

Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19

(Serological response of vaccinated female calves against Brucella abortus)

M.G. Ribeiro¹, N. Spago², N. Fava², J. Ratti Jr.³, J. Megid⁴

¹Aluno de mestrado do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal-FMVZ-USP. Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720, Vila Lajeado
CEP 05340-000-São Paulo-SP

²Auxiliares acadêmicos-DHVSP-FMVZ-UNESP/Campus de Botucatu-SP

³Zootecnista-Fazenda Escola-FMVZ-UNESP/Campus de Botucatu-SP

⁴DHVSP-FMVZ-UNESP/Campus de Botucatu-SP

RESUMO

O perfil sorológico de 33 fêmeas bovinas vacinadas entre três e oito meses de idade, com amostra-padrão da vacina B19 (*Brucella abortus*), foi avaliado pelas provas de soroaglutinação rápida em placa (SAR), soroaglutinação lenta em tubos (SAT), antígeno acidificado (ATA) e 2-mercaptoetanol (2-ME), durante 728 dias pós-vacinais. Os títulos máximos na SAR e SAT foram obtidos entre o 14º e 42º dia após a vacinação, e no 2-ME, entre o 28º e 42º dia, verificando-se declínio do título nestas provas após este período. Aos 182 dias da vacinação, a prova de SAR apresentou cinco animais suspeitos e um positivo, enquanto na SAT, verificou-se um animal suspeito e um positivo, segundo as normas do Ministério da Agricultura (1979) para animais vacinados. No mesmo período, observou-se reações positivas em seis animais no 2-ME e em cinco no ATA. Nas provas de SAT e SAR, os animais resultaram negativos respectivamente aos 245 e 273 dias da vacinação, segundo as referidas normas para a interpretação de animais vacinados. No 2-ME e no ATA todos os animais apresentaram-se não reagentes às provas, no 308º dia após a vacinação.

Palavras-chave: Brucelose, soroaglutinação, B19, bovino

Recebido para publicação em 07 de agosto de 1996.

ABSTRACT

The serological profiles of 33 female bovines, vaccinated at three to eight months of age with the B19 standard strain of *Brucella abortus*, were studied over a period of 728 days, using the following agglutination procedures: plate agglutination, tube agglutination, rose bengal plate and mercaptoethanol test. Maximum levels of antibodies detected reached by the plate agglutination and tube agglutination tests were found between the 14th and 42nd day, and with mercaptoethanol test, between the 28th and 42nd day. Anti-*Brucella* antibodies decreased thereafter. At 182 days after vaccination, five suspected animals and one positive were detected by the plate agglutination test, while by the tube agglutination test, only one animal was suspected and another one was positive. During the same period, positive reactions were found in six animals by means of the mercaptoethanol test, and five positives by the rose bengal test. By means of tube agglutination and plate agglutination tests, the animals became serologically negative at 245 and 273 days, respectively, after the vaccination, based on the rules adopted for the vaccinated animals. Using the mercaptoethanol and rose bengal plate tests, all the animals were found to be negative at 308 days after vaccination.

Keywords: Brucellosis, agglutination test, B19, bovine

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença causada principalmente pela *Brucella abortus* de ocorrência cosmopolita, que acarreta prejuízos de ordem sanitária e econômica (Comite..., 1972).

A infecção com *Brucella* spp induz nos animais susceptíveis uma resposta imune de natureza humoral e celular (Sutherland, 1980). Em bovinos, a resposta imune humoral é geralmente similar à que ocorre em outras espécies animais (Butler & Maxwell, 1971). Caracteriza-se pela formação de imunoglobulinas (Ig), que exercem suas atividades no soro e secreções dos animais (Mac Millan, 1990). Entre estas Ig, destacam-se as classes IgM e IgG, presentes em quantidades significantes e detectáveis nos testes sorológicos (Allan et al., 1976; Joint... 1986).

Tanto no homem como nos animais, a infecção natural estimula o aparecimento simultâneo ou ligeiramente diferenciado de IgM e IgG. Durante a evolução da doença há declínio e tendência do desaparecimento dos níveis de IgM, enquanto

IgG persiste em níveis elevados. O desaparecimento de IgG significa, geralmente, eliminação da infecção (Casas Olascoaga, 1976).

Em bovinos imunizados com a amostra-padrão da vacina B19, a classe IgM apresenta concentrações máximas por volta do 13º dia após a vacinação, enquanto IgG1 é registrada em pequenas quantidades, com picos máximos entre o 28º e 42º dia pós-vacinal (Sutherland, 1980).

Devido às limitações dos procedimentos laboratoriais que se apóiam no cultivo dos microrganismos, os métodos sorológicos têm sido os mais utilizados para o diagnóstico da brucelose (Alton et al., 1976; Pietz & Cowart, 1980; Sutherland, 1980).

Os testes de soroaglutinação rápida em placa (SAR), a soroaglutinação lenta em tubos (SAT), o teste de aglutinação rápida com antígeno acidificado tamponado (ATA), o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME), do rivanol, da fixação de complemento e o "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) têm sido largamente empregados (Joint..., 1986). No entanto, Mathias & Pinto (1983) referiram que a soroaglutinação rápida em placa, a soroaglutinação lenta em tubos e o antígeno acidificado tamponado (rosa bengala) são as provas mais comumente utilizadas para o diagnóstico da brucelose bovina no Brasil.

A presença de aglutininas séricas não específicas para *B. abortus* (Corbel, 1985; Nielsen et al., 1981) e a persistência de títulos séricos induzidos por Ig pós-vacinais são fatores que podem dificultar o diagnóstico da doença (Mac Millan, 1990). Plackett et al. (1980) consideram a persistência de títulos em animais vacinados o maior problema no controle da brucelose, nos países que adotam programas de vacinação com vacinas vivas aglutinogênicas.

Em função dos títulos pós-vacinais em animais adultos (Joint..., 1986), o Ministério da Agricultura (1979) preconiza a vacinação contra brucelose bovina com a dose padrão da vacina B19 (*B. abortus*), em uma única dose, via subcutânea, nas fêmeas com três a oito meses de idade. O exame sorológico desses animais apóia-se unicamente nas provas clássicas de soroaglutinação rápida em placa e soroaglutinação lenta em tubos, e só deve ser realizado em idade igual ou superior aos 30 meses, com interpretação diferenciada para animais vacinados e não vacinados.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil sorológico de fêmeas bovinas vacinadas contra brucelose, pelas provas de soroaglutinação rápida em placa,

soroaglutinação lenta em tubos, aglutinação rápida com antígeno acidificado tamponado (rosa bengala) e prova do 2-mercaptoetanol.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 33 fêmeas da raça Nelore, com três a oito meses de idade, pertencentes à Fazenda-Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP - Campus de Botucatu, localizada no município de São Manoel-SP.

A vacina empregada constituiu-se de produto comercial, preparado com a amostra B19 (*B. abortus*), atenuada, liofilizada, com teste de unidades bacterianas viáveis dentro do padrão preconizado pela World Health Organization (Joint... 1986), verificado pelo método de contagem viável, conforme BIER (1985) e com resultado negativo no teste de esterilidade para outros agentes.

Os antígenos para as provas sorológicas foram produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR e gentilmente cedidos para a realização do experimento.

Os animais foram vacinados entre três e oito meses de idade, pela via subcutânea, de acordo com a normatização do Ministério da Agricultura Brasileiro (1979). Foram realizadas colheitas de sangue antes da vacinação (dia zero) e, posteriormente, a cada 14 dias, no 14º, 28º, 42º e 56º dias pós-vacinais. As amostras subseqüentes foram obtidas no 91º, 119º, 154º, 182º, 210º, 245º, 273º, 308º, 368º, 548º e 728º dias após a imunização, totalizando 16 colheitas.

Todos os animais foram testados indistintamente nas provas de soroaglutinação rápida em placa-SAR (Alton et al., 1976), soroaglutinação lenta em tubos-SAT (Alton et al., 1976), aglutinação rápida em placa com antígeno acidificado tamponado, corado pelo rosa bengala-ATA (Alton et al., 1975) e 2-mercaptoetanol -2-ME (Alton et al., 1976).

Não foi estabelecido um grupo-controle não vacinado em função da obrigatoriedade da vacinação no rebanho estudado.

RESULTADOS

No 14º dia pós-vacinal, todos responderam com títulos de 200 na SAR (Fig. 1), iguais ou superiores a 100 na SAT (Fig. 2), entre 25 e 400 no 2-ME (Fig. 3) e demonstraram, em sua totalidade, positividade no ATA (Fig. 4). Os 33 animais foram negativos em todas as provas, na amostra obtida no dia da vacinação (Fig. 5).

Os títulos máximos na SAR e SAT foram obtidos entre o 14º e 42º dia após a vacinação (Fig. 1 e 2), e no 2-ME, entre o 28º e 42º dia (Fig. 3), verificando-se declínio do título nessas provas após esse período.

No 182º dia pós-vacinal, a prova de SAR caracterizou cinco animais suspeitos e um positivo (Fig. 1), segundo as normas do Ministério da Agricultura do Brasil (1979). No mesmo período, foram observadas reações positivas em seis animais no 2-ME e em cinco no ATA (Fig. 5). Na colheita posterior, realizada aos 210 dias do início do experimento, verificou-se um animal positivo e um suspeito na SAT (Fig. 2), enquanto na SAR, registraram-se um animal positivo e dois suspeitos (Fig. 1), evidenciando respectivamente, 93,9% e 90,9% de negatividade.

Nas provas de SAT e SAR, os animais passaram a ser considerados negativos respectivamente aos 245 e 273 dias pós-vacinais (Figs. 2 e 1), de acordo com as normas do Ministério da Agricultura do Brasil (1979).

No 273º dia pós-vacinal verificaram-se reações incompletas e de baixo título em dois animais, nas provas de 2-ME e ATA (Figs. 3 e 4). Na colheita posterior, realizada aos 308º dia da vacinação, todos os animais caracterizaram-se pela ausência de reação aglutinante nessas provas.

Ao redor de 18 meses pós-vacinais, verificou-se em 19 animais na SAR e 11 na SAT (Figs. 1 e 2), oscilação de título em até duas diluições, atingindo no máximo a diluição 1:100.

Ao final do 728º dia pós-vacinal, observaram-se dois animais com títulos residuais na diluição 1:50 na SAR (Fig. 1). Neste mesmo período foram observados dois animais com reação na diluição 1:25 e um na de 1:50 na SAT (Fig. 2).

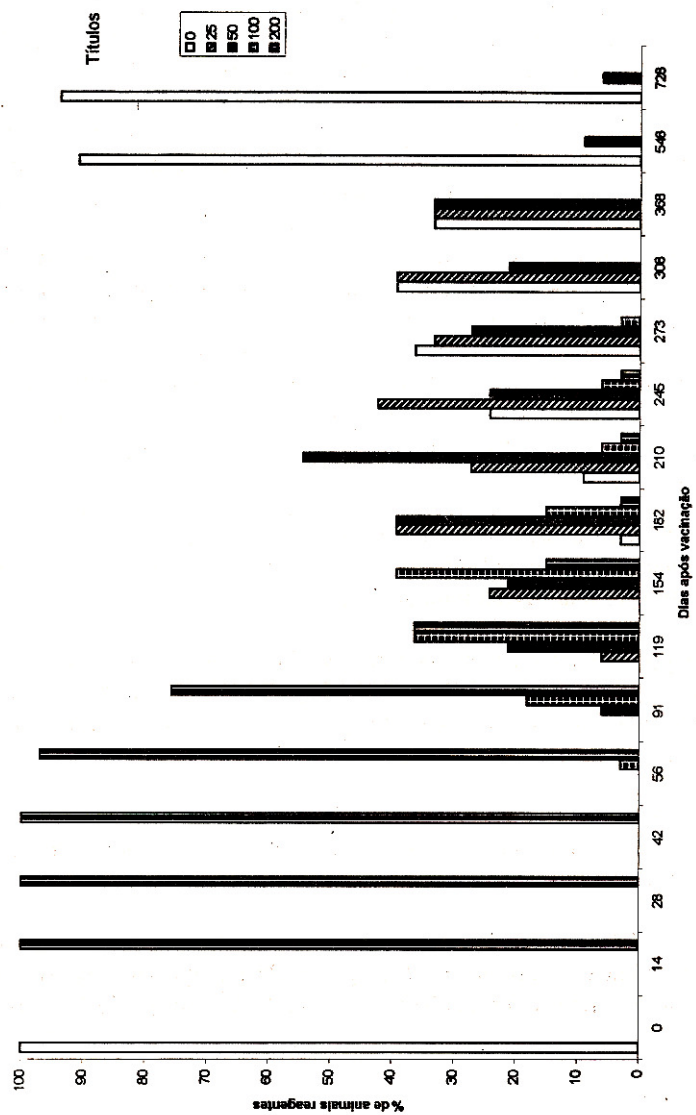


Figura 1. Porcentagem de fêmeas bovinas reagentes à prova de soroglutinação rápida em placa (SAR), após vacinação contra brucelose (amostra B19).

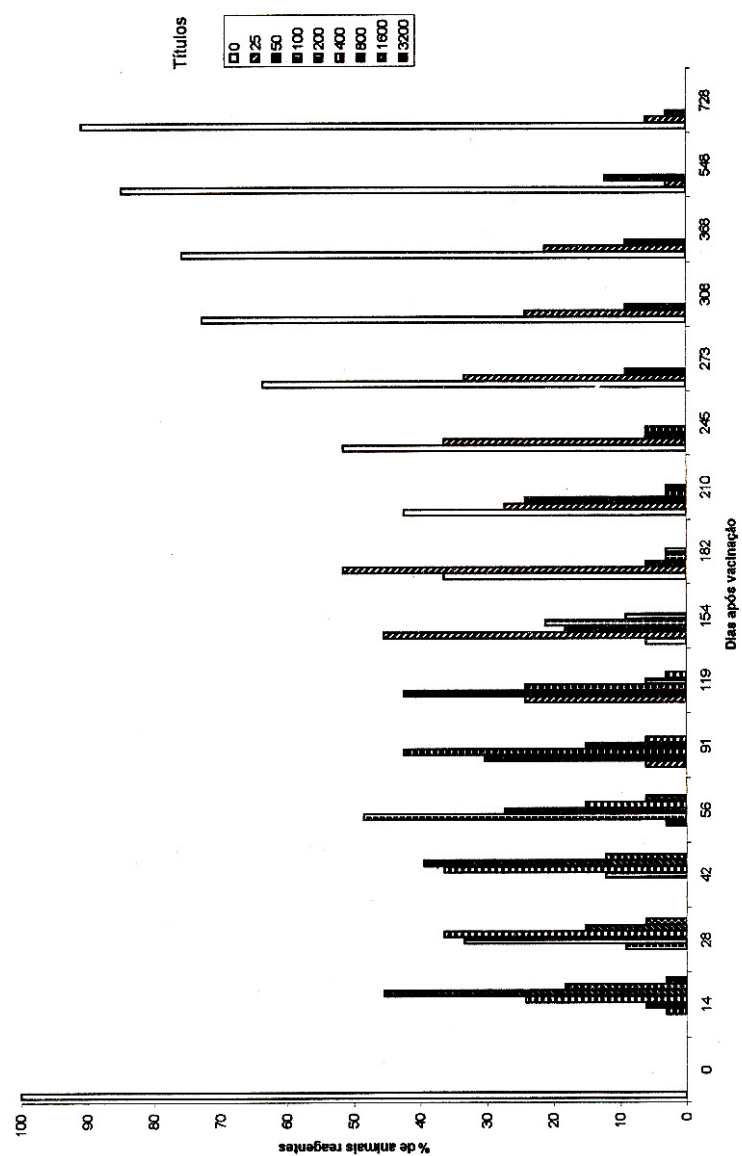


Figura 2. Porcentagem de fêmeas bovinas reagentes à prova de soroaglutinação lenta em tubos (SAT), após vacinação contra brucelose (amostra B19).

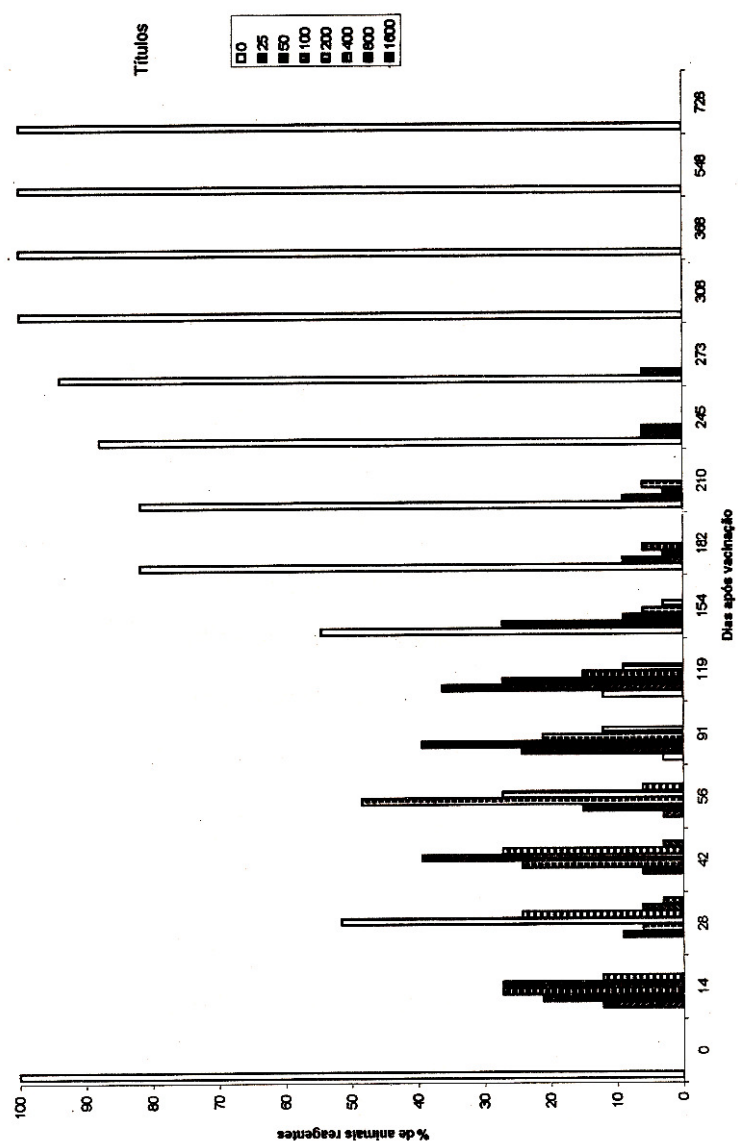


Figura 4 - Porcentagem e fêmeas bovinas reagentes à prova do antígeno tamponado acidificado em placa (ATA), após vacinação contra brucelose (amostra B19).

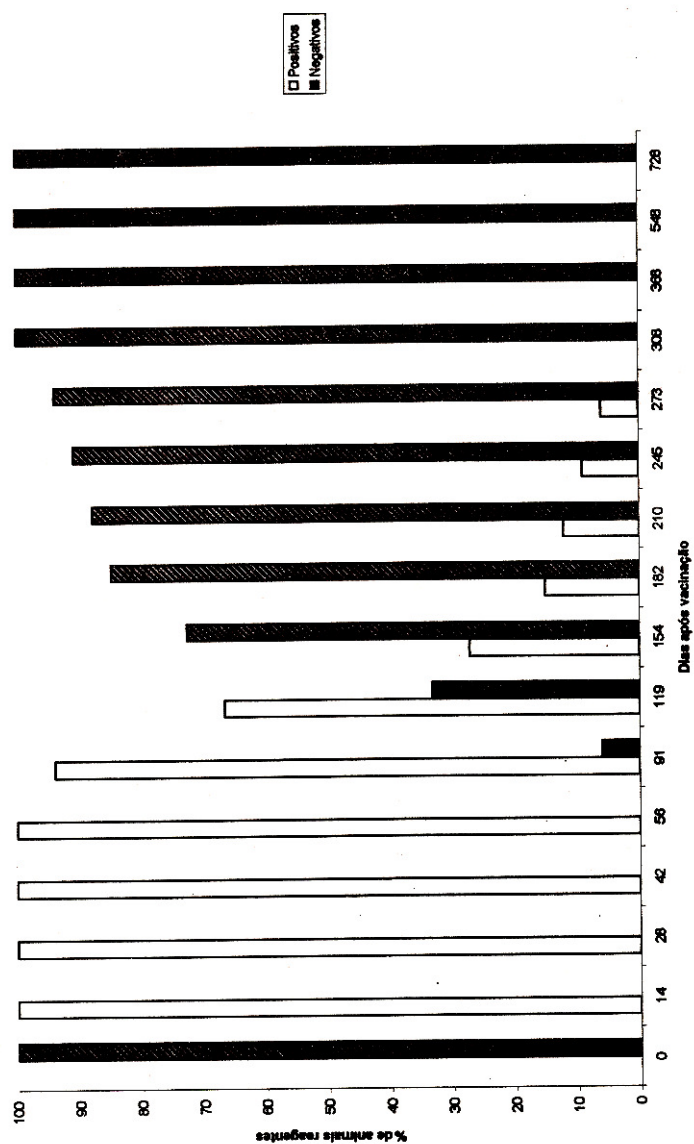


Figura 3. Porcentagem de fêmeas bovinas reagentes à prova de 2-mercaptoetanol (2-ME), após vacinação contra brucelose (amostra B19).

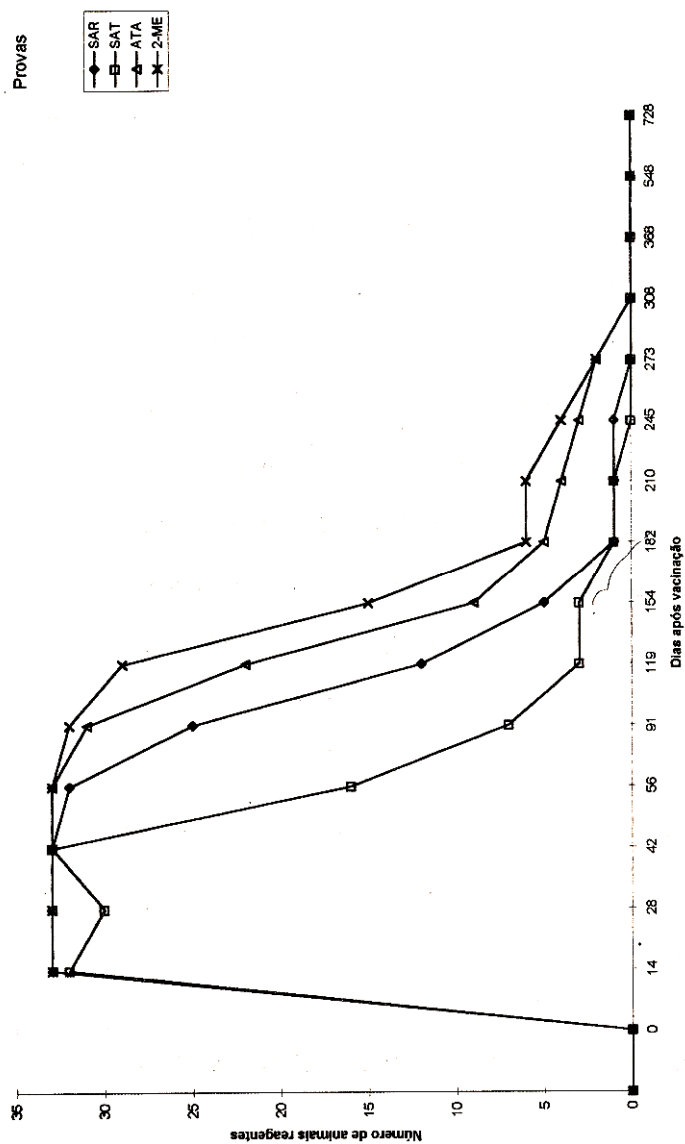


Figura 5 - Número de fêmeas bovinas positivas para *Brucella abortus* nas provas de soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação lenta em tubos (SAT), antígeno tamponado acidificado (ATA) E 2-Mercaptoetanol (2-ME).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na brucelose bovina, os estudos têm se dirigido no aprimoramento dos recursos diagnósticos, visando à demonstração qualitativa e quantitativa das Ig, presentes nas formas aguda e crônica da doença, em estados latentes (Sutherland, 1980), após episódios de aborto e na diferenciação de reações oriundas de infecção das de origem vacinal (Mac Millan, 1990). A persistência de títulos pós-vacinais em provas convencionais de soroaglutinação, freqüentes em bezerras vacinadas com a B19, tem provocado dificuldades no diagnóstico da doença e, conseqüentemente, na comercialização de animais (Ornellas-Santos et al., 1975).

Os resultados apresentados revelam a presença de títulos máximos na SAR e SAT entre o 14º e 42º dia pós-vacinal, bem como no 2-ME, entre o 28º e 42º dia, semelhantes aos intervalos descritos por Casas Olascoaga (1976), Sutherland (1980) e pela WHO (1986), para animais vacinados com a B19 na idade recomendada. Esses autores situam as altas concentrações de IgM no 13º dia e da IgG1 entre o 28º e 42º dia da vacinação. Esses títulos provavelmente decorrem da maior habilidade da SAR e SAT na detecção de IgM (Mac Millan, 1990), e do 2-ME, em relação à classe IgG (Casas Olascoaga, 1976).

A precocidade na ausência de reação aglutinante obtida na prova do 2-ME concorda com as descrições de Garrido-Contreras et al. (1974), nas quais a prova do 2-ME superou a SAT e a inativação pelo calor em termos de precocidade. Por outro lado, o 2-ME foi mais tardio que outras provas complementares, como a fixação de complemento, referida pela WHO (1986), apresentando em 90 a 95 % das fêmeas vacinadas com B19 (na idade recomendada), ausência de títulos séricos em período inferior a seis meses da imunização. A presença de animais não reagentes de forma mais precoce no 2-ME pode ser justificada pela sua especificidade na detecção de IgG (Casas Olascoaga, 1976), pois ela se caracteriza pela persistência em animais doentes, com tendência ao desaparecimento nos animais vacinados (Mac Millan, 1990).

O teste do ATA também caracterizou-se pela precocidade na ausência de reação aglutinante, contrariando Mac Millan (1990), que menciona a persistência de títulos sorológicos no ATA em alguns animais, a despeito da negatividade de outras provas convencionais.

As provas de SAR e SAT apresentaram persistência de títulos vacinais até o 728º dia da vacinação, provavelmente em virtude da sua maior eficiência em demonstrar Ig da classe IgM (Allan et al., 1976). Em ambas as provas, porém,

mesmo com animais apresentando títulos residuais, eles seriam considerados negativos para a enfermidade, a partir do 245º para a SAT e do 273º dia para a SAR, uma vez que esses títulos persistentes não chegaram a superar a diluição 1:50. De acordo com as normas do Ministério da Agricultura (Brasil, 1979), são necessários títulos de 100 e 200, para os animais vacinados serem considerados, respectivamente, suspeitos e positivos. A persistência de animais com títulos residuais após 12 meses ou mais da vacinação, concorda com as citações de Saka Nuru (1973), Joint... (1986) e Mac Millan (1990).

A negatividade em 90,9 % na SAR e 93,9% na SAT, observada nos animais aos sete meses da vacinação (210 dias), é semelhante aos dados de Rossini et al. (1972), em fêmeas com quatro a seis meses de idade, vacinadas com a B19. Em contrapartida, os 100% de negatividade nas provas de SAR e SAT, relatados por Ornellas-Santos et al. (1975) aos seis meses pós-vacinais (mediante a interpretação de animais vacinados), foram mais precoces que os resultados verificados no presente experimento, descritos aos nove e oito meses, respectivamente, para a SAR e SAT.

Verificou-se, no entanto, presença de reações aglutinantes incompletas e de baixo título em pequeno número de animais, nas provas do 2-ME e ATA ao 308º dia pós-vacinal. Estes resultados podem ser justificados pela interpretação preconizada para o 2-ME (Alton et al., 1976) e ATA (Alton et al., 1975), na qual a presença de qualquer título aglutinante é indicativo de reação positiva.

Adicionalmente, ao redor dos 18 meses da vacinação, alguns animais demonstraram oscilação de títulos na SAR e SAT, resultados próximos aos obtidos por Ornellas-Santos et al. (1975).

Baseado nos resultados do experimento conclui-se que as bezerras com três a oito meses de idade, vacinadas com a B19, apresentam resposta acentuada em todos os testes sorológicos executados, com declínio dos títulos contínuo e regular, após os picos para cada prova, embora tenham-se verificado oscilações em alguns animais na SAR e SAT. Cabe ressaltar que os animais mostraram resultados negativos nas provas do 2-ME, ATA, SAT e SAR por volta dos 10 meses pós-vacinais (Fig. 5), de acordo com a interpretação adotada para animais vacinados, ou seja, com idades máximas ao redor de 18 meses, sugerindo para animais vacinados com amostra B19, que estas provas possam ser empregadas mais precocemente do que a recomendação do Ministério da Agricultura (Brasil, 1979).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto Pedroso da Rocha, do Departamento de Produção e Exploração Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP/Campus de Botucatu, pela concessão dos animais para o experimento.

Ao Dr. Jorge Vítor Bacila Agottani, do Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR, por ceder gentilmente os antígenos utilizados na realização das provas.

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelas sugestões na redação do presente trabalho.

A Adriana Falco de Brito e Magda Regina, colegas da residência em Enfermidades Infecciosas dos Animais e ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP/Campus de Botucatu, onde foram realizadas as provas sorológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, G.S., CHAPPEL, R.J., WILLIAMSON, P. et al. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg.*, v.76, p.287-298, 1976.
- ALTON, G.G., JONES, L.M., PIETZ, D.E. *Las técnicas de laboratorios en la brucelosis*. Ginebra, OMS, 1976, p.55-133, (Ser. Monogr. 55).
- ALTON, G.G., MAW, J., ROGERSON, B.A. et al. Serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. *Aust. Vet. J.*, v.51, p.57-63, 1975.
- BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 24ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. *Manual de procedimentos: movimento interestadual de animais e produtos*. 2ed. Brasília: 1979. 32p.
- BUTLER, L.E., MAXWELL, C.F. Preparation of bovine immunoglobulins and free secretory component and their specific antisera. *J. Dairy Sci.*, v.55, p.151-164, 1971.

- CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. *Zoonosis*, Comité, v.18, p.107-141, 1976.
- CORBEL, M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Vet. Bull.*, v.55, p.927-942, 1985.
- FAO/OMS de expertos en Brucellosis. Ginebra: OMS, 1972. 1972, p.3 (Informes técnicos, 464).
- GARRIDO-CONTRERAS, A., MIRANDA-ENTRENAS, S., CONTRERAS, A.G. Investigación de inmunoglobulinas en brucelosis bovina. *Arch. Zootec.*, Joint. v.23, p.289-298, 1974.
- MAC MILLAN, A. Conventional serologic tests. In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990, p.155-300.
- MATHIAS, L.A., PINTO, A.A. Comparative study among complement fixation, serum agglutination and rose bengal plate tests in the serodiagnosis of bovine brucellosis. *Int. J. Zoonoses*, v.10, p.1-6, 1983.
- NIELSEN, K., DUNCAN, J.R., STEMSHORN, B. et al. Relationship of humoral factors (antibody and complement) to immune responsiveness, resistance and diagnostic serology. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.137, p.367-389, 1981.
- ORNELAS-SANTOS, P.P., ARAÚJO, R.F., REIS, R. et al. Brucelose Bovina: Persistência da aglutinação pós-vacinal em bezerras de raças zebuínas vacinadas com amostra B-19. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.27, p.363-373, 1975.
- PIETZ, D.E., COWART, W.O. Use of epidemiologic data and serologic tests in bovine brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.177, p.1221-1226, 1980.
- PLACKETT, P., ALTON, G.G., CARTER, P.D. et al. Failure of a single dose of *Brucella abortus* strain 19 vaccine to protect cattle when given early in calfhoo. *Aust. Vet. J.*, v.56, p.409-412, 1980.
- ROSSINI, A.J., PUERTAS, A.B., MOURA, C.A. et al. Queda de aglutininas no soro sanguíneo de novilhas em diferentes grupos etários vacinados contra brucelose bovina, amostra B19. *Atual. Vet.*, n.1, p.26-29, 1973.
- SAKA NURU, B.V.S. Field study of seroagglutinin titers in young heifers at breeding age following calfhoo vaccination with *Brucella abortus*, strain 19. *The Calif. Vet.*, v.27, p.12-39, 1973.
- SUTHERLAND, S.S. Immunology of bovine brucellosis. *Vet. Bull.*, v.50, p.359-368, 1980.
- JOINT FAO/WHO Expert Commite on Brucellosis, Genebra: World Health Organization, 1986. 132p. (Technical Report, 740).