B19 na imunização de bovinos em dosagem reduzida, apresentaram a grande vantagem de induzir títulos residuais de curta duração, além de possibilitar proteção igual ou superior à vacinação convencional (dose total) quando aplicadas duas doses intervaladas de quatro a seis meses (VIANA et al., 1989).

Santos et al. (1975) observaram, em trabalho com bezerras zebuínas de diferentes idades, que os animais com menos de dois meses responderam irregularmente à vacinação com a amostra B19. Bezerras de dois a doze meses apresentaram resposta sorológica precoce acentuada e regular. Nos animais de dois a seis meses notou-se uma queda

de título contínua e regular, enquanto que reaparecimento ou aumento de títulos aglutinantes foram observados em alguns animais com oito a doze meses. Nenhum dos animais apresentou títulos de 1:200 ao final de 20 meses após a vacinação.

Plommet & Plommet (1975) observaram que a vacinação de cobaias, pela via conjuntival, com duas doses de 10^7 bactérias da amostra B19, com intervalo de três meses, induziu uma fraca resposta sorológica, enquanto conferiu uma imunidade igual ou superior à obtida pela vacinação com dose padrão de 7×10^9 bactérias administradas via subcutânea.

Plommet & Fensterbank (1976) citam um trabalho não publicado do Laboratório Veterinário Central de Weybridge, notificando que vacinações com doses reduzidas, pela via subcutânea, ocasionaram diferentes respostas, de acordo com a dose utilizada: 1/20 da dose padrão resultou em resposta sorológica de menor duração, e uma proteção equivalente à da dose padrão; 1/1000 da dose padrão ocasionou apenas uma baixa resposta sorológica, mas muito pouca ou quase nenhuma proteção.

Em 1976, considerando a necessidade de atualizar a legislação existente, o Ministério do Estado da Agricultura do Brasil, através da Portaria nº23/76, aprovou as Normas para a Profilaxia da Brucelose Animal. Esta portaria recomendava a vacinação de bezerras, uma única vez, com vacina viva elaborada com a amostra B19, controlada por órgão oficial competente. A vacinação de fêmeas adultas, com a amostra B19 poderia ser autorizada em propriedades onde estivessem ocorrendo surtos de abortos decorrentes da brucelose, observando as condições de ser realizada apenas uma vez a cada propriedade afetada, mediante requerimento do proprietário e autorização oficial (FERRARI, 2001).

A legislação brasileira (Portaria Ministerial n.º 23/76) estabelecia que os animais vacinados entre os três e oito meses podiam ser classificados como negativos até o título de 1:50 e como positivos a partir de 1:200. O uso da vacina em bovinos adultos na dose convencional, embora constasse na legislação citada, apresentava os inconvenientes da persistência de títulos sorológicos, além de outros aspectos ligados ao trânsito, à participação em exposições e à comercialização dos animais reagentes (VIANA et al., 1989).

Plommet & Plommet (1976) e Plommet & Fensterbank (1976) foram os primeiros a iniciar experimentos cientificamente controlados no sentido de saber se uma dose reduzida de vacina B19 poderia ser uma alternativa que desse boa imunidade com títulos pós-vacinais não muito altos e de curta duração. Concluíram que a vacinação com dose reduzida conferia proteção até melhor, que a vacinação tradicional, e provaram que a dose reduzida apresentava respostas sorológicas menos intensa e de mais curta duração.

Antes de realizarem o experimento das cobaias em bovinos, Plommet & Plommet (1976) estabeleceram que a dose vacinal de 5×10^9 bactérias vivas, administradas via conjuntival, causou, em bovinos, uma colonização persistente dos linfonodos da cabeça, sem induzir uma resposta sorológica persistente.

Plommet & Fensterbank (1976) notificaram que a dose reduzida da amostra B19 (5×10^9 bactérias vivas), instilada por duas vezes pela via conjuntival, protegeu bovinos adultos da exposição a desafios de virulência e causou resposta sorológica mínima, com máxima duração de oito semanas. Outro método vacinal, com reforço em dose reduzida, pela via conjuntival, após dose padrão, também protegeu bovinos e induziu uma resposta sorológica de baixa intensidade e curta duração: em três meses os títulos estavam idênticos aos de animais que não receberam reforço vacinal. Ambos os métodos ocasionaram uma proteção melhor que a dose padrão (9×10^{10}), sendo que esta ainda ocasionou um aumento nos títulos pós-vacinais.

Em 1977, o Departamento de Agricultura dos EUA, Serviço de Inspeção de Saúde Animal e Vegetal, aprovaram, com certa restrição, o uso da vacina B19 em fêmeas bovinas adultas em rebanhos fortemente infectados, nos quais a eliminação da brucelose pelo método do teste e abate não obteve sucesso. Todos os animais foram testados e os reagentes foram removidos. Bovinos soronegativos eram vacinados via subcutânea com 0,2mL de vacina (equivalente a 2×10^9 células). Nestes rebanhos, a rotina de testes sorológicos poderia ser suspensa por mais de seis meses, quando não seriam mais reagentes aos testes (NICOLETTI et al., 1978a).

Nicoletti et al. (1978a) não recomendavam a vacinação de bovinos sexualmente maduros, com a amostra B19 da vacina, devido à interferência nos testes diagnósticos, e consideravam bastante interessantes os métodos que reduziam a resposta de aglutininas em bovinos vacinados, pela administração de menores doses da amostra vacinal, via subcutânea, intradérmica, ou intracaudal. Consideravam o pico de respostas de aglutininas e a retenção do título diretamente relacionadas à dose, independente da via de administração. E demonstraram que, embora a vacinação de bovinos adultos pudesse reduzir substancialmente o número de novas infecções, estes métodos isolados eram insuficientes para eliminar toda a infecção do rebanho. Não constataram diferença aparente entre a proteção causada pela dose padrão e pela dose reduzida.

Nicoletti et al. (1978b), comparando uma dose padrão de vacina amostra B19, contendo 9×10^{10} células viáveis, via subcutânea, e uma dose reduzida da vacina, contendo $4,5 \times 10^9$ células viáveis, via conjuntival, esta com reforço após quatro meses,

verificaram que os títulos no teste de fixação de complemento diminuíram mais rapidamente que nos testes padrão em tubo, de cartão, rivanol e do mercaptoetanol. Pouco antes dos dois meses após a vacinação, 60% dos animais estudados tiveram títulos menores que 1:20 e 90% menor que 1:40 no de fixação de complemento. Não constataram aumento de título em nenhum teste após a segunda vacinação do grupo que recebeu a vacina via conjuntival. Também não observaram nenhum indicativo de que bovinos vacinados com dose reduzida pela via conjuntival estivessem menos protegidos que aqueles que receberam dose padrão via subcutânea.

Bezerros com idade entre três e seis meses, que receberam via subcutânea dose de $2,4 \times 10^9$ organismos viáveis, o equivalente a 1/20 da dose padrão da vacina, tiveram uma resposta de aglutinina que diminuiu mais rapidamente após vacinação comparado a dose total antes oferecida. Dez meses após a vacinação, os animais foram desafiados com uma cepa virulenta de *B. abortus*, sendo o baço e os linfonodos da cabeça e tórax examinados para a detecção de *Brucella* spp. seis semanas mais tarde. A proteção da dose a 1/20 foi comparável à da dose padrão (NICOLETTI et al., 1978a).

Nicoletti et al. e Alton et al., a partir de 1980, mostraram ocorrer redução do nível de infecção em bovinos adultos de rebanhos infectados, vacinados com dose reduzida da B19, e menor interferência no diagnóstico em virtude da curta duração de títulos séricos positivos. Demonstraram que a imunidade conferida com uma pequena dose ($8,8 \times 10^8$ bactérias) era igual ou maior do que a resultante da vacinação de bezerros com a dose tradicional (KUCHEMUCK, 1997).

A multiplicação em massa de brucelas no útero grávido se deve à estimulação de crescimento pela abundância de eritritol neste órgão. A amostra B19 é a única, entre as amostras de *B. abortus*, em que o crescimento é geralmente inibido pelo eritritol. Este fato deve ser importante na prevenção da colonização do útero grávido e de abortos em animais vacinados durante a gestação. Contudo sabe-se que, regularmente, aparecem mutantes em culturas sensíveis ao eritritol da amostra B19 (CORNER & ALTON, 1981).

Corner & Alton (1981) sustentam a tese de que se todo um rebanho deve ser vacinado com a amostra B19, inclusive as vacas prenhes, então a dose apropriada deve ser de aproximadamente 3×10^8 células viáveis. Evidências disponíveis indicam que a resistência produzida pela vacinação com esta dose é tão boa quanto a produzida por doses mais altas, como a dose padrão.

Nicoletti (1984) comparou, em bovinos adultos, a dose padrão da amostra B19 com doses reduzidas: 5×10^9 bactérias/dose por via subcutânea, 4×10^9 bactérias/dose por via intradérmica, $4,5 \times 10^9$ bactérias/dose no saco conjuntival com reforço passados quatro meses. Sua conclusão foi que as doses reduzidas, independente da via de administração, foram tão efetivas no controle da brucelose quanto a dose convencional, e ainda apresentaram uma vantagem em relação a esta última, pois ocasionaram titulações menores e menos persistentes. E também cita que, aparentemente, nenhum estudo prévio foi feito com o uso da via oral para administração de vacina com a amostra B19.

A vacinação de novilhas com a amostra B19 geralmente resulta em aumento de anticorpos contra *B. abortus* e efetivo aumento na resistência a abortos tanto em condições experimentais quanto naturais. Apesar dos efeitos benéficos da amostra B19, títulos de anticorpos residuais induzidos por vacinação, reações sorológicas, e persistência de infecção com a amostra B19 podem ocorrer e causar reações falso-positivas nos testes de diagnóstico sorológico. Estudos foram conduzidos para determinar se a dose efetiva imunizante da amostra B19 poderia ser reduzida abaixo da dose padrão, de 9×10^{10} unidades formadoras de colônias (UFC) para reduzir as reações falso-positivas enquanto mantendo sua eficácia. Resultados daqueles estudos indicaram que a dose protetora mínima da amostra B19 estava entre 10^{10} e 10^7 UFC. Entretanto, doses reduzidas da amostra B19 para uso a campo são recomendadas entre 1×10^9 a 3×10^9 UFC por animal. A redução na proteção permitida pelas doses reduzidas da amostra B19 poderiam ocorrer devido a variações na idade de vacinação e no tempo de exposição a desafios com *B. abortus* virulenta (CONFER et al., 1985).

Confer et al. (1985) comprovaram que doses reduzidas da amostra B19 podem causar proteção efetiva em bovinos contra abortos. Contudo, os efeitos protetores foram reduzidos com o aumento, em desafio, da exposição à amostra 2308. Estes resultados reforçam o conceito de que, em condições de campo, com altas taxas de exposição, a amostra B19 sozinha não alcança a proteção adequada, e procedimentos que reduzam a exposição a *B. abortus* em rebanhos infectados devem ser seguidos para maximizar a eficiência de vacinações.

A vacinação subcutânea em subdosagem (3×10^9 brucelas/dose) é capaz, juntamente com outras medidas sanitárias de apoio, de controlar a doença em um prazo de trinta meses. Tais medidas são: a vacinação de bezerras com idade entre três a oito meses e separação por trinta dias do rebanho das vacas brucélicas, após a ocorrência do parto ou de um eventual aborto (VIANA et al., 1986).

O uso de dose reduzida (3×10^9 brucelas/dose), via subcutânea, em animais negativos e suspeitos, mantidos em rebanho infectado, resultou, nas vacas consideradas negativas, após trinta dias da vacinação, em 100% de positividade ao teste do cartão (TC) e na prova de soro aglutinação rápida (SAR), com títulos elevados de 1:50 a 1:800, sendo o mesmo comportamento de animais vacinados com dose padrão. Entretanto, quando se aplicou a prova de 2-mercaptoetanol (2-ME) os títulos regrediram (máximo de 1:100). Na prova do anel do leite (PAL) 73,3% dos animais foram positivos, indicando que a amostra B19, quando aplicada por via subcutânea, mesmo em subdosagem, é capaz de induzir a produção de anticorpos, porém em títulos baixos. Após três meses de vacinação houve um decréscimo acentuado nos títulos da SAR; a prova do 2-ME tornou-se negativa em todos os animais, o TC em 50% dos animais e a PAL em 92,8%. Decorridos cinco meses, os resultados revelaram que nenhum animal reagiu a títulos maiores que 1:50 na SAR; 91,6% tornaram-se negativos ao TC e 100% à PAL. Após doze meses a mesma situação foi observada (VIANA et al., 1986).

Já nos animais considerados suspeitos, três meses após a vacinação, os resultados mostraram títulos mais elevados e persistentes à SAR, 2-ME, PAL e ainda maior percentual de positivos na TC. Transcorridos doze meses da vacinação ainda 16,6% dos animais apresentavam títulos iguais ou maiores a 1:100 à SAR e 50,0% reagiram positivamente ao TC. Nos animais considerados positivos, evidenciou flutuações de títulos durante o período de observação de quatro meses. A prova do 2-ME tendeu a manter o mesmo título observado na SAR ou apresentar um título ligeiramente inferior. O TC mostrou ser a prova mais regular, mantendo-se positiva em todos os exames realizados. A PAL evidenciou títulos diferentes para um mesmo animal, considerando-se o resultado individual de cada quarto da glândula mamária (VIANA et al., 1986).

Considerando-se os resultados da SAR, no momento da vacinação, pelo fato de o animal ser ou não reagente, seria uma condição importante para uma maior ou menor persistência de títulos pós-vacinais. De acordo com a literatura, é de se supor que os animais suspeitos vacinados, que evidenciaram reações sorológicas quanto a títulos mais elevados e persistentes, estariam em período de incubação da doença, ou ainda, que a vacina teria atuado como reforço, considerando-se que esses animais se expuseram ao agente antes de serem vacinados (infecção subclínica), ou mesmo, que se trataria de infecção crônica, oportunidade em que alguns animais poderiam manter títulos mais baixos (VIANA et al., 1986).

Viana et al. (1989) comprovaram que a aplicação da vacina contra a brucelose em subdosagem (3×10^9 brucelas/dose), com reforço após quatro meses, por via conjuntival, somada às medidas profiláticas de apoio (vacinação de bezerras na idade de três a seis meses, separação por trinta dias das vacas brucélicas após o parto ou eventual aborto, com descarte gradual dos reagentes positivos), permitiram obter o controle da doença em curto prazo, não se registrando novos casos de reagentes positivos à soroaglutinação rápida após vinte e quatro meses de revacinação. A proteção de 93,4% do rebanho esteve dentro dos parâmetros obtidos previamente por Nicoletti et al., em trabalho de 1978. Também observaram, que novilhas primo-vacinadas, com dose convencional na idade de três a oito meses, que ao receberem duas doses reduzidas (3×10^9 brucelas/dose) da amostra B19, intervaladas de quatro meses, não desenvolveram títulos sorológicos elevados.

Resultados de pesquisa realizada por Crawford et al. (1991) sustentam a hipótese de que o estágio de gestação na vacinação afeta a fração preventiva contra a brucelose ou a eficácia da amostra B19, em rebanhos vacinados com baixa dose e, por isso, é um fator que pode explicar a variação na proteção induzida pela amostra B19.

Com base em informações da Comissão Técnica da Brucelose, em 1982, nos Estados Unidos, o Manual de Métodos e Regulamentos para o controle da brucelose passou a contemplar, entre as estratégias adotadas para o controle da enfermidade, o uso da vacina produzida com a amostra B19 em fêmeas bovinas maiores de doze meses, com dose contendo entre 3×10^8 a 10^9 bactérias viáveis. Essas modificações ocorreram sobre o respaldo dos resultados das inúmeras pesquisas que demonstraram que doses reduzidas da vacina B19 podiam conferir a fêmeas adultas imunidade pelo menos igual à produzida pela vacinação de bezerras, com resposta retornando à condição negativa cerca de três meses após a vacinação, e até 1996 a dose reduzida da B19 foi a única vacina aprovada para uso em animais adultos naquele país (FERRARI, 2001).

Kuchembuck (1997), comentando sobre a inadequação das legislações brasileiras da época em não autorizar o emprego de métodos atualizados no controle da brucelose no Brasil, sugeriu, para áreas onde a enfermidade fosse enzoótica, a vacinação de todas as fêmeas da espécie bovina, independentemente da idade, com dose reduzida da vacina produzida com a amostra B19.

No Brasil, recentemente, a necessidade de institucionalizar e implementar um programa para melhorar a eficiência das medidas de combate à brucelose e tuberculose, visando a promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor e contribuir para modernizar as cadeias produtivas do leite e da carne, resultou na aprovação,

pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, do Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), por meio da Instrução Normativa Nº 2/01 em substituição à Portaria Nº 23/76 de 1976 (BRASIL, 2001).

Entre as propostas técnicas do PNCEBT, foi estabelecido prazo até dezembro de 2003 para cada Estado implantar, em todo o seu território, a obrigatoriedade da vacinação de bezerras, entre três a oito meses de idade, com vacina produzida com a amostra 19 de *B. abortus*. A vacinação de fêmeas adultas, considerada útil em regiões e propriedades com alta prevalência de infecção, somente será permitida com imunógenos que não interfiram nos testes de diagnóstico, após aprovação e nas condições a serem definidas pelo Ministério, ficando proibida a utilização da vacina B19 em machos de qualquer idade e em fêmeas com idade superior a oito meses.

Ferrari (2001) utilizando uma dose reduzida da vacina B19, de 6×10^8 unidades formadoras de colônias, em rebanho adulto com alta prevalência de reagentes sorológicos, observou que os títulos não apresentaram variação significativa que pudesse interferir no diagnóstico sorológico da enfermidade nos períodos de noventa, duzentos e dez e trezentos e trinta dias após a vacinação. Concluiu que o emprego de uma dose reduzida da vacina produzida com a amostra B19 não demonstrou interferir no diagnóstico sorológico do rebanho.

As vacinas de DNA que expressam genes de *Brucella* têm sido muito estudadas atualmente, mas ainda não foram capazes de induzir altos níveis de proteção imunológica (SCHURIG et al., 2002).

Desde a identificação do agente etiológico da brucelose, vários pesquisadores têm procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e que não interfiram no diagnóstico da doença. Em decorrência destes estudos, um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de sub-unidades, recombinantes e de DNA vêm sendo desenvolvidas. Muitas dessas vacinas mostraram-se pouco protetoras, como as vacinas mortas, ou ainda estão em fase de testes, como as vacinas de sub-unidades, recombinantes e de DNA (BRASIL, 2003).

O Manual Técnico do PNCEBT, versão preliminar cita que a vacina RB51, uma amostra de *B. abortus* rugosa atenuada, derivada da amostra lisa virulenta 2308, por passagens sucessivas em meio contendo concentrações sub-inibitórias de rifampicina, possui características de proteção semelhantes a B19, porém, por ser uma amostra rugosa, não induz a formação de anticorpos anti-lipopolissacarídeo liso, consequentemente, não interfere com o diagnóstico sorológico da doença. No Brasil poderá vir a ser empregada para a vacinação

estratégica de fêmeas adultas, sendo que, atualmente, é a vacina oficial do programa de controle de brucelose dos EUA, do México e do Chile (BRASIL, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Rebanho

No presente estudo foram usadas 303 fêmeas cruzadas de Nelore, clinicamente sadias, com idade igual ou superior a 24 meses, estabelecidas em propriedade rural, localizada no município de Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul, que se dedica à pecuária de corte e apresenta abortos esporádicos.

Os animais foram mantidos em piquetes de *Brachiaria brizantha*, em sistema extensivo de criação, recebendo água e sal mineral à vontade. O rebanho foi composto por grupos experimentais em diferentes condições sanitárias:

3.1.1. Grupo de animais não vacinados

Este grupo foi composto por 207 indivíduos adultos que nunca foram vacinados contra a brucelose, alguns gestantes, não estando no último mês de gestação nem no primeiro mês pós-parto, e outros não gestantes.

3.1.2. Grupo de animais vacinados com dose padrão da vacina B19

Este grupo foi composto por 96 indivíduos adultos que foram vacinados, com vacina elaborada com a amostra 19 de *B. abortus* (vacina B19), com idade entre 3 a 8 meses de vida. Alguns eram gestantes, não estando no último mês de gestação nem no primeiro mês pós-parto, e outros não gestantes.

3.1.3. Grupo de animais vacinados com dose reduzida da vacina B 19

Este grupo foi composto por 62 indivíduos, retirados do grupo dos animais não vacinados que obtiveram resultados negativos nas provas imunológicas estudadas. Todos estavam com idade de gestação aproximada de 4 meses no momento em que receberam vacina em dose reduzida.

3.2. Colheita de soros sanguíneos

Foram colhidas amostras de sangue dos animais através de punção da veia jugular externa com agulhas estéreis (40/20).

Após a centrifugação a 1.500g durante 15 minutos, as amostras de soro foram submetidas a cinco provas imunológicas, usualmente, empregadas no diagnóstico indireto da brucelose.

3.3. Vacinação

A vacinação de animais adultos foi realizada por via subcutânea, na região pré-escapular, com uso de dose reduzida de vacina vacina B19, contendo aproximadamente 6×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC). A dosagem foi obtida a partir da diluição 1/100, em solução fisiológica estéril, de vacina comercial¹, oficialmente, controlada para conter, no mínimo, 60×10^9 UFC por dose e confirmada por método de contagem de bactérias viáveis em suspensão.

3.4. Contagem de bactérias viáveis em suspensão da vacina

Foi realizada a contagem de bactérias viáveis de amostra vacinal B19, pelo método do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ALTON et al., 1976), antes e após a diluição da vacina, para a confirmação da quantidade de unidades formadoras de colônia por dose em amostras da partida da vacina utilizada na vacinação do rebanho.

3.5. Acompanhamento clínico

Durante o período entre a primeira e última colheita do estudo, o que compreende quatro meses, os rebanhos foram vistoriados, diariamente, para a verificação da ocorrência de abortos, pela observação clínica das fêmeas em gestação. Amostras de placenta de feto abortado e de secreção vaginal foram enviadas ao Instituto Biológico de São Paulo, para realização de exame de reação de polimerase em cadeia para a detecção de *Brucella* spp.

¹ Vacina Anabortina Bovina B19 - Merial, lote de partida 017/01.

3.6. Provas imunológicas

3.6.1. Provas de soroaglutinação

A realização e a interpretação das provas de soroaglutinação lenta (SAL) , 2- mercaptoetanol (2-ME) e antígeno acidificado tamponado (AAT) seguiram as recomendações de Madruga et al. (2001), respeitando a metodologia de interpretação contida no ‘Regulamento Técnico do PNCEBT’, onde o resultado do 2-ME é avaliado junto ao resultado da SAL (BRASIL, 2001).

3.6.2. Fixação de complemento

Na reação de fixação de complemento (FC) foi usada uma técnica de microfixação, com 50% de hemólise, descrita por Alton et al. (1988), com incubação a quente nas duas fases da reação e cinco unidades hemolíticas de complemento.

O complemento usado consistiu de soro de cobaia, com sistema hemolítico formado por hemácias de carneiro padronizadas para uma densidade ótica de 0,5, a um comprimento de onda de 540 nm, e anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro.

Na interpretação dos resultados foram considerados positivos os títulos iguais ou superiores a 1:4, independente da condição vacinal dos animais.

3.6.3. Ensaio indireto de imunoabsorção enzimática

A técnica de ensaio indireto de imunoabsorção enzimática (ELISA ID) foi realizada seguindo a metodologia descrita no kit ELISA brucelose², que contém microplacas com orifícios adsorvidos com antígeno lipopolissacarídeo de *B. abortus*, soros controles positivo e negativo (com azida sódica), solução tampão de diluição, solução tampão de lavagem, conjugado monoclonal anti-IgG bovino marcado com peroxidase, substrato tetrametilbenzidina, e solução de parada (H₂SO₄, 0,5M).

² Kit ELISA brucelose – Institut Pourquier, lote de partida 041.

A densidade ótica (DO) de cada amostra foi lida usando o leitor de ELISA com um filtro de 450 nm. As médias das DOs dos controles positivo e negativo e as DOs de cada soro testado foram calculados. O critério de validação da técnica utilizou um valor mínimo de 0,350 para a DO do controle positivo e a razão entre a DO do controle positivo pela DO do controle negativo com valor igual ou maior a três.

Na interpretação dos resultados, o percentual de positividade (S/P%) foi calculado pela fórmula:

$$S/P\% = (DO \text{ da amostra teste} / DO \text{ do soro controle positivo}) \times 100$$

Onde considerou negativa a amostra com $S/P\% \leq 90\%$, suspeita a amostra com $S/P\%$ entre 90% e 100% e positiva a amostra com $S/P\% \geq 100\%$.

3.7. Antígenos

Para as provas de SAL e 2-ME foi usado antígeno padrão comercial³, na FC foi usado antígeno padrão produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo, e na AAT antígeno padrão comercial importado⁴.

3.8. Etapas de avaliação de técnicas sorológicas

3.8.1. Avaliação comparativa dos testes de AAT, 2-ME com SAL, FC e ELISA ID em rebanho adulto não vacinado e em rebanho adulto vacinado com dose padrão

Nesta etapa foram colhidas amostras de soro de 207 animais não vacinados e de 96 fêmeas que haviam sido vacinadas com três a oito meses de vida, com dose padrão da vacina produzida com a amostra 19 de *B. abortus*, e foram então realizados os testes supracitados para avaliação.

³ Antígeno para diagnóstico da brucelose – Prova lenta em tubo – TECPAR, lote de partida 002./01

⁴ Antigène brucellique-Rose Bengale – Institut Pourquier, lote de partida 278

3.8.2. Avaliação comparativa dos testes de AAT, 2-ME com SAL, FC E ELISA ID em rebanho adulto vacinado com dose reduzida

Obtidos os resultados da etapa anterior, dos testes efetuados nos animais não vacinados, que obtiveram, nas cinco provas, resultados negativos para a doença, foi feito o diagnóstico de gestação por palpação retal. Separados 62 animais com idade de gestação aproximada de quatro meses, estes foram vacinados com a amostra B19 em dose reduzida. Três meses após a vacinação, estes animais sofreram outra colheita de amostras de soro para nova avaliação, usando as cinco técnicas propostas.

3.9. Determinação da sensibilidade e especificidade relativas

A sensibilidade e a especificidade relativas das provas de AAT, SAL com 2-ME e ELISA ID foram calculadas em relação aos resultados obtidos na prova de FC, tida como referência por ser considerada prova confirmatória pelo ‘Regulamento Técnico do PNCEBT’ (BRASIL, 2001). A FC é uma técnica fidedigna, de alta especificidade e que apresenta melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade (NICOLETTI et al., 1978a; SAMARTINO et al., 2000; BRASIL, 2001; MOLNÁR et al., 2002). Os cálculos correspondem às fórmulas abaixo (SÁNCHEZ-VIZCAÍNO & ALVAREZ, 1987; MADRUGA et al., 2001).

		Resultado do teste de referência	
		+	-
Resultado do teste estudado	+	A	C
	-	B	D

$$\text{Sensibilidade} = [A \div (A + B)] \times 100$$

$$\text{Especificidade} = [D \div (D + C)] \times 100$$

Para o cálculo da sensibilidade e especificidade relativas dos resultados obtidos pela SAL com o 2-ME, caso ocorressem resultados inconclusivos, seriam consideradas três circunstâncias: a inclusão dos resultados suspeitos no grupo dos positivos, no grupo dos negativos e sua exclusão da amostra.

3.10. Análise estatística

O teste de Qui-quadrado (X^2) foi utilizado para verificar se houve diferença estatística entre os resultados de sensibilidade e especificidade relativas das provas imunológicas utilizadas nos rebanhos da primeira etapa do estudo, tomando como referência o FC. Já no rebanho da segunda etapa, o teste de X^2 foi utilizado para verificar a frequência de resultados positivos obtidos pelos diferentes métodos sorológicos utilizados no experimento (CENTENO, 2001).

4. RESULTADO

Os resultados dos testes imunológicos feitos no rebanho de 207 animais não vacinados contra a brucelose, estão demonstrados em tabelas. A Tabela 1 mostra o número de indivíduos reagentes positivos e negativos diagnosticados pelas provas de antígeno acidificado tamponado (AAT), fixação de complemento (FC), e o cálculo da relação das especificidade e sensibilidade da AAT para a FC. Da mesma forma, a Tabela 2 mostra os resultados das provas de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL) em relação à FC, e a Tabela 3 da prova de ELISA ID em relação à FC. A prevalência da brucelose neste rebanho é de 3,38%, baseadas nos resultados da prova de FC.

Tabela 1 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado

AAT	FC		Total
	+	-	
+	7	9	16
-	0	191	191
Total	7	200	207

S = 100 %

E = 95,5 %

Tabela 2 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado

2-ME com SAL	FC		Total
	+	-	
+	7	12	19
-	0	188	188
Total	7	200	207

S = 100 %

E = 94 %

Tabela 3 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado

ELISA ID	FC		Total
	+	-	
+	7	38	45
-	0	162	162
Total	7	200	207

S = 100 %

E = 81 %

Os métodos de diagnóstico do AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID apresentaram a mesma sensibilidade em relação aos resultados obtidos pela reação de FC, não sendo necessária a análise estatística dos resultados daqueles, pois se não houve diferença numérica não haverá diferença estatística. Já quanto à especificidade relativa dos métodos em questão houve diferenças estatísticas, utilizando o teste X^2 , que estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise estatística dos resultados das especificidades relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado

Método	Especificidade relativa (%)	*
AAT	95,5	a
2-ME com SAL	94	a
ELISA ID	81	b

*especificidades seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste χ^2 no nível de 5%.

Em relação ao rebanho de 96 animais vacinados, com dose padrão da vacina produzida com a amostra B19 de *B. abortus*, a Tabela 5 mostra o número de indivíduos reagentes positivos e negativos diagnosticados pelas provas de AAT, FC, e o cálculo da relação das especificidade e sensibilidade da AAT para a FC. Da mesma forma, a Tabela 6 mostra os resultados das provas de 2-ME com SAL em relação à FC, e a Tabela 7 da prova de ELISA ID em relação à FC. Com base nos resultados obtidos na FC, neste rebanho, a prevalência da doença é de 1,04%.

Tabela 5 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão

AAT	FC		Total
	+	-	
+	1	1	2
-	0	94	94
Total	1	95	96

S = 100 %

E = 98,9 %

Tabela 6 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão

2-ME com SAL	FC		Total
	+	-	
+	1	5	6
-	0	90	90
Total	1	95	96

S = 100 %

E = 94,7 %

Tabela 7 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão

ELISA ID	FC		Total
	+	-	
+	1	79	80
-	0	16	16
Total	1	95	96

S = 100 %

E = 16,8 %

Os métodos de diagnóstico do AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID apresentaram a mesma sensibilidade em relação aos resultados obtidos pela reação de FC, não sendo necessária a análise estatística dos resultados daqueles, pois se não houve diferença numérica, não haverá diferença estatística. Já quanto à especificidade relativa dos métodos em questão, houve diferenças estatísticas, utilizando o teste χ^2 , que estão demonstradas na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise estatística dos resultados das especificidades relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose padrão

Método	Especificidade relativa (%)	*
AAT	98,9	a
SAL com 2-ME	94,7	a
ELISA ID	16,8	b

* especificidades seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste χ^2 no nível de 5%.

No rebanho de 62 animais vacinados, com dose reduzida da vacina amostra B19, a Tabela 9 mostra o número de indivíduos reagentes positivos e negativos diagnosticados pelas provas de AAT, FC, e o cálculo da relação das especificidade e sensibilidade da AAT para a FC. Da mesma forma, a Tabela 10 mostra os resultados das provas de 2-ME com SAL em relação à FC, e a Tabela 11 da prova de ELISA ID em relação à FC.

Tabela 9 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose reduzida

AAT	FC		Total
	+	-	
+	29	13	42
-	0	20	20
Total	29	33	62

S = 100 %

E = 60,6 %

Tabela 10 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose reduzida

2-ME com SAL	FC		Total
	+	-	
+	29	25	54
-	0	8	8
Total	29	33	62

S = 100 %

E = 24,4 %

Tabela 11 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas da prova de ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculadas com base nos resultados da reação de fixação de complemento (FC), em rebanho vacinado com dose reduzida

ELISA ID	FC		Total
	+	-	
+	29	33	62
-	0	0	0
Total	29	33	62

S = 100 %

E = 0 %

Todas as técnicas de diagnóstico de brucelose, utilizadas em rebanho vacinado com dose reduzida da vacina B19, apresentaram uma alta taxa de resultados positivos que não pode ser explicada pela prevalência da brucelose na população estudada, portanto, assumiu-se que os resultados positivos encontrados são um reflexo da falta de

especificidade dos métodos em situações de titulação de anticorpos causada por reação vacinal. A Tabela 12 mostra o número de indivíduos reagentes positivos e negativos nas provas de FC, AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID.

Em função do exposto, partiu-se para a comparação de frequência de resultados positivos obtidos pelos diferentes métodos, considerando que os métodos que apresentaram frequências mais baixas são aqueles mais específicos e menos susceptíveis a erros de diagnóstico decorrentes da vacinação. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos desta análise estatística, onde utilizou-se o teste χ^2 ao nível de 5%.

Tabela 12 – Números de reagentes positivos e negativos obtidos pelos métodos de fixação de complemento (FC), antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), em rebanho vacinado com dose reduzida

Resultados	Método			
	FC	AAT	2-ME com SAL	ELISA ID
Nº positivos (%)	29 (46,77)	42 (67,74)	54 (87,09)	62 (100)
Nº negativos (%)	33 (53,23)	20 (32,26)	8 (12,91)	0 (0)

Tabela 13 – Análise estatística das frequências de resultados positivos dos métodos de diagnóstico de fixação de complemento (FC), antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), em rebanho vacinado com dose reduzida

Método	Porcentagem de positivo	*
FC	46,77	a
AAT	67,74	b
2-ME com SAL	87,09	c
ELISA ID	100	d

* porcentagens seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste χ^2 no nível de 5%.

Os resultados obtidos de sensibilidade e especificidade relativas pelas provas de AAT, 2ME com SAL e ELISA ID, com base nos resultados da técnica de FC, nos grupos de animais: não vacinados, vacinados com dose padrão e vacinados com dose reduzida da vacina B 19, estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL) e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho: não vacinado (NV), vacinado com dose padrão (DP) e vacinado com dose reduzida (DR)

MÉTODO	NV		DP		DR	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
AAT	100	95,5	100	98,9	100	60,6
2-ME com SAL	100	94	100	94,7	100	24,4
ELISA ID	100	81	100	16,8	100	0

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do desempenho das provas de antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta, fixação de complemento e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática

No presente trabalho, a prova de FC foi escolhida como referência para a avaliação do ELISA ID, e para a comparação com outras técnicas (AAT e 2-ME com SAL), pois, de acordo com alguns autores (NICOLETTI et al., 1978a; SAMARTINO et al., 2000; BRASIL, 2001; MOLNÁR et al., 2002) a FC é uma prova bastante fidedigna, de alta especificidade, que apresenta melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, o que permite definir títulos sorológicos controversos pelas técnicas convencionais, tendo se tornado, em diversos países, o teste de diagnóstico definitivo. Mathias et al. (2001) consideram que em rebanho vacinado com dose padrão, o FC é mais indicado como confirmatório. A FC é considerada prova de referência recomendada pelo OIE para o trânsito internacional de animais (BRASIL, 2003).

No rebanho experimental, não vacinado contra a brucelose, a prevalência da doença foi de 3,38%, estando abaixo da média nacional, que é de 4,9%, obtida na última pesquisa epidemiológica realizada em 1975 (BRASIL, 2003), as provas de AAT, SAL com 2-ME e ELISA ID, todas apresentaram sensibilidade de 100% em relação ao FC, porém, as especificidades relativas foram de 95,5% para o AAT, de 94% para o 2-ME com SAL, e de 81% para o ELISA ID.

Com a análise dos resultados da avaliação das especificidades das provas pelo teste X^2 sugere-se que a técnica de ELISA ID estudada não deva ser utilizada como prova de diagnóstico confirmatório definitivo de brucelose em rebanho não vacinado, não controlado para a brucelose, pois a alta sensibilidade e a baixa especificidade apresentadas possibilitam o diagnóstico falso-positivo. Tal recomendação também pode ser lida no trabalho de Kerby et al. (1997) que, em população positiva, de status vacinal desconhecido, observaram mais reações positivas no ELISA do que no FC, um resultado que mostrou maior sensibilidade, porém, menor especificidade relativa do ELISA.

As provas de AAT e SAL com 2-ME apresentaram resultados semelhantes, sendo que o AAT foi a que melhor se aproximou ao FC. Estes achados demonstram ser o AAT, dentre as técnicas estudadas, a prova mais equilibrada, levando em consideração os parâmetros de sensibilidade e especificidade relativas ao FC, e também a prova de eleição para triagem de rebanhos nestas condições, por se tratar de uma técnica barata, de fácil execução e de resultados rápidos. Resultados bastante semelhantes foram alcançados por Costa et al. (1999) que observaram concordância absoluta do AAT com o FC, porém, contrários aos observados por outros autores a quem fazem referência, que definiram o AAT como técnica de baixa especificidade.

Os resultados indicam que o teste ELISA ID estudado pode ser utilizado como prova de triagem em rebanho não vacinado, porém sem apresentar nenhuma vantagem sobre a técnica de AAT, uma vez que tem menor equilíbrio, trata-se de uma prova mais complexa que, ao contrário do AAT, não pode ser realizada em campo, e como sua aquisição fica sujeita a variações de câmbio de moedas estrangeiras, sua importação torna o processo mais oneroso para o programa e para os produtores.

Na avaliação das provas de diagnóstico feitas em animais, com idade superior aos 24 meses, que foram vacinados com a dose padrão da vacina B19 entre os três e oito meses de vida, as provas de AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID apresentaram sensibilidade de 100% em relação ao FC, porém as especificidades relativas foram de 98,9% para o AAT, de 94,7 % para o SAL com 2-ME e de 16,8% para o ELISA ID. Neste rebanho, a prevalência da brucelose foi de 1,04%, também menor à média nacional de prevalência levantada em 1975 (BRASIL, 2003).

Tais resultados confirmam ser o AAT a prova sorológica mais equilibrada, dentre as preconizadas pelo PNCEBT, em relação ao FC, entretanto, o SAL com 2-ME também alcançaram resultados similares. Quanto ao ELISA ID estudado, a baixa especificidade alcançada aumenta, e muito, o risco de diagnósticos falso-positivos em rebanhos vacinados com dose padrão, merecendo as mesmas considerações feitas à técnica em rebanho não vacinado.

Savari et al. apud Molnár et al. (1997), em 1992, trabalhando com rebanho livre da infecção, outro conhecidamente infectado e outro vacinado com dose padrão da vacina B19, observaram que a sensibilidade do ELISA em comparação ao 2-ME e FC foi maior, e que a especificidade foi a mesma. Kerby et al. (1997) também alcançaram boa especificidade com o ELISA em rebanho vacinado, dose padrão, resultado não comum a

outros autores a quem fazem referência. Tal discrepância entre resultados talvez seja ocasionada por diferenças entre kits e vacinas comerciais utilizadas.

Vacas adultas, em início de gestação, que obtiveram resultados negativos pelas provas de AAT, 2-ME com SAL, FC e ELISA ID, conhecidamente negativas para brucelose, foram vacinadas com dose reduzida da vacina B19, contendo aproximadamente 6×10^8 bactérias viáveis por dose, considerada por Alton et al. (1984) capaz de imunizar vacas prenhes em início de gestação.

Três meses após a vacinação, as sensibilidades alcançadas pelas provas de AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID em relação ao FC foram de 100%, e as especificidades relativas de 60,6% para o AAT, 24,4 % para o SAL com 2-ME e de 0% para o ELISA ID, sendo que todas as provas detectaram altas porcentagens de animais reagentes positivos. Sobretudo, a alta taxa de resultados positivos (46,77%) obtidos pelo FC não pode ser explicada pela prevalência da brucelose na população, visto que o rebanho era totalmente negativo antes da vacinação. O surgimento de anticorpos se deve, provavelmente, pela reação vacinal. Devido a este achado, os resultados positivos foram considerados um reflexo da falta de especificidade dos métodos de diagnóstico estudados.

Durante os três meses que se seguiram após a vacinação, apenas uma vaca abortou. Amostras de placenta e de secreção vaginal, colhidas um dia após o aborto, foram enviadas ao Instituto Biológico de São Paulo e, pela técnica de PCR, não foi detectada *Brucella* spp.. De acordo com o 'Manual Técnico do PNCEBT' (BRASIL, 2003) a PCR permite a identificação da *B. abortus* em material de aborto e nas secreções da vaca após o parto ou aborto, sendo uma prova de diagnóstico direto considerada de alta confiabilidade.

A prova de fixação de complemento não foi utilizada como técnica de referência, e partiu-se para a comparação de frequência, através do teste do χ^2 , dos resultados positivos obtidos pelos diferentes métodos de diagnóstico, considerando que os métodos que apresentaram frequências mais baixas são aqueles mais específicos e menos susceptíveis a erros de diagnóstico decorrentes da vacinação. Nenhum teste apresentou resultados semelhantes a um outro, e as porcentagens de positivos foram de 46,77% para o FC, de 67,74% para o AAT, de 87,09% para o SAL com 2-ME e de 100% para o ELISA ID, que os coloca, respectivamente, na ordem decrescente de especificidade, sendo o FC o menos susceptível e a técnica de ELISA ID estudada, a mais susceptível a erros de diagnóstico em bovinos vacinados em idade adulta.

Sutherland (1985) já sugeria que o ELISA ID fosse de pequena valia na detecção de animais infectados nos primeiros estágios de um programa de erradicação da doença, quando os bovinos geralmente são vacinados com o intuito de prevenir o aborto. Contudo, devido à alta sensibilidade demonstrada pelo ELISA em diversos estudos, quando comparado a métodos sorológicos convencionais, parece certo sugerir que seja utilizado em estágios avançados de um programa de erradicação, quando a vacinação cessar, sendo a técnica útil como teste de triagem ou suplementar para a identificação de animais suspeitos que falham em responder ao FC. A presença de qualquer animal vacinado na população positiva reduz a especificidade do ELISA e resulta em reações falso-positivas. Esta situação se reforça quando os animais são vacinados em idade superior aos oito meses (KERBY et al., 1997). Este trabalho pôde comprovar esta observação; de fato a especificidade do ELISA diminuiu de rebanho não vacinado para rebanho vacinado respeitando os padrões previstos no PNCEBT, e diminuiu ainda mais em rebanho vacinado, adulto, com dose reduzida.

Em todos os rebanhos estudados, o SAL e o 2-ME não apresentaram vantagens no diagnóstico sobre os outros testes usados, que são preconizados pelo PNCEBT, resultado também observado por Nicoletti et al. (1978b). A utilização dessas técnicas ainda é muito necessária, visto que poucos laboratórios brasileiros estão aptos a realizar a prova de FC. A falta do 2-ME e SAL, em regiões que não têm acesso aos laboratórios capazes de realizar o FC, inviabilizaria o andamento do programa, pois não teriam um teste de diagnóstico confirmatório disponível.

Um resultado negativo revelado pela reação de fixação de complemento, em um soro com títulos elevados nas provas imunoenzimáticas, poderia estar associado a um aumento na proporção de IgG2 em relação a IgG1, fato este que pode ocorrer por ocasião do parto, quando há diminuição na concentração de IgG1 no soro sangüíneo, pois estes anticorpos são transferidos para a secreção mamária, ou então devido à ciclicidade resultante dos mecanismos de controle da produção de anticorpos (Mathias et al., 1995). As vacas utilizadas no presente experimento, ou estavam vazias com suas crias recém desmamadas, ou estavam prenhes com idade de gestação não superior a sete meses, em geral quatro meses, o que não justifica a ocorrência do fato relatado pelo autor citado.

Classificar resultados de testes como negativos, suspeitos e positivos ao contrário de apenas positivos e negativos, apenas cria um dilema na avaliação da validação de técnicas sorológicas. A validação das provas é determinada por sua sensibilidade e especificidade. Agrupando os resultados suspeitos aos negativos, a sensibilidade do teste será menor e a especificidade maior, mas agrupando os resultados suspeitos aos resultados

positivos, a sensibilidade será maior e a especificidade menor. Muitos fatores como a prevalência da doença, o custo das técnicas, e ramificações de resultados falso positivos ou falso negativos, irá ditar quando é melhor maximizar a sensibilidade ou a especificidade (NICOLETTI & TANYA, 1993). No presente trabalho não ocorreram resultados inconclusivos, o que é comum quando se avalia um diagnóstico baseado nos resultados de mais de uma prova em conjunto, como é o caso do 2-ME com SAL. Um diagnóstico inconclusivo só vem confirmar um conhecimento que já é notório, de que não existe técnica de diagnóstico sorológico totalmente confiável.

É muito difícil comparar a sensibilidade e especificidade de testes entre trabalhos realizados devido às diferenças dos procedimentos, reagentes e critérios de classificação (NICOLETTI & TANYA, 1993). O ‘complexo brucelose’ não é de fácil entendimento e, especialmente, de resolver. No Brasil pouco se conhece sobre a real situação desta zoonose, seus problemas e possibilidades de diagnóstico (MOLNÁR et al., 1997).

Em situações reais, o verdadeiro estado sanitário do animal (infectado ou não) não é conhecido, mas sim o resultado do teste. Por esta razão, é importante saber a proporção de animais com resultado positivo que realmente estão infectados (valor preditivo positivo – VPP), e a proporção de animais com resultado negativo que não estão infectados (valor preditivo negativo – VPN). Estes valores são determinados pelos valores de sensibilidade e especificidade de teste utilizado e pela prevalência da doença na população submetida ao diagnóstico, ou seja, variam em função da situação epidemiológica. Quando a prevalência da enfermidade é inferior a 10%, o VPN de um teste de sensibilidade apenas moderada (80%) é muito alto, e tende a aumentar na medida que a prevalência da doença diminui. O VPP segue trajetória inversa, sendo muito baixo quando a prevalência é inferior a 10%, diminuindo na medida que a prevalência da doença também diminui. Em consequência, em programa de erradicação, baseado em teste e sacrifício de animais, a proporção de indivíduos com reações falso-positivas que são sacrificados aumenta à medida que a campanha avança e a prevalência da enfermidade diminui. Portanto, na medida que a prevalência da doença diminui, cresce a necessidade de reduzir a proporção de reações falso-positivas, o que é conseguido por ganhos em especificidade dos métodos diagnósticos (BRASIL, 2003).

Portanto, para se avaliar melhor o uso da técnica de ELISA ID no PNCEBT, assim como de qualquer nova prova de diagnóstico sorológico para a brucelose, nesse estágio inicial do programa, mais estudos deveriam ser feitos em diferentes rebanhos e regiões, pois sabe-se que diferentes regiões brasileiras adotam explorações da bovinocultura distintas (leite

/ carne; extensiva / intensiva), e conseqüentemente apresentam diferentes condições sanitárias e prevalências.

A proporção de falsos-positivos é muito influenciada pela especificidade da prova usada, qualquer que seja a prevalência da doença. Para valores de prevalência muito baixos, mesmo um teste de boa especificidade (99%) resulta em alta proporção de resultados falso-positivos. Assim sendo, quando o diagnóstico é realizado em populações de baixa prevalência, deve ser usado um teste de especificidade próxima a 100%. Se não houver uma única técnica com essa característica, poderão ser usados duas provas em seqüência: a primeira de triagem, com boa sensibilidade, para detectar animais reagentes, os quais são submetidos a novo teste para diagnóstico confirmatório, que deve ter alta especificidade. A realização de técnicas em seqüência, para o diagnóstico confirmatório dos indivíduos positivos em teste de triagem, aumenta a especificidade do procedimento diagnóstico e diminui o número de falsos-positivos (BRASIL, 2003).

Nas técnicas indiretas quantitativas existe sempre um ponto de corte, como um determinado título de anticorpo, a partir do qual o teste é considerado positivo. Os valores de sensibilidade e especificidade de uma determinada prova dependem do ponto de corte e normalmente estão inversamente relacionados. Se o ponto de corte do teste for modificado para aumentar a sensibilidade, a especificidade diminuirá. De maneira inversa, se o ponto de corte da técnica de diagnóstico for modificado para elevar a especificidade, haverá perda da sensibilidade (BRASIL, 2003).

Samartino et al. (2000) citam que nas décadas de 80 e 90 diversos países começaram a investigar e aplicar diferentes tipos de ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da brucelose animal, chegando a um kit de ELISA competitivo (C) que se diferenciou em cada país pelo valor de corte, adotado de acordo com a condição epidemiológica de cada um. Por exemplo, no Canadá, onde não se vacina, o valor de corte adotado foi de 30%, no Chile, onde se utiliza a vacina RB51 de *B. abortus*, que não induz títulos sorológicos detectáveis pelas técnicas convencionais, foi de 35%, e na Argentina se estabeleceu 40% de inibição. Posteriormente, foi desenvolvida uma técnica de fluorescência polarizada, com sensibilidade e especificidade similares ao ELISA C, sendo que também foi adotado, diferentes valores de corte, em cada país, de acordo com a situação epidemiológica.

Uma melhor padronização da técnica de ELISA ID usada, alterando o ponto de corte, poderia reverter os problemas encontrados no presente estudo quanto a falta de especificidade da técnica, o que poderia mudar o enfoque de sua utilização na atual situação sanitária em que o Brasil se encontra. O kit ELISA usado foi produzido na França; este país já

se encontra em fase de erradicação da brucelose, diferente do Brasil que está no início do processo. Uma padronização do ELISA ID visando um aumento da especificidade poderia viabilizar seu uso como prova confirmatória. O ELISA não apresenta os inconvenientes da 2-ME, de ser demorada e trabalhosa, além de utilizar produto tóxico para a saúde humana, e nem os problemas da FC, que é muito complexa, cara, e passível a erros de execução.

A prova de FC pode se tornar mais barata, pela produção de soluções no próprio laboratório e pela realização de estudos para uma padronização mais simplificada, o que poderia facilitar seu uso em rebanhos inteiros. Mesmo assim, ainda seria uma técnica muito complexa, com diferenças de padronização entre os laboratórios que a executam, pois dependendo dos equipamentos e facilidades que possuem, podem modificá-la em muitos passos.

Sobretudo, o ELISA ID estudado demonstrou, devido a sua alta sensibilidade, ser uma técnica passível de uso como técnica de triagem, parecendo ser mais interessante para fases mais avançadas do programa de controle, quando a vacinação não for mais utilizada e/ou não mais interferir no diagnóstico sorológico, fases de baixa prevalência da doença. Sua produção no Brasil pode reduzir custos de importação, além de que uma mecanização pode reduzir o tempo de leitura e possíveis erros de origem humana na execução.

Em função dos conhecimentos já adquiridos a respeito da brucelose em bovinos, que já vem sendo discutida há muito e ainda está longe de esgotar suas polêmicas e necessidades de maiores estudos, o PNCEBT parece estar adotando medidas de controle concisas quanto ao uso do diagnóstico sorológico. Pesquisas em novas técnicas de diagnóstico sorológico certamente irão otimizar o programa.

5.2. Avaliação do uso de uma dose reduzida da vacina produzida com a amostra B19 de *Brucella abortus*, em rebanho bovino negativo para a brucelose

Com o intuito de avaliar provas imunológicas de diagnóstico em rebanho vacinado adulto, vacas negativas para a brucelose pelas provas de AAT, 2-ME com SAL, FC e ELISA ID, todas em idade de gestação próxima aos quatro meses, foram vacinadas com dose reduzida da vacina B19. Pela contagem bacteriana realizada em amostras da mesma partida utilizada na vacinação, estimou-se em aproximadamente 6×10^8 o número de bactérias viáveis contidas na dose usada, o que corresponde ao dobro da dose mínima considerada por Alton et al. (1984) capaz de imunizar vacas prenhes em início de gestação.

Os resultados obtidos, após três meses da vacinação, são de que todas as técnicas sorológicas usadas detectaram animais soro-positivos em rebanho, conhecidamente, negativo: a técnica de FC detectou 46,77% dos animais como positivos, a AAT 67,74%, a 2-ME com SAL 87,09% e a ELISA ID 100%. As titulações encontradas se devem, provavelmente, à reação vacinal residual dos animais que podem ser considerados falso-positivos, já que as altas taxas de positivos não podem ser explicadas pela prevalência da doença no rebanho estudado.

Os resultados alcançados de interferência no diagnóstico sorológico, pelo uso de vacina B19 em animais adultos, não estão de acordo com os obtidos por Ferrari (2001) que, utilizando a mesma dose reduzida em rebanho adulto, concluiu que esta técnica vacinal não interfere no diagnóstico sorológico feito por meio das técnicas de soroaglutinação rápida, SAL, 2-ME, AAT e FC, realizados nos períodos de noventa, duzentos e dez e trezentos e vinte dias após a vacinação.

Existem, de fato, dados que oferecem embasamento científico suficiente para o PNCEBT adotar o uso de dose reduzida em animais adultos de rebanhos problemas, especialmente, quanto à capacidade de proteção contra o aborto. Pelo presente estudo, o método vacinal representa riscos de perdas econômicas ao produtor, pois vacas vacinadas adultas que, após a vacinação, apresentassem reações positivas, diga-se falso-positivas, deveriam ser eliminadas. Porém, o período de três meses estudados é pouco para uma avaliação efetiva do uso de dose reduzida em animais adultos sobre o diagnóstico sorológico. É bem provável que nova avaliação sorológica do mesmo rebanho, após seis e/ou doze meses da vacinação, mostraria uma menor interferência no diagnóstico ou, talvez, a não interferência.

A dose reduzida poderia ser liberada para uso em rebanhos nas seguintes condições: 1) cronicamente infectados; 2) com infecção aguda, em que há aborto e doença com rápida disseminação, com alto potencial de exposição no início do curso do surto; e 3) não infectados, mas com alto risco de infecção. A permanência de vacas não vacinadas em rebanhos problemas poderia acarretar em maiores perdas econômicas por aborto.

Este método vacinal poderia ser usado em fêmeas negativas não vacinadas, com idade acima dos oito meses, após estudo sorológico de todo o rebanho. Este estudo do rebanho pode ser realizado em um período pré-determinado, conforme está previsto pelo ‘manual técnico do regulamento do PNCEBT’ (BRASIL, 2003) para propriedades que queiram adquirir certificado de livres da brucelose, e só ao final deste estudo, com, no mínimo, três avaliações sorológicas consecutivas, os animais poderiam ser considerados negativos, para então serem vacinados com a dose reduzida.

Os animais vacinados com a dose reduzida deveriam permanecer isolados do restante, principalmente, dos recém introduzidos na propriedade, até a confirmação do estado negativo de todos após um ano da vacinação, o que poderia evitar possíveis contaminações entre estes grupos. Deveriam, ainda, ser adotadas as medidas profilático-sanitárias de controle já previstas no manual técnico, como a vacinação de bezerras, a realização de testes sorológicos periódicos e a eliminação dos reagentes positivos. Nestes rebanhos, estas ações em conjunto podem controlar a doença, reduzindo a prevalência e as perdas econômicas dos proprietários, pois poderia impedir o aborto decorrente de infecção por *B. abortus*.

Outra alternativa de vacinação de animais adultos é o uso de vacinas que não interfiram no diagnóstico sorológico, a exemplo da vacina viva atenuada produzida a partir da cepa RB51 de *B. abortus*, que oferece proteção similar à B19 e não induz resposta imunológica humoral, desta forma não interferindo no diagnóstico sorológico.

Deste trabalho recomenda-se que, para erradicação da brucelose do rebanho bovino brasileiro, estudos devem atualizar o PNCEBT que, caso não esteja atual e eficiente, poderá repetir o desempenho do último programa que, em 25 anos de atuação, não surtiu os resultados esperados no controle da brucelose.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, nas condições do presente trabalho, permitem as seguintes conclusões:

- i) dentre as técnicas de diagnóstico sorológico avaliadas, a de antígeno acidificado tamponado demonstrou melhores condições para ser usada como prova de triagem;
- ii) a prova de ELISA ID mostrou ser um teste de alta sensibilidade;
- iii) nenhuma das técnicas de diagnóstico estudadas apresentou especificidade adequada para uso em bovinos vacinados, em idade adulta, com dose reduzida, no período de três meses após vacinação;
- iv) o emprego de uma dose reduzida da vacina produzida com a amostra 19 da *Brucella abortus* interfere no diagnóstico sorológico do rebanho;
- v) a prova de ELISA ID não apresentou condições de ser usada para o diagnóstico confirmatório, necessitando maiores estudos.

7. REFERÊNCIAS*

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; PIETZ, D.E. *Las tecnicas de laboratorio en la brucelosis*: 2.ed. Ginebra: Organizacion Mundial de la Salud, 1976. 175p.

ALTON, G. G.; CORNER, L. A.; PLACKETT, P. Vaccination against bovine brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, Basel, v.56, p.643-647, 1984.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. *Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle da Brucelose e da Tuberculose Animal*. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. *Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT*: versão preliminar. Brasília, 2003.

CENTENO, A. J. *Curso de estatística aplicado à biologia*: 2.ed. Goiânia: Editora da Universidade Federal de Goiás, 2001. 234p.

CONFER, A. W.; HALL, S. M.; FAULKNER, C. B.; ESPE, B. H.; DEYOE, B. L.; MORTON, R. J.; SMITH, R. A. Effect of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v. 10, p.561-575, 1985.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023*: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

- CORNER, L. A.; ALTON, G. G. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res. Vet. Sci.*, London, v.31, p.342-344, 1981.
- COSTA, G. M.; ABREU, V. L. V.; LOBATO, F. C. F.; SILVA, J. A.; MARTINS, N. E. Avaliação do teste de imunodifusão mediante emprego do polissacarídeo “O” no diagnóstico da brucelose bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.51, n.4, p.317-322, 1999.
- CRAWFORD, R. P.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A.; TEMPLETOM, J. W.; WILLIAMS, J. D. Effect of stage of gestation on efficacy of *Brucella abortus* strain-19 vaccination in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v.52, n.11, p.1848-1851, 1991.
- FERRARI, C. I. L. *Avaliação do uso de uma dose reduzida da vacina produzida com a amostra B19 da Brucella abortus em rebanho bovino naturalmente infectado*. 2001. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- FERRAZ, I. B. F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.23, n.4, p.504-508, 1999.
- GUARINO, A.; FUSCO, G.; DI MATTEO, A.; URBANI, G.; CONDOLEO, R.; SERPE, L.; TITTARELLI, M.; DI VENTURA, M.; GALLO, P. Indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. *Vet. Rec.*, London, v.149, n.3, p.88-90, 2001.
- KERBY, P. J.; QUIROGA, J. L.; MCGRANE, J. J.; STAGG, D. A. Field evaluation of an indirect ELISA for detection of brucellosis in lowland Bolivia. *Trop. Anim. Health Prod.*, Edinburgh, v.29, p.65-72, 1997.
- KUCHEMBUCK, M. R. G. Brucelose. *Biológico*, São Paulo, v.59, n.1, p.33-35, 1997.
-

- LOPES, C. F. A.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E. Avaliação soroepidemiológica da brucelose em animais e humanos procedentes da zona bragantina no Estado do Pará – Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.23, n.3, p.429-431, 1999.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F.R; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em medicina veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- MATHIAS, L. A.; MACMILLAN, A. P.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, E. V. Comparação entre a reação de fixação de complemento, teste imunoenzimático indireto e teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos procedentes de rebanhos com histórico da enfermidade. *ARS Vet.*, Jaboticabal, v.11, n.1, p.47-55, 1995.
- MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; CHEN, A. A.; GIRIO, R. J. S.; NETO, W. V. 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 B 19. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v.21, n.4, p.139-142, 2001.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; AGOTTANI, J. V. B.; MARCOS Jr., G. Imunodifusão em gel de ágar com polissacarídeos de membrana de *Brucella abortus* 1119-3 no diagnóstico da brucelose bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.51, n.5, p.433-437, 1999.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A. J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v.37, n.5, 2000.
- MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TÚRY, E.; SOUZA, J. S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. *Rev. Bras. Med. Vet.*, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.157-162, 1997.
- MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. L. T.; SOUZA, J. S.; VALE, W. G. Ocorrência de brucelose bovina no Estado do Pará confirmada por métodos sorológicos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, Rio de Janeiro, v.22, n.3, p.117-121, 2000.

- MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E. C.; DIAS, H. L. T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v.22, n.2, 2002.
- NICOLETTI, P.; JONES, L. M.; BERMAN, D. T. Adult vaccination with standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in a dairy herd infected with brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.173, n.2, p.1445-1449, 1978a.
- NICOLETTI, P.; JONES, L. M.; BERMAN, D. T. Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.173, n.11, p.1450-1456, 1978b.
- NICOLETTI, P. Vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19 administered by differing routes and doses. *Vaccine*, London, v.2, p.133-135, 1984.
- NICOLETTI, P.; TANYA, V. Comparison of enzyme-labeled immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standard serologic methods and bacteriologic culture for detection of *Brucella* sp-infected cows in herds with brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.202, n.12, p.1975-1977, 1993.
- PALMQUIST, O. K. Contribuição ao conhecimento da incidência da brucelose no Estado do Paraná (Brasil). *Arq. Biol. Tecnol.*, v.7, p.3-8, 1952.
- POESTER, F. P.; RAMOS, E. T.; BENFICA, A. C. Dificuldades na interpretação de algumas provas sorológicas em bovinos vacinados contra brucelose. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Desiderio Finamour*, Porto Alegre, v.5, p.53-58, 1978.
- POESTER, F. P.; RAMOS, E. T.; GOMES, M. J. P.; CHIMINAZZO, C.; SCHURIG, G. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v.37, n.1, 2000.
- PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. III. Serological responses and immunity in the pregnant cow. *Ann. Rech. Vet.*, Paris, v.7, n.1, p.9-23, 1976.

PLOMMET, M.; PLOMMET, A. M. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. I. Protection demonstrated in guinea pigs. *Ann. Rech. Vet.*, Paris, v.6, n.4, p.345-356, 1975.

PLOMMET, M.; PLOMMET, A. M. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. II. Determination of the minimum dose leading to colonization of the regional lymph nodes of cattle. *Ann. Rech. Vet.*, Paris, v.7, n.1, p.1-8, 1976.

SAMARA, S. I, SEIXAS, L. F. Z., OLIVEIRA, M. A. Diagnóstico da situação sanitária do gado leiteiro em Pitangueiras – SP: II – brucelose. *ARS Vet.*, v.12, n.2, p.137-40, 1996.

SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J. Immunoassay*, New York, v.20, n.3, p.115-26, 1999.

SAMARTINO, L.; BUFFONI, L.; CONDE, S.; GREGORET, R. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. *Rev. Med. Vet.*, Buenos Aires, v.82, n.2, p.90-94, 2000.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M.; ALVAREZ, M. C. *Enzyme immunoassay techniques, ELISA, in animal and plant diseases*. 2 ed. Madri: OIE – Office International des Epizooties, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 1987. 54p. (Technical series, 7).

SANTOS, P. P. O.; ARAÚJO, R. F.; REIS, R.; MOREIRA, É. C.; FIGUEIREDO, J. B.; VIANA, F. C.; BARROS, D. G.; JARDIM, O. M. Brucelose bovina. I. Persistência da aglutinação pós-vacinal em bezerras de raças zebuínas vacinadas com amostra B-19. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.27, n.3, p.363-373, 1975.

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

SUTHERLAND, S. S. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for the detection of the specific antibody in cattle vaccinated and challenged with *Brucella abortus*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.22, n.1, p.44-47, 1985.

TEIXEIRA, A. C. P.; SOUZA, C. F. A.; SÁ, M. J. S.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, R. M. Brucelose – zoonose controlada? *Hig. Aliment.*, São Paulo, v.12, n.54, p.23-25, 1998.

VIANA, F. C.; VILLELA, L. G.; SILVA, J. A.; MENDES, J. E.; MOREIRA, E. C.; DIAS, T. D. Vacinação contra brucelose bovina com dose reduzida da vacina (amostra 19) por via conjuntival. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v.34, p.279-87, 1982.

VIANA, F. C.; CONTRERAS, R. L.; SILVA, A. S.; MAGALHÃES, J. E. P. Vacinação de bovinos adultos contra brucelose (amostra B19) com dose reduzida, por via subcutânea. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.38, n.3, p.331-341, 1986.

VIANA, F. C.; MOREIRA, E. C.; SILVA, J. A.; MODENA, C. N. Avaliação técnica da estratégia de vacinação contra brucelose bovina com dose reduzida (amostra B-19). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.43, n.3, p.191-204, 1989.