

Geraldo Márcio da Costa

ESTUDO COMPARATIVO DO TESTE DE IMUNODIFUSÃO
DUPLA EM ÁGAR GEL (IDGA) COM OUTRAS TÉCNICAS
SOROLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE
BOVINA.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária
Área: Medicina Veterinária
Preventiva
Prof^ª orientadora: Vera Lúcia
Viegas de Abreu

Belo Horizonte
UFMG- Escola de Veterinária
1998

C837e Costa, Geraldo Márcio da Costa, 1961-

Estudo comparativo do teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA) com outras técnicas sorológicas para o diagnóstico da brucelose bovina / Geraldo Márcio da Costa.- Belo Horizonte: UFMG. Escola de Veterinária, 1998.

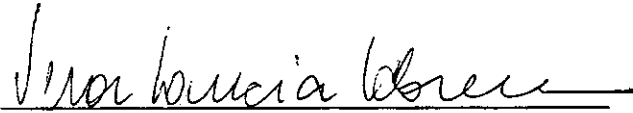
57p: il.

Dissertação (Mestrado)

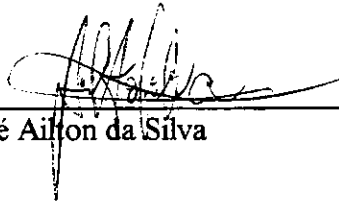
1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Brucelose em bovino - Diagnóstico - Teses. I. Título.

CDD-636.089 695 7

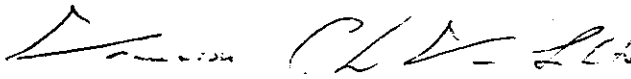
Dissertação defendida e aprovada em 28 de maio de 1998 pela
Comissão Examinadora constituída por:



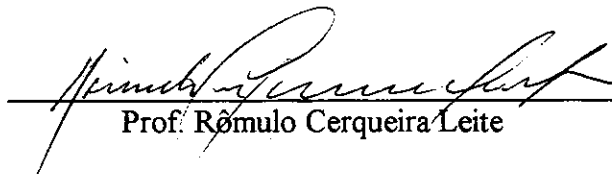
Prof^a Vera Lúcia Viegas de Abreu
Orientadora



Prof. José Ailton da Silva



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. José Brito Figueiredo

DEDICAÇÃO:

Aos meus pais, pelo esforço e exemplo.

Aos meus filhos, Amanda, Lucas e Thiago.

A Adalgisa, minha esposa, pelo estímulo e
companheirismo.

Aos meus irmãos, pela amizade e carinho.

A todos aqueles que não tiveram a oportunidade que me
foi dada.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Vera Lúcia Viegas de Abreu, pela amizade, ensinamentos e orientação.

Ao Prof. Nivaldo da Silva que iniciou-me na Bacteriologia, mostrando-me o quanto é fascinante esta disciplina.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pelo constante estímulo e preciosa colaboração na execução deste trabalho.

Aos Prof. Ivan Sampaio e Rabindranath Loyola Contreras, pela valiosa contribuição na análise estatística dos resultados.

Ao Prof. José Britto Figueiredo, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Helton Matana Saturnino, pelo fornecimento dos animais que compuseram parte dos grupos experimentais.

Ao amigo Dr. Néilson Éder da Silva, pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Jorge Victor Bacila Agottani, pelo fornecimento do antígeno para a realização dos testes de imunodifusão.

Aos Prof. Francisco Carlos Faria Lobato e José Ailton da Silva, pela amizade e dedicação.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage pelo estímulo e amizade.

À colega Nádia Maria da Silva, pela assistência na parte de informática.

À Fundação de Medicina Veterinária e Zootecnia, pelo suporte financeiro na compra de reagentes, sem os quais a realização deste trabalho seria inviável.

Aos colegas, Joely, Brasilina, Magda, Rita, Elza, Érica e Santa Rosa, pelo gratificante convívio na pós graduação.

Aos colegas da EV-UFMG, em especial do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelos vários anos de relacionamento harmônico.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁG.
LISTAS DE ILUSTRAÇÕES	11
RESUMO	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 LITERATURA CONSULTADA	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Grupos Experimentais	
3.2 Vacinação dos Animais	
3.3 Sangria dos Animais	
3.4 Testes Sorológicos	
3.5 Antígenos Utilizados	
3.6 Soros Controles	
3.7 Análise Estatística dos Resultados	
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÕES	49
SUMMARY	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		PÁG.
FIGURA 01	Especificidade do IDGA, SAR, SAL, 2-ME e AT no grupo 01.	34
FIGURA 02	Sensibilidade do IDGA, SAR, SAL, 2-ME e AT no grupo 02.	35
FIGURA 03	Sensibilidade do IDGA relativa aos títulos à SAR, SAL e 2-ME no grupo 02.	37
FIGURA 04	Sensibilidade do IDGA relativa aos títulos à RFC no grupo 02.	37
FIGURA 05	Especificidade do IDGA, 2-ME, SAL, SAR, RFC e AT nos grupos 03, 04 e 05.	39

RESUMO

Comparou-se o teste de imunodifusão dupla em ágar gel (IDGA) empregando o Polissacarídeo "O" como antígeno com os testes de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, 2-mercaptoetanol, reação de fixação de complemento e antígeno tamponado acidificado no diagnóstico da brucelose, em bovinos infectados, não infectados e recém vacinados com a amostra B-19, visando a diferenciação de anticorpos vacinais daqueles associados à natural pela *Brucella abortus*.

Nenhum dos testes realizados permitiu diferenciar precisamente anticorpos vacinais daqueles induzidos pela infecção brucélica e, nas condições do presente trabalho, a utilização do IDGA com este objetivo, poderia levar à retenção de animais infectados no rebanho.

Palavras chaves: Bovino, Brucelose, Diagnóstico

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença que se encontra amplamente difundida na América do Sul. A doença ocorre endemicamente em todo o território nacional, em rebanhos de carne ou de leite independentemente das formas de criação ou exploração às quais estejam submetidos. Além dos prejuízos econômicos decorrentes da queda de produção de leite e de carne que comprometem seriamente a produção nacional, deve-se ressaltar a grande importância social da doença, uma vez que se trata de importante zoonose.

A vacinação de bezerras com idade entre três e oito meses com *Brucella abortus* amostra B-19 (Buck, 1930), o isolamento e sacrifício dos animais infectados têm sido as principais medidas de controle da brucelose bovina. A vacinação de adultos e novilhas com dose reduzida, prática não regulamentada no país, tem sido utilizada como medida alternativa de controle em propriedades com alta prevalência (Viana et al., 1982; Viana et al., 1986; Viana et al., 1995).

Testes sorológicos têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico da brucelose, contudo, permanece a dificuldade em diferenciar a resposta vacinal daquela associada à infecção natural, uma vez que em ambos os casos estão presentes os mesmos tipos de anticorpos, apesar de serem observadas diferenças na proporção relativa e persistência de cada tipo de imunoglobulina (Olascoaga, 1976). O problema tem sido agravado pela necessidade de se testar mais precocemente animais vacinados, seja por imposições comerciais, seja pelo fato dos mesmos entrarem em atividade

reprodutiva mais cedo, em decorrência, principalmente, da criação de raças mais precoces e adoção de um melhor manejo nutricional.

Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada à seleção de testes que possibilitem diferenciar anticorpos vacinais daqueles induzidos pelo processo infeccioso. Testes que empregam o polissacarídeo "O" vêm sendo amplamente pesquisados, tendo a imunodifusão demonstrado potencial aplicabilidade nestas circunstâncias.

Com o objetivo de diferenciar anticorpos vacinais de anticorpos induzidos pela infecção brucélica, comparou-se a especificidade e sensibilidade do teste de Imunodifusão Dupla em Ágar Gel (IDGA) empregando o polissacarídeo "O", com as técnicas de Reação de Fixação de Complemento (RFC), Soroaglutinação Rápida (SAR), Soroaglutinação Lenta (SAL), Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Teste do Antígeno Tamponado Acidificado (AT) em bovinos infectados, não infectados e recém vacinados.

2. LITERATURA CONSULTADA

O diagnóstico da brucelose bovina é, frequentemente, difícil de ser alcançado, uma vez que a resposta sorológica nos animais infectados por *Brucella abortus* é influenciada por fatores como período de incubação variável, no qual os testes sorológicos são geralmente negativos; utilização de vacinação com a amostra B-19; tipo de exposição; resposta individual variável à infecção e estágio de gestação à época da infecção (Lord et al., 1989).

O isolamento, embora altamente específico, exige o emprego de meios, equipamentos e condições especiais de cultivo; apresenta baixa sensibilidade frente a amostras inadequadas e mal conservadas; requer a diferenciação entre amostra vacinal e amostra de campo nas áreas onde se utiliza a vacinação com a amostra B-19, além de se tratar de uma técnica laboriosa e onerosa, sobretudo quando um número elevado de amostras tem que ser examinado. Por estes motivos, a maioria dos testes utilizados no diagnóstico da brucelose bovina se baseiam na detecção de anticorpos, embora o isolamento do agente etiológico constitua o método mais preciso (Sutherland, 1980; Alton et al., 1988).

Olascoaga (1976) relaciona a SAR, SAL, RFC, 2-ME, AT, Teste de Coombs, Teste do Rivanol e a Hemaglutinação Indireta Passiva como provas sorológicas para o diagnóstico da brucelose animal. Segundo o autor, não existe prova sorológica que permita identificar todos os casos de brucelose e os títulos observados em animais infectados nem sempre são significativos. Em casos de infecção crônica, os títulos podem ser baixos e até não detectáveis.

Fatores fisiológicos, período de incubação e infecções crônicas podem explicar a ocorrência de tais achados.

De acordo com Olascoaga (1976) e Agottani & Gonçalves (1996), a SAR detecta, à semelhança da SAL, anticorpos IgM e IgG2. A técnica é utilizada no diagnóstico de rotina, apresentando a vantagem de ser rápida e sensível. A presença de hemólise e o fenômeno de prozona exercem menor influência em relação à SAL, entretanto as reações inespecíficas se verificam com maior frequência. A técnica está sujeita a erros diversos, como por exemplo: erros de pipetagem, conta-gotas descalibrado, ressecamento, entre outros, contudo, quando realizada nas condições padrões, fornece resultados semelhantes aos da SAL. O teste de 2-ME é uma técnica complementar que detecta seletivamente as imunoglobulinas da classe IgG. O teste tem como fundamento a inativação da IgM por substâncias que contém o radical tiol, como por exemplo o 2-mercaptoetanol, cisteína e ditiotreitól.

A Soroaglutinação Lenta foi o teste sorológico mais empregado no diagnóstico da brucelose bovina até o final da década de 60, tendo sido utilizado como teste básico nas campanhas de erradicação conduzidas na Noruega, Dinamarca e Suécia (Olascoaga, 1976). Apresenta limitações no período de incubação e na forma crônica da doença (Nicoletti, 1969; Alton et al., 1988). O teste está menos sujeito a erros de manipulação e reações inespecíficas que a SAR, mas apresenta baixa sensibilidade de acordo com Nicoletti & Muraschi (1966).

Avaliações bacteriológicas indicam que a RFC é superior a todos os testes em termos de sensibilidade e especificidade, constituindo importante ferramenta para a identificação de rebanhos brucélicos (Nicoletti, 1969; Sutherland, 1980). As imunoglobulinas fixadoras persistem por menor tempo no soro de animais vacinados antes da puberdade, permitindo, em algumas situações, o diagnóstico

diferencial entre infecção e vacinação, desde que tenham transcorridos seis meses ou mais após a vacinação (Nicoletti, 1969; Nielsen, 1995).

A acidificação do antígeno tem mostrado ser um mecanismo útil por destruir a reatividade de IgM e simultaneamente aumentar a reatividade de IgG1. IgM perde parte de sua atividade aglutinogênica em pH 3,65, enquanto IgG1 que é inativa em pH 7,0 mantém sua reatividade. Grande número de técnicas que empregam este princípio tem sido utilizadas como teste de triagem, como o AT, por exemplo. Este teste tem a vantagem de ser rápido, barato e altamente sensível, embora pouco específico (Nielsen, 1995; Agottani & Gonçalves, 1996). De acordo com Olascoaga (1976), o teste constitui um procedimento qualitativo e rápido de diagnóstico, permitindo a identificação de animais infectados que apresentam baixos títulos e/ou cronicamente infectados que não reagem nos demais testes de aglutinação ou o fazem de forma inconclusiva. O teste geralmente não interfere no diagnóstico da infecção desde que os animais vacinados com idade entre três e oito meses tenham mais de dois anos de idade por ocasião do teste.

Os testes sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose bovina detectam anticorpos contra a cadeia "O" do lipolissacarídeo (LPS), que ocorre naturalmente nas amostras lisas de campo e vacinal de *Brucella abortus*, diferindo essencialmente na habilidade de detectar diferentes classes e subclasses de anticorpos que ocorrem em animais infectados ou vacinados (Alton et al., 1988; Stevens et al., 1994, Agottani & Gonçalves, 1996).

As principais imunoglobulinas associadas à resposta vacinal e à infecção pela *Brucella abortus* são IgM, IgG1, IgG2 e IgA. No processo infeccioso experimental, IgM é detectada entre o quinto e sétimo dia após a inoculação, seguida de IgG, detectável entre o 14^o e o 21^o dia. Na fase crônica, as imunoglobulinas da classe IgG se tornam predominantes (Sutherland, 1980; Nielsen, 1995).

Nas bezerras vacinadas com idade entre quatro e oito meses com a amostra B-19, IgM é detectada à partir do quinto dia de vacinação, alcançando o pico por volta do 20º dia. IgG aparece logo depois, atingindo a concentração máxima entre o 28º e o 42º dia após a vacinação (pv), nestas condições, ambas as imunoglobulinas declinam rapidamente, alcançando níveis inexpressíveis em aproximadamente 12 meses. Animais vacinados após oito meses de idade apresentam níveis séricos geralmente mais elevados e persistentes de IgG que podem se estender por período superior a um ano (Olascoaga, 1976; Agottani & Gonçalves, 1996).

Bezerras vacinadas aos seis meses de idade permanecem reagentes aos testes de soroaglutinação até geralmente os 18 meses de idade, enquanto a maioria se torna negativa à RFC realizada seis meses pv (Alton et al., 1988). Respostas sorológicas indicativas de infecção brucélica decorrentes da vacinação estão associadas à infecção persistente pela amostra vacinal que, embora pouco frequentes, dificultam a interpretação dos resultados sorológicos (Nielsen & Duncan, 1988).

A vacinação em dose reduzida pela via conjuntival empregando a amostra B-19 tem sido utilizada como alternativa de controle da brucelose bovina. O método confere boa proteção com resposta sorológica pouca pronunciada (Nicoletti et al., 1978; Plommet & Fensterbank, 1984; Crawford et al., 1988; Lord et al., 1989; Viana et al., 1989; Viana et al., 1995).

Manthei et al. (1952) avaliaram a vacinação com dose reduzida pelas vias intradérmica e subcutânea em novilhas com idade variando entre 12 e 15 meses. Observaram que a dose reduzida ($2,4 \times 10^9$) conferiu imunidade semelhante à dose padrão, mas induziu resposta sorológica de mesma intensidade.

Alton & Corner (1981) observaram, à vacinação de adultos com dose reduzida, que os animais se tornaram positivos ao AT 18 dias pv. Reações à RFC se iniciaram no oitavo dia, sendo que 78,00% dos animais estavam reagentes ao teste 14 e 28 pv. Aos três meses pv, 88,89% dos animais apresentaram sorologia negativa ao AT e RFC. Os 11,11% restantes apresentaram infecção persistente pela amostra vacinal.

Viana et al. (1982) e Viana et al. (1986) trabalhando com adultos vacinados com dose reduzida, observaram que dois meses após a aplicação da dose de reforço os animais se apresentavam negativos ao AT, com pequena proporção apresentando títulos baixos ($\geq 1:50$) à SAR.

Nicoletti & Muraschi (1966) em trabalho de comparação de técnicas, verificaram que a SAL falhou em classificar 39% de animais brucélicos identificados através de cultura, com AT apresentando a menor especificidade dentre os testes avaliados. A RFC provou ser o melhor teste, entretanto nenhum teste identificou corretamente todos os animais infectados.

Plommet et al. (1973) conduziram experimento no qual 22 bezerras filhas de vacas brucélicas foram separadas isoladas antes de mamar o colostro e criadas em baias separados até atingir a maturidade sexual, quando foram inseminadas e acompanhadas até o parto ou aborto. Após estes eventos, fetos ou bezerros e material de necrópsia das genitoras foram submetidos à cultura para isolamento de *Brucella*, à qual 18,18% das amostras se mostraram positivas. Nenhum dos animais apresentou reação sorológica até a oitava semana antes do parto ou aborto.

Viana et al. (1981) observaram grandes oscilações nos títulos sorológicos de animais naturalmente infectados ao avaliarem as

provas de SAR, AT e "Ring Test" em rebanhos cronicamente infectados.

Sutherland (1984) verificou elevada proporção de reagentes à RFC, SAL e AT dois meses pv de bezerras e vacas adultas com dose convencional.

Hornitzky & Searson (1986) relataram que 100,00% dos animais com títulos à RFC $\geq 1:4$ foram positivos ao AT e que 72,00% dos animais com títulos $\geq 1:4$ e $\leq 1:16$ à RFC foram positivos à cultura. Observaram alta correlação entre os resultados do isolamento bacteriano e RFC quando esta apresentava título $\geq 1:32$. AT demonstrou ser mais sensível que a RFC, revelando animais que, apesar de apresentarem títulos baixos ou mesmo negativos à RFC, foram positivos à cultura.

Huber & Nicoletti (1986) obtiveram especificidade de 8,40% para AT em bovinos adultos recém vacinados de 30,80% para animais negativos não vacinados. Observaram ainda que, à medida que cresciam os títulos à RFC e ao teste de Rivanol, crescia a proporção de isolamentos positivos, embora isolamentos tenham sido feitos em animais que apresentavam títulos baixos ou mesmo não detectáveis nas técnicas citadas.

Cherwonogrodzky & Nielsen (1988) constataram a ausência de precipitação no teste de IDGA realizado em soro de animais vacinados e avaliados entre três semanas e seis meses pv, embora apresentassem elevados títulos nos testes de SAL e RFC. Contudo, verificaram que o teste falhou em detectar alguns animais sabidamente infectados que apresentavam títulos elevados à SAL e RFC

Díaz et al. (1979) observaram que o teste de imunodifusão empregando o polissacarídeo "O" foi capaz de diferenciar animais

brucélicos de animais vacinados. O teste apresentou sensibilidade de 93,50% e especificidade de 100,00% para bovinos vacinados e avaliados entre sete e 180 dias pv. De acordo com os autores, bovinos vacinados não desenvolviam anticorpos contra o referido antígeno, a não ser que ocorresse infecção bacteriologicamente detectável pela amostra vacinal que, normalmente, só se verifica quando bovinos são vacinados em fase de gestação ou lactação.

Jones et al. (1980) verificaram que o teste de imunodifusão radial (IDR) empregando o polissacarídeo "O" realizado em soros sanguíneos de bovinos adultos vacinados com dose reduzida foi mais específico que a RFC, embora menos sensível. Bovinos vacinados com dose padrão e avaliados entre duas e 16 semanas pv mostraram-se 100,00% reagentes ao AT ao longo de todo o período de monitoramento; a maioria dos animais se mostrava positiva à RFC (título $\geq 1:40$) na segunda semana pv. A imunodifusão apresentou resultado positivo em 36,36% dos animais vacinados na quarta semana pv, entretanto todos os animais apresentaram resultado negativo frente ao teste na 20ª semana pv. No grupo de bovinos adultos vacinados com dose reduzida, AT, RFC e IDR apresentaram especificidades de 41,90%, 66,00% e 80,00%, respectivamente. IDR foi o teste mais específico, mas o menos sensível em relação às demais técnicas avaliadas.

Corrêa de Sá (1989) comparou AT, 2-ME, SAL, RFC, Coombs e IDGA, com o teste de imunodifusão radial (IDR) empregando o polissacarídeo "O". Estabeleceu que títulos $\geq 1:25$ ao 2-ME e $\geq 1:4$ à RFC seriam interpretados como indicativos de infecção. Observou que quaisquer dos testes executados em animais vacinados entre três e seis meses de idade detectavam anticorpos vacinais que podiam perdurar até 12 meses pv. A imunodifusão apresentou especificidades de 80,00% e 100,00% decorridos 20 e 180 dias pv, respectivamente. As sensibilidades verificadas para AT, SAL, 2-ME, RFC e IDR foram de 94,00%, 87,50%, 87,00%,

92,00% e 89,00%, respectivamente, enquanto as especificidades para as mesmas técnicas foram de 84,70%, 87,70%, 84,00%, 87,00% e 97,00%, respectivamente.

Lord et al. (1989) compararam os resultados do IDGA, RFC, AT, SAL, 2-ME e do teste de Rivanol em soros de bezerras vacinadas com dose padrão e dose reduzida e avaliadas entre um e seis meses pv. O IDGA foi positivo em 87,50% dos animais infectados com base nos resultados do isolamento bacteriano. Os autores observaram que 60 dias pv de bezerras com dose convencional, a proporção de reagentes à SAL, 2-ME, AT e RFC foi de 54,39%, 47,45%, 53,24% e 55,32%, respectivamente. Animais adultos vacinados com dose padrão e avaliados dois meses pv apresentaram reação negativa à imunodifusão, enquanto os testes de SAL, 2-ME, AT e RFC apontaram 89,69%, 79,54%, 75,75% e 71,96% de reagentes, respectivamente. Nos bovinos adultos vacinados com dose reduzida e avaliados após 30 dias, estas mesmas proporções foram de 94,44%, 94,44%, 93,05% e 86,11%, respectivamente, tendo o IDGA apresentado especificidade de 100,00% neste grupo. Observaram correlação entre os resultados de AT e RFC com IDGA em bovinos infectados com títulos sorológicos ≥ 100 UI/ml.

Pinochet et al. (1989) em teste de IDGA empregando o polissacarídeo "O", obtiveram sensibilidade de 86,40% para animais infectados e especificidade de 100,00% para animais negativos não vacinados e bezerras vacinadas e testadas entre 20-140 dias pv, ocasião em que estas apresentavam 65,27%, 83,33% e 84,47% de reagentes à SAL, AT e RFC, respectivamente. Animais infectados que apresentavam títulos baixos à RFC e SAL foram geralmente negativos ao IDGA.

Pinochet et al. (1990) verificaram que o IDGA apresentou sensibilidade de 92,30% e especificidade de 100,00% para bezerras vacinadas e testadas entre dois e cinco meses pv, embora 93,58% e

89,43% fossem reagentes ao AT e SAL, respectivamente. Foi observada correlação positiva quando se compararam os resultados obtidos à SAL e AT com os resultados do teste de imunodifusão no grupo infectado.

Dajer et al. (1990) realizaram estudo comparativo entre técnicas de diagnóstico para a brucelose bovina adotando a RFC como teste padrão. Utilizaram animais reagentes e não reagentes para brucelose que foram dispostos em três grupos experimentais: vacinados, não vacinados e animais de histórico vacinal desconhecido. Obtiveram 100,00% de sensibilidade para AT nos três grupos experimentais estudados, sendo as especificidades observadas para o grupo não vacinado, vacinado e de histórico desconhecido de 83,00%, 13,00% e 100,00%, respectivamente. No 2-ME, as sensibilidades e especificidades verificadas foram 80,00% e 100,00%, 67,00% e 97,00% e 98,00% e 100,00%, respectivamente. AT apresentou sensibilidade de 100,00% em todos os grupos avaliados demonstrando ser um bom teste de triagem. O teste de Rivanol e 2-ME apresentaram as menores sensibilidades relativas à RFC.

Díaz (1994) observou que, à medida que aumentavam os títulos à RFC nos animais infectados, ocorria aumento do número de reações positivas à IDR, mas o mesmo não se verificava nos animais vacinados com a amostra B-19.

Poester & Thiessen (1994) realizaram estudo comparativo de técnicas sorológicas para diagnóstico da brucelose bovina em animais naturalmente infectados, negativos vacinados e negativos não vacinados. Obtiveram especificidade de 100,00% ao 2-ME e AT e de 99,80% à SAL para o grupo negativo. No grupo infectado, obtiveram 100,00% de sensibilidade ao AT, 84,80% à SAL, 89,60% ao 2-ME. Nos grupos vacinados com a amostra B-19, AT, SAL e 2-ME apresentaram especificidades de 88,00%, 84,00% e 93,10%, respectivamente. Decorridos 90 dias pv de bezerras com

dose padrão, 35,00% foram reagentes ao 2-ME e 55,00% ao AT e SAL. Quanto aos adultos vacinados com dose reduzida, 30 dias após a revacinação, cerca de 45% foram positivos à SAL, 60% ao AT e 15% ao 2-ME.

A validade de um teste é determinada em função da sensibilidade e da especificidade do mesmo. Testes que classificam os animais como negativos, suspeitos ou positivos criam problemas para a determinar a sensibilidade e a especificidade. Agrupar animais suspeitos com negativos, provocará aumento da especificidade. Por outro lado, agrupar suspeitos com positivos provocará efeito contrário. Fatores como a prevalência da doença, custo dos testes e implicações de 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 (Nicoletti & Tanya, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Grupos Experimentais

Foram utilizadas neste trabalho 406 amostras de soro bovino provenientes de 18 rebanhos leiteiros situados em Minas Gerais. Os animais pertenciam aos seguintes grupos experimentais:

-Grupo 01

Constituído de 118 animais adultos não vacinados e negativos à RFC para brucelose, sendo 58 machos e 60 fêmeas oriundos de seis rebanhos livres de brucelose.

-Grupo 02

Constituído por 108 fêmeas adultas, não vacinadas e positivas à RFC para brucelose. Os animais pertenciam a quatro rebanhos infectados que possuíam histórico de alterações reprodutivas indicativas de brucelose.

-Grupo 03

Constituído por 98 bezerras negativas à RFC para brucelose com idade variando entre três e oito meses, pertencentes a oito rebanhos livres de brucelose.

-Grupo 04

Constituído por 45 novilhas negativas para brucelose pertencentes a um rebanho brucélico. Todos os animais deste grupo foram negativos a dois testes consecutivos de RFC para brucelose intervalados de 30 dias.

-Grupo 05

Constituído por 37 bovinos machos com idade superior a oito meses oriundos de um rebanho livre de brucelose. Os animais foram negativos à RFC para brucelose realizada previamente à vacinação.

3.2. Vacinação dos Animais

Os animais pertencentes aos grupos 03 e 05 foram vacinados contra brucelose utilizando-se dose contendo $6,0-12,0 \times 10^{10}$ UFC por via subcutânea.

Os animais do grupo 04 foram vacinados com dose reduzida pela via conjuntival utilizando-se a técnica descrita por Viana et al. (1982). A dose vacinal continha aproximadamente $4,5 \times 10^9$ UFC.

Decorridos 120 dias da primeira vacinação, foi aplicada uma dose de reforço de mesma concentração.

Todas as vacinas utilizadas empregavam a amostra B-19 (Buck, 1930) e tinham controle do Ministério da Agricultura e Abastecimento.

3.3. Sangria dos Animais

Os bovinos integrantes dos grupos 01 e 02 foram sangrados uma única vez e as amostras submetidas à RFC para a brucelose.

Os animais dos grupos 03 e 05 foram sangrados 45-90 dias após a vacinação.

As novilhas do grupo 04 foram sangradas 30 dias após a aplicação da segunda dose vacinal.

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1.200 r.p.m por 10 minutos. Os soros foram aliquotados em frascos de três mL e estocados em freezer a -20°C até a execução dos testes sorológicos.

3.4. Testes Sorológicos

Todos os exames laboratoriais foram realizados no laboratório de Rotina em Doenças Bacterianas da Escola de Veterinária da UFMG.

3.4.1. Reação de Fixação de Complemento

O teste foi realizado e interpretado de acordo com a técnica preconizada por Alton et al. (1988), onde títulos iguais ou maiores que 1:4 foram considerados indicativos de infecção.

O teste foi utilizado como referencial para o cálculo da sensibilidade e especificidade dos testes avaliados nos diversos grupos experimentais. Nos grupos vacinados a técnica foi avaliada à semelhança dos demais testes.

3.4.2. Soro Aglutinação Rápida e Soro Aglutinação Lenta

Os testes foram executados de acordo com a técnica preconizada por Alton et al. (1988) e os resultados interpretados de acordo com Brasil (1976). As amostras foram testadas nas diluições de 1:25 até 1:400.

3.4.3. Teste do 2-Mercaptoetanol

Foi realizado segundo a técnica descrita por Olascoaga (1976), tendo sido adotados os padrões de interpretação propostos por Dajer et al. (1990) e Lord et al (1989). As amostras foram testadas nas diluições de 1:25 até 1:400.

3.4.4. Teste do Antígeno Tamponado Acidificado

O teste foi executado e interpretado de acordo as normas descritas por Alton et al. (1988).

3.4.5. Teste de Imunodifusão Dupla em Ágar Gel (IDGA)

O teste foi executado de acordo com a metodologia descrita por Pinochet et al. (1990), tendo sido utilizado Ágar Noble (Difco) na proporção de 1% em solução salina tamponada pH 7,2 (Tampão de Sorensen) acrescida de Timerosol a 0,01%.

3.5. Antígenos Utilizados

Para a realização dos testes de RFC e 2-ME, foi utilizado o antígeno padronizado para a SAL produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e adquirido junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

Os antígenos empregados no AT e na SAR foram cedidos pelo Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/PL).

O antígeno utilizado no teste de IDGA foi produzido segundo a técnica de Pinochet et al. (1989) pelo Dr. Jorge Victor Bacila Agottani do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

3.6. Soros Controles

Soros padrões positivo e negativo oriundos do Centro Panamericano de Zoonoses foram utilizados para controle dos testes de aglutinação e de imunodifusão. Além dos soros padrões, amostras de soros negativas e positivas com títulos variados foram utilizadas como controles adicionais em todos os testes.

3.7. Análise Estatística dos Resultados

A determinação da sensibilidade e da especificidade requer que os resultados dos testes sejam positivos ou negativos. Assim sendo, os títulos suspeitos obtidos nos testes de SAR, SAL e 2-ME foram interpretados como positivos, afim de que as mesmas pudessem ser calculadas.

A sensibilidade e a especificidade relativas foram determinadas por:

$$S = \frac{VP}{TP} \times 100$$

$$E = \frac{VN}{TN} \times 100$$

Onde: VP = número de amostras positivas à RFC e ao teste avaliado

TP = total de amostras positivas à RFC

VN = número de amostras negativas à RFC e ao teste avaliado

TN = total de amostras negativas à RFC

Os resultados foram comparados através do teste de qui-quadrado (χ^2) e teste de Fisher utilizando-se os programas estatísticos GraphPad InStat (1990) e Epi-Info 6.04 (1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação precisa de uma técnica de diagnóstico requer o emprego de uma técnica referencial que apresente alta sensibilidade e especificidade, o que justificou a adoção da RFC como teste de referência. Metodologia semelhante foi utilizada por Dajer et al. (1990).

Os resultados dos testes de imunodifusão foram obtidos na maioria das vezes após 24 horas de incubação, em raras ocasiões, a linha de precipitação se formou após 48-72 horas de incubação.

Os dados relativos à sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos se encontram compilados nas figuras 01 a 05 que se seguem.

Todos os valores de X^2 obtidos foram significativos, apresentando elevados valores para p.

A Fig. 01 relaciona os valores de especificidade relativas à RFC para os testes sorológicos executados para os grupos 01.

O IDGA apresentou especificidade de 100,00% para o grupo 01 (animais negativos não vacinados), estando este resultado em concordância com os obtidos por Pinochet et al. (1989) e Pinochet et al. (1990).

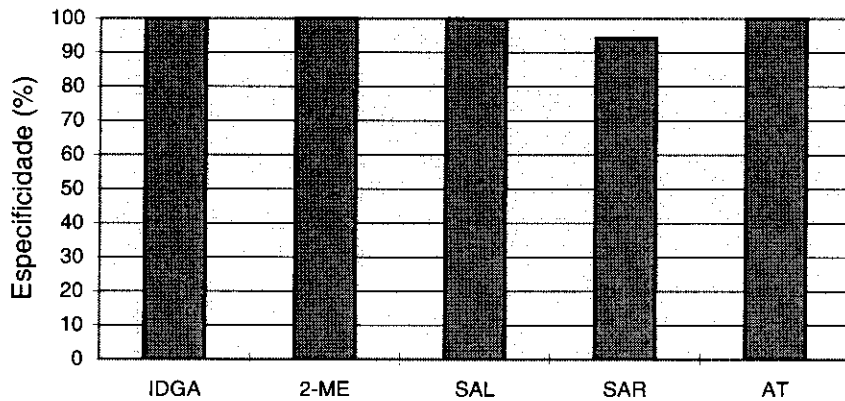


Figura 01: Especificidade do IDGA, 2-ME, SAL, SAR e AT no grupo 01.

O Teste do Antígeno Tamponado Acidificado apresentou especificidade de 100,00% para o grupo 01, contrariando os achados de Olascoaga (1976), Huber & Nicoletti (1986), Corrêa de Sá (1989) e Agottani & Gonçalves (1996) que verificaram baixa especificidade para o teste. Os resultados obtidos para AT, SAL e 2-ME foram semelhantes aos obtidos por Corrêa de Sá (1989) e Poester & Thiessen (1994).

Foram observadas 5,93% de amostras com reações positivas à SAR na diluição de 1:50, o que determinou a menor especificidade para o teste no grupo 01. Estas reações foram interpretadas como inespecíficas, uma vez que não foram detectadas reações ao 2-ME, técnica que apresenta alta especificidade por detectar seletivamente imunoglobulinas da classe IgG (Olascoaga, 1976; Agottani & Gonçalves, 1996) e os animais eram provenientes de rebanhos não vacinados e sem histórico de alterações reprodutivas que pudessem ser correlacionadas com a brucelose.

Todos os testes realizados para o grupo 01 apresentaram-se 100,00% concordantes com a RFC, ou seja, apresentaram especificidade de 100,00%, exceção à SAR que apresentou especificidade de 94,06%. A concordância entre os resultados dos testes sorológicos conferiram grande confiança quanto ao estado sanitário dos animais utilizados neste grupo, isto é, quanto à ausência de infecção brucélica, indicando que os critérios adotados para a composição do mesmo foram satisfatórios.

A figura 02 ilustra as sensibilidades obtidas para os testes executados no grupo 02.

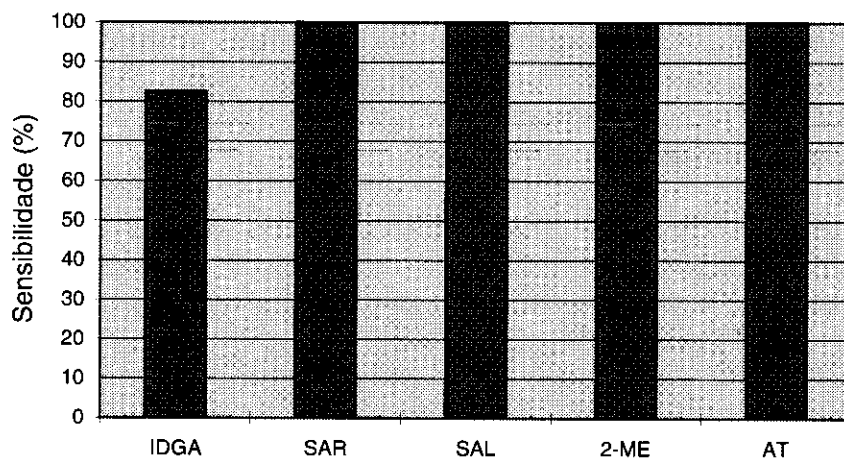


Figura 02: Sensibilidade do IDGA, SAR, SAL, 2-ME e AT no grupo 02.

Todos os testes apresentaram-se 100,00% concordantes com a RFC, à exceção do IDGA que apresentou a menor sensibilidade (82,40%) dentre as técnicas avaliadas para o grupo. A sensibilidade apresentada pelo IDGA foi inferior às sensibilidades obtidas por Lord et al. (1989), Pinochet et al. (1989) e Pinochet et al. (1990)

com valores de 87,50%, 86,40% e 92,30%, respectivamente. Entretanto, foi observada concordância qualitativa entre os resultados, uma vez que, nestes trabalhos, os autores obtiveram as menores sensibilidades para o IDGA em relação às demais técnicas avaliadas, à semelhança do presente estudo.

As sensibilidades apresentadas pela SAR, SAL e 2-ME para o grupo 02 foram superiores às relatadas por Agottani & Gonçalves (1996). A sensibilidade do AT neste grupo foi próxima da obtida por Nicoletti & Muraschi (1966), mas as sensibilidades verificadas pelos referidos autores à SAR e SAL, 66,00% e 61,00%, respectivamente, foram muito inferiores às observadas no presente estudo. A sensibilidade observada por Corrêa de Sá (1989) para AT, SAL e 2-ME foram as que mais se aproximaram dos resultados do presente estudo.

As diferenças observadas entre os resultados podem estar relacionadas com os diferentes padrões de interpretação adotados e ao fato dos suspeitos terem sido interpretados como positivos para fins de determinação da sensibilidade.

Destaca-se no grupo 02 (Fig. 02) a concordância absoluta entre os resultados da RFC e do AT, o que evidencia a alta sensibilidade desta técnica (Olascoaga, 1976; Hornitzky & Searson, 1986; Corrêa de Sá, 1989; Poester & Thiessen, 1994).

As figuras 03 e 04 relacionam a sensibilidade apresentada pelo IDGA em relação aos títulos observados nos testes executados para o grupo 02.

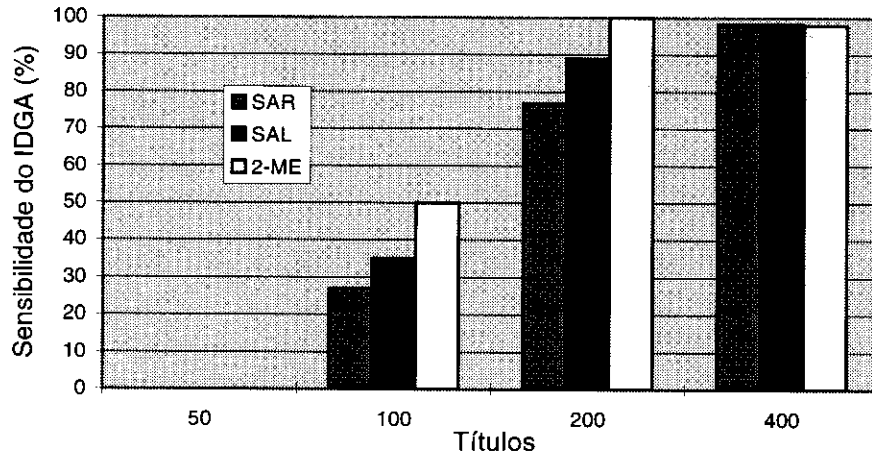


Figura 03: Sensibilidade do IDGA relativa aos títulos à SAR, SAL e 2-ME no grupo 02.

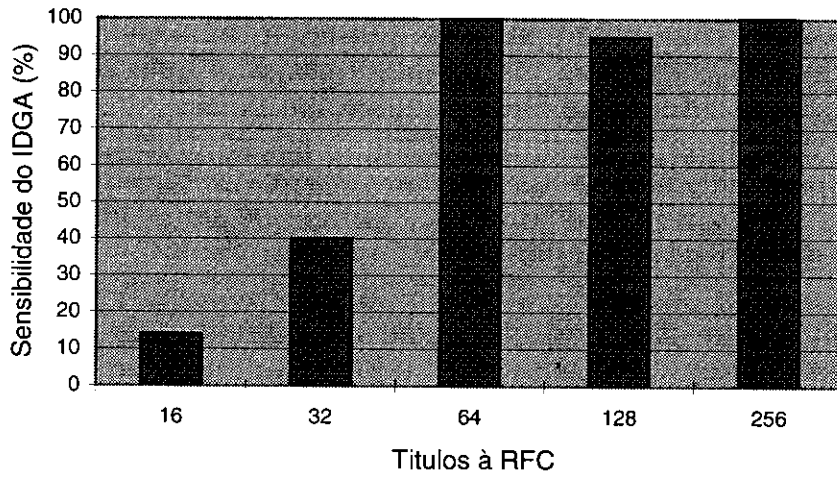


Figura 04: Sensibilidade do IDGA relativa aos títulos à RFC no grupo 02 (animais infectados).

O teste de imunodifusão apresentou sensibilidade nula quando os títulos foram $\leq 1:50$ à SAR, SAL e 2-ME no grupo 02 e sensibilidade reduzida quando os mesmos foram de 1:100 à SAR e SAL e $\leq 1:32$ à RFC (Fig. 03 e 04). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Pinochet et al. (1989) e Pinochet et al. (1990).

À medida que aumentavam os títulos à SAR, SAL, 2-ME e RFC, ocorria correspondente aumento na proporção de animais positivos ao IDGA, determinando que para títulos $\geq 1:400$ à SAR e SAL, $\geq 1:200$ ao 2-ME ou $\geq 1:64$ à RFC, a sensibilidade do teste e a concordância com a RFC fossem elevadas (Fig. 03 e 04). Estes achados estão em concordância com Jones et al. (1980) e Díaz (1994) e Lord et al. (1989) que observaram correlação positiva entre os resultados do AT e RFC com os do IDGA para bovinos infectados que apresentavam títulos sorológicos $\geq 1:100$ UI/ml.

Verificou-se que as amostras reagentes ao IDGA nos grupos vacinados (falso-positivos) e no grupo infectado apresentavam geralmente altos títulos nas provas quantitativas avaliadas. Estes resultados indicam que a resposta ao polissacarídeo "O", seja na infecção natural, seja em resposta à vacinação, depende de um estímulo antigênico intenso normalmente associado à infecção ativa pela amostra de campo ou vacinal, conforme relataram Díaz et al. (1979) e Corrêa de Sá (1989).

Uma amostra (0,009%) do grupo 02 que apresentou títulos de 1:400 à SAR, SAL e 2-ME e de 1:128 à RFC foi negativa ao teste de imunodifusão, determinando que a sensibilidade do IDGA, quando o 2-ME apresentava-se positivo na diluição de 1:400, fosse menor que quando este mesmo título era de 1:200. O mesmo fenômeno foi observado com relação à RFC, onde 100,00% das amostras que apresentaram títulos de 1:64 foram positivas ao IDGA e somente 95,00% quando o título foi de 1:128. Este comportamento, atípico

para o grupo, também foi observado por Cherwonogrodsky & Nielsen (1988) em amostras que apresentavam altos títulos sorológicos ao ELISA, SAL e RFC. Estudos mais profundos acerca da estrutura antigênica da *Brucella abortus* devem ser conduzidos afim de que tais fenômenos possam ser devidamente explicados.

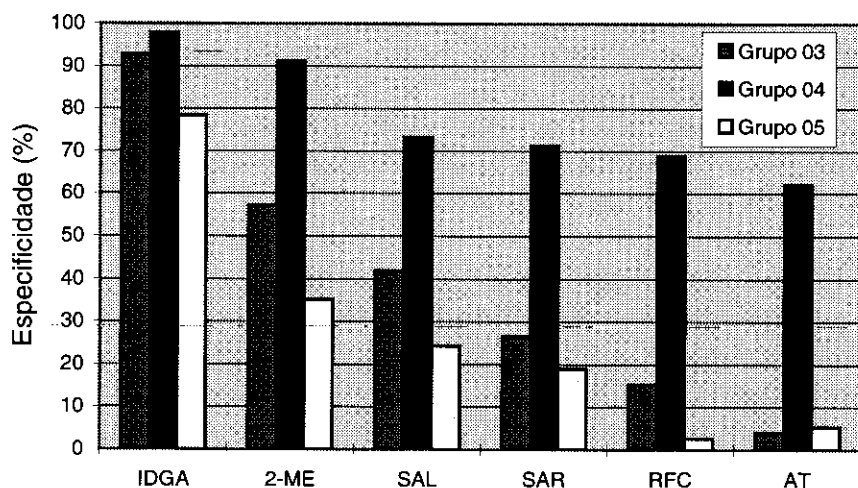


Figura 05: Especificidade do IDGA, 2-ME, SAL, SAR, RFC e AT nos grupos 03, 04 e 05.

A figura 05 ilustra as especificidades dos testes sorológicos avaliados para os grupos vacinados (03, 04 e 05).

As especificidades obtidas nos grupos vacinados tiveram como referencial os resultados da RFC realizada previamente à vacinação, à qual todos os animais se apresentaram negativos.

O IDGA apresentou alta especificidade no grupo das bezerras vacinadas com dose padrão (92,85%) e no grupo das novilhas vacinadas com dose reduzida (97,77%), ocasião em que apresentam geralmente elevados títulos séricos de anticorpos, especialmente no grupo 03, onde foi utilizada a dose vacinal padrão. Por outro lado, a

técnica apresentou baixa especificidade (78,37%), quando realizada nas mesmas condições para animais púberes vacinados com dose padrão (grupo 05). Os resultados obtidos nos grupos 03, 04 e 05 se mostraram diferentes dos relatados por Cherwonogrodsky & Nielsen (1988), Lord et al. (1989), Pinochet et al. (1989) e Pinochet et al. (1990) que obtiveram especificidade de 100,00% para o IDGA realizado em condições experimentais semelhantes. Entretanto, verificou-se que o IDGA, em relação às demais técnicas avaliadas, sempre apresentou a melhor especificidade nos grupos vacinados, seguido pelo 2-ME, SAL, SAR, RFC e AT. Os resultados obtidos por Jones et al. (1980) e Corrêa de Sá (1989) na imunodifusão foram os que mais se aproximaram dos resultados observados no presente experimento.

As especificidades apresentadas pelo AT, RFC, SAR, SAL e 2-ME no grupo 03 foram de 4,08%, 15,30%, 26,53%, 41,83% e 57,14%, respectivamente (Fig. 05). As especificidades obtidas por Lord et al. (1989) ao AT (46,76%), à SAL (45,61%) e à RFC (44,68%) para bezerras vacinadas em condições semelhantes e avaliadas dois meses pv foram superiores às obtidas no presente trabalho, ao passo que a especificidade obtida ao 2-ME (52,55%) foi semelhante. As especificidades observadas por Sutherland (1984) e Pinochet et al. (1989) à SAL e RFC se aproximam dos valores obtidos no presente trabalho, mas a especificidade verificada ao AT por estes autores (14,67%) foi superior. Corrêa de Sá (1989) obteve especificidade nula para as técnicas de SAL, 2-ME, RFC e AT quando bezerras vacinadas com dose padrão foram avaliadas 20 dias pv, ocasião em que o teste de imunodifusão empregando o polissacarídeo "O" apontava cerca de 20% de reagentes.

Na RFC realizada após a vacinação no grupo 03, predominaram títulos mais baixos em relação ao grupo 02, embora tenha sido elevada a proporção de reagentes naquele grupo. Estes resultados indicam que animais vacinados geralmente respondem com títulos

de anticorpos fixadores mais baixos em relação à infecção mesmo em períodos recentes após a vacinação.

A diferença marcante do grupo 02 em relação ao grupo 03 foi que, neste, amostras que apresentavam altos títulos nos diferentes testes realizados tenderam a apresentar resultados negativos ao IDGA, demonstrando que o teste apresenta especificidade satisfatória mesmo em animais recém vacinados. Segundo Corrêa de Sá (1989), podem ocorrer reações positivas no teste de imunodifusão empregando o polissacarídeo "O" até seis meses após a vacinação de bezerras com dose padrão.

As diferenças de especificidades observadas à SAR, SAL e 2-ME no grupo 03 em relação à literatura podem ser justificadas pela alta proporção de amostras que apresentaram títulos suspeitos frente à estas mesmas técnicas e que foram classificadas como positivas, além de diferenças com relação à idade dos animais à vacinação, período decorrido entre a vacinação e sangria e padrões de interpretação adotados para estes testes.

A melhor especificidade no grupo 04 (Fig.05) foi observada para o teste de IDGA, seguido por 2-ME, SAL, SAR, RFC e AT com 97,77%, 91,11%, 73,33%, 71,11%, 68,88% e 62,22%, respectivamente. Os resultados foram superiores aos observados por Poester & Thiessen (1994) que encontraram 55,00%, 40,00% e 85,00% de especificidade nos testes de SAL, AT e 2-ME, respectivamente, em condições experimentais semelhantes.

Lord et al. (1989) encontraram, para bovinos adultos vacinados com dose reduzida ($3,0 \times 10^9$) por via subcutânea e avaliados 30 dias pv, especificidades de 5,56%, 5,56%, 6,95% e 13,89% à SAL, 2-ME, AT e RFC, respectivamente. Os valores de especificidades obtidos por estes autores foram, à exceção do IDGA, muito inferiores aos verificados no presente trabalho. As diferenças observadas podem estar relacionadas às diferentes vias de

inoculação utilizadas, uma vez que os critérios de interpretação dos testes foram semelhantes. Esta argumentação é endossada por Manthei et al. (1952), onde relatam que a dose de $2,4 \times 10^9$ UFC aplicada pela via subcutânea induz resposta sorológica semelhante à determinada pela vacinação com dose padrão.

Verificou-se no grupo 04, à semelhança dos resultados obtidos por Jones et al. (1980), menor proporção de animais com títulos positivos e suspeitos em todos os testes executados em relação aos grupos 03 e 05, o que determinou melhores valores de especificidade para todas as técnicas no grupo 04 (Fig. 05). AT e RFC apresentaram os maiores percentuais de reagentes positivos, com 37,78% e 22,22%, respectivamente. As especificidades obtidas nestes testes foram superiores às observadas por Alton & Comer (1981). O IDGA e 2-ME apresentaram os menores índices de reagentes (2,22%), sendo que o 2-ME revelou ainda baixa proporção de reações suspeitas (6,66%), diferindo, neste aspecto, do padrão apresentado pelos demais grupos vacinados.

No grupo 04, predominaram títulos baixos à SAR e SAL com cerca de 70% das amostras com títulos 1:50, 25% com título de 1:100 e nenhuma amostra com título maior que 1:200. No 2-ME, 53,33% das amostras foram negativas e 37,77% apresentaram títulos entre 1:25 e 1:50. A RFC apresentou o mesmo comportamento, não tendo ocorrido reação em 68,88% das amostras, tendo as demais amostras apresentado títulos $\leq 1:32$.

Um dos animais (2,22%) do grupo 04 apresentou título de 1:128 e se mostrou reagente ao teste de imunodifusão e demais testes realizados. O comportamento esdrúxulo deste animal em relação ao restante do grupo pode ser explicado pela variação do período de incubação da doença conforme observado por Plommet et al. (1973), no qual constataram o longo período de incubação da doença em bezerras filhas de vacas brucélicas que manifestavam

sorologia geralmente negativa até poucas semanas antes do parto ou aborto. Outra explicação seria que, ao se fazer a vacinação de adultos com dose padrão ou reduzida, alguns animais poderiam desenvolver infecção persistente pela amostra vacinal, ocasionando títulos vacinais residuais por longos períodos conforme observaram Alton & Corner (1981). Nestas circunstâncias, os animais poderiam apresentar resultados positivos nas sorologias de rotina para a brucelose, inclusive no teste de imunodifusão (Díaz et al. 1979; Díaz, 1994).

A vacinação de adultos com dose reduzida determinou resposta sorológica de baixa intensidade e de curta duração em relação às demais formas de vacinação avaliadas, corroborando os resultados obtidos por Viana et al. (1982), Plommet & Fensterbank (1984), Crawford et al. (1988), Lord et al. (1989), Viana et al. (1989) e Viana et al. (1995).

As especificidades obtidas para o grupo 05 (Fig. 05) foram de 2,70%, 5,40%, 18,91%, 24,32%, 35,13% e 78,37% para RFC, AT, SAR, SAL, 2-ME e IDGA, respectivamente. Os resultados do AT e da RFC se mostraram diferentes dos obtidos por Lord et al. (1989) que obtiveram especificidades de 24,25% e 28,04%, respectivamente. Estes autores verificaram que o AT apresentou especificidade maior que a SAL e o 2-ME, contrariando os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que o AT é uma das técnicas de menor especificidade (Olascoaga, 1976; Alton et al., 1988; Corrêa de Sá, 1989; Agottani & Gonçalves, 1996). Os resultados obtidos à RFC e SAL para o grupo 05 foram semelhantes aos observados por Sutherland (1984).

As amostras do grupo 05 apresentaram títulos predominantemente mais elevados em relação aos grupos 03 e 04 em todos os testes quantitativos avaliados. O fenômeno talvez esteja relacionado com o fato destes animais se encontrarem em puberdade ou até mesmo sexualmente maduros, quando pode ocorrer infecção persistente

sorologia geralmente negativa até poucas semanas antes do parto ou aborto. Outra explicação seria que, ao se fazer a vacinação de adultos com dose padrão ou reduzida, alguns animais poderiam desenvolver infecção persistente pela amostra vacinal, ocasionando títulos vacinais residuais por longos períodos conforme observaram Alton & Corner (1981). Nestas circunstâncias, os animais poderiam apresentar resultados positivos nas sorologias de rotina para a brucelose, inclusive no teste de imunodifusão (Díaz et al. 1979; Díaz, 1994).

A vacinação de adultos com dose reduzida determinou resposta sorológica de baixa intensidade e de curta duração em relação às demais formas de vacinação avaliadas, corroborando os resultados obtidos por Viana et al. (1982), Plommet & Fensterbank (1984), Crawford et al. (1988), Lord et al. (1989), Viana et al. (1989) e Viana et al. (1995).

As especificidades obtidas para o grupo 05 (Fig. 05) foram de 2,70%, 5,40%, 18,91%, 24,32%, 35,13% e 78,37% para RFC, AT, SAR, SAL, 2-ME e IDGA, respectivamente. Os resultados do AT e da RFC se mostraram diferentes dos obtidos por Lord et al. (1989) que obtiveram especificidades de 24,25% e 28,04%, respectivamente. Estes autores verificaram que o AT apresentou especificidade maior que a SAL e o 2-ME, contrariando os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que o AT é uma das técnicas de menor especificidade (Olascoaga, 1976; Alton et al., 1988; Corrêa de Sá, 1989; Agottani & Gonçalves, 1996). Os resultados obtidos à RFC e SAL para o grupo 05 foram semelhantes aos observados por Sutherland (1984).

As amostras do grupo 05 apresentaram títulos predominantemente mais elevados em relação aos grupos 03 e 04 em todos os testes quantitativos avaliados. O fenômeno talvez esteja relacionado com o fato destes animais se encontrarem em puberdade ou até mesmo sexualmente maduros, quando pode ocorrer infecção persistente

pela amostra vacinal, ocasionando resposta sorológica mais intensa e prolongada conforme relataram Nielsen & Duncan (1988).

Um animal (2,70%) do grupo 05 não apresentou reação sorológica em nenhum dos testes realizados. A ausência de títulos sorológicos não pode contudo ser associada com falha vacinal, uma vez que não se pode estabelecer correlação entre títulos sorológicos e grau de imunidade no caso da brucelose (Sutherland, 1980). Esta observação, ao lado da grande dispersão de títulos nas diversas técnicas avaliadas, demonstraram a grande variabilidade da resposta individual e a importância do histórico e diagnóstico de rebanho.

O elevado percentual de reações falso-positivas verificado para o grupo 05 inviabiliza a utilização de quaisquer dos testes realizados para a determinação da natureza das imunoglobulinas quando se repetem as condições experimentais.

Nos grupos vacinados (Fig. 05), todas as técnicas avaliadas apresentaram maior especificidade no grupo 04 em relação ao grupo 03, enquanto no grupo 05 foram obtidas geralmente as menores especificidades. A especificidade apresentada pelo IDGA sempre foi maior em relação às demais técnicas avaliadas nos grupos vacinados, vindo a seguir o 2-ME, SAL, SAR, RFC e AT, à exceção do grupo 05, onde AT apresentou menor especificidade que a RFC.

A elevada proporção de animais reagentes à RFC realizada após a vacinação determinou baixa especificidade para a técnica nos grupos vacinados (Fig. 05), inviabilizando a utilização da mesma em animais recém vacinados. Segundo Nicolleti (1969) e Nielsen (1995), o teste somente poderia ser utilizado seis meses após a vacinação de bezerras com dose padrão e idade entre três e oito meses.

O teste do 2-ME apresentou, depois do teste de imunodifusão, a melhor especificidade nos grupos vacinados (Fig. 05). Este comportamento se justifica pelo fato da técnica detectar seletivamente as imunoglobulinas da classe IgG, uma vez que IgM é inativada pelo 2-Mercaptoetanol (Olascoaga, 1976; Agottani & Gonçalves, 1996).

Alton et al. (1988) relatou que o AT apresentava baixa especificidade, determinando elevado percentual de reações falso-positivas. Esse fato somente foi evidenciado para os grupos vacinados, não tendo sido verificado nos grupos 01 e 02 (grupos não vacinados), onde a concordância com a RFC foi de 100,00% (Fig. 01 e 02). Estes dados vêm demonstrar a possibilidade de utilização do teste como alternativa aos demais testes de diagnóstico para a brucelose bovina em rebanhos onde não se pratique a vacinação, tendo em vista a facilidade de execução, maior rapidez e menor custo.

A alta proporção de amostras apresentando títulos suspeitos à SAR, SAL e 2-ME no grupo infectado e nos grupos vacinados dificultou a determinação precisa da sensibilidade e especificidade, uma vez que utilizam-se somente resultados positivos e negativos para o cálculo das mesmas. Os critérios de interpretação adotados para estes testes provocaram aumento da sensibilidade no grupo 02 e queda da especificidade nos demais grupos experimentais, sendo este efeito mais pronunciado nos grupos vacinados que apresentaram maior proporção de suspeitos em relação aos grupos não vacinados. Segundo Nicoletti & Tanya (1993), fatores como a prevalência da doença, custo dos testes e implicações de resultados falso-positivos e falso-negativos é que irão determinar se é melhor maximizar a sensibilidade ou a especificidade.

Houve grande dificuldade em comparar os valores de sensibilidade e especificidade das técnicas aqui executadas em relação com os achados da literatura. As discrepâncias observadas podem estar associadas aos diferentes padrões de interpretação adotados para os resultados dos testes; ao tratamento dado aos títulos suspeitos e aos diferentes critérios adotados para a composição dos grupos experimentais. No caso do IDGA, as diferenças observadas podem estar relacionadas ainda com as diferentes técnicas de obtenção do antígeno que podem resultar em antígenos com propriedades imunológicas semelhantes, mas com diferentes graus de pureza, determinando diferenças na sensibilidade e especificidade dos testes realizados à partir destes antígenos.

O IDGA), apesar da alta especificidade exibida nos grupos 01 (Fig. 01), 03 e 04 (Fig. 05), não se mostrou satisfatório como teste complementar devido à baixa sensibilidade verificada no grupo dos animais infectados (Fig. 02), especialmente quando se consideraram os animais que apresentaram baixos títulos sorológicos nas técnicas quantitativas avaliadas (Fig. 03 e 04). Um dos maiores problemas com relação ao diagnóstico da brucelose bovina diz respeito às reações suspeitas que podem estar associadas à reação vacinal residual, reações inespecíficas ou brucelose crônica, situações nas quais é comum a ocorrência de títulos sorológicos baixos e às vezes até não detectáveis como relataram Viana et al. (1981). Um bom teste confirmatório deveria apresentar alta especificidade aliada à uma boa sensibilidade, afim de que animais infectados detectados na triagem não permaneçam no rebanho, retardando ou mesmo inviabilizando o programa de controle e erradicação da doença.

Tendo em vista a alta especificidade apresentada pelo IDGA no grupo das bezerras vacinadas com dose padrão e no grupo dos animais adultos vacinados com dose reduzida (Fig. 05), o animal reagente ao IDGA nestes grupos teria grande probabilidade de se

encontrar infectado, embora o teste pudesse determinar a ocorrência de reações falsos positivas.

Embora as técnicas de SAR, SAL, 2-ME, AT e RFC tenham apresentado sensibilidade e especificidade satisfatórias nos grupos não vacinados (Fig. 01 e 02), apresentaram, à exceção do 2-ME no grupo 04, baixos valores de especificidade nos grupos vacinados (Fig. 05), desqualificando-as para propósitos de diagnóstico nas condições do presente experimento.

5. CONCLUSÕES

1-O teste de Imunodifusão Dupla em Ágar Gel apresenta maior especificidade em relação à Soroaglutinação Rápida, Soroaglutinação Lenta, teste do 2-Mercaptoetanol, Reação de Fixação de Complemento e teste do Antígeno Tamponado Acidificado em animais recém vacinados.

2-O teste de Imunodifusão Dupla em Ágar Gel apresenta baixa sensibilidade quando as amostras apresentam títulos baixos à Soroaglutinação Rápida, Soroaglutinação Lenta, teste do 2-Mercaptoetanol e Reação de Fixação de Complemento, restringindo sua utilização no diagnóstico da brucelose bovina.

3-Todos os testes avaliados, à exceção do teste de Imunodifusão Dupla em Ágar Gel nos grupos 03 e 04 e do teste do 2-Mercaptoetanol no grupo 04, apresentaram baixos valores de especificidade nos grupos vacinados, inviabilizando a utilização dos mesmos para fins de diagnóstico.

4-Nenhuma das técnicas avaliadas permitiu discriminar com segurança absoluta anticorpos vacinais de anticorpos induzidos pela infecção natural.

SUMMARY

Agar gel immunodiffusion test (AGID) using the O-polysaccharide was compared with serologic tests used in brucellosis diagnostic in no infected, infected and early vaccinated cattle with strain B-19, in order to differentiate vaccinal antibodies from those resulting of natural infection by *Brucella abortus*.

None of the techniques can differentiate with absolute reliance the vaccinal antibodies from antibodies associated with natural infection to *Brucella abortus*. Moreover, according to the results of this paper, the use of AGID with this objective would cause maintenance of infected animals in the herd.

Key words: Bovine, Brucellosis, Diagnostic.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTON, G.G. & CORNER, L.A. Vaccination of heifers with a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19 vaccine before first mating. **Australian Veterinary Journal**, v.57, p.548-550, 1981.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, 1988.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL**, Brasília: M.A.A, Departamento de Defesa Sanitária Animal, v.20, n.1-4, 1997. Brucelose bovina.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 23/76, de 20 de janeiro de 1976. **Diário Oficial da União**, 1976.
- BUCK, J.M. Studies of vaccination during calthood to prevent bovine infectious abortion. **Journal Agricultural Research**, v.41, p.667-689,1930.
- CHERWONOGRODZKY, J.W.; NIELSEN, K.H. *Brucella abortus* 1119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19 vaccinated and field-strain-infected cattle by agar gel immunodiffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.6, p.1120-1123, 1988.

CORRÊA DE SÁ, M.I.V.C. Brucelose bovina. Avaliação da prova de imunodifusão radial com o antígeno Hapteno Nativo (HN) no diagnóstico sorológico da brucelose em animais infectados e vacinados. Estudo comparativo com outras provas sorológicas. **Rep. Trab.**, v.21, p.11-44, 1989.

CRAWFORD, R.P.; ADANS, L.G.; CHILDERS, A.B. Value of serologic reactions at 2 months following strain 19 vaccination of cattle herds with brucellosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.5, p.275-280, 1988.

DAJER, A.; GUTIERREZ, E.; HONHOLD, N.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S. Comparison of five serological tests to detect *Brucella abortus* antibodies and a report on prevalence of the disease in livestock in state of Yucatan, Mexico. **Regional Network for America on Animal Disease Diagnosis Using Immunoassay and Labelled DNA Probe Techniques**. Costa Rica, October, 1990.

DÍAZ, R.; GARATEA, P.; JONES, L.M.; MORYIÓN, I. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.10, n.1, p.37-41, 1979.

DÍAZ, R. Diagnostico de la brucelosis bovina. In: **Jornadas Internacionales Sobre Brucelosis**, Madrid-España, 23-25 Noviembre, p. 01-18, 1994.

EPI INFO 6. A word processing, database and estatistic programs for public health. Geneve: **WHO**: 1994. Version 6.02.

GRAPHPAD INSTAT. Copyright © 1990 GraphPad Software. Version 1.15. Lane D. Foil, Louisiana State University. 921745S

- HORNITZKY, M. & SEARSON, J. The relation between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.63, n.6, p.172-174, 1986.
- HUBER, J.D. & NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal Veterinary Research**, v.47, n.07, p.1529-1531, 1986.
- JONES, M.L.; BERMAN, D.T.; MORENO, E.; DEYOI, B.L.; GILSDORF, M.J.; HUBER, J.D.; NICOLETTI, P. Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.12, n.6, p.753-760, 1980.
- LORD, V.R.; ROLO, M R.; CHERWONOGRODZKY, J.W. Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp in cattle by use of an agar gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.11, p.1813-1816, 1989.
- MANTHEI, C.A.; MINGLE, C.K.; CARTER, R.W. Comparison of immunity and agglutinin response in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 by intradermal and subcutaneous methods. **Proceedures Annual Meeting U.S Livest. Sanit. Assoc.**, v.56, p.100-114, 1952.
- NICOLETTI, P. & MURASCHI, T.F. Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problem cattle herds. **American Journal Veterinary Research**, v.27, p.689-694, 1966.
-

NICOLETTI, P. Further evaluation of serological test procedures used to diagnose brucellosis. **American Journal Veterinary Research**, v.30, p.1811-1816, 1969.

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. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.202, n.12, 1993.

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. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.173, n.11, p.1145-1149, 1978.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archives Medicine Veterinary, N. Extraordinario**, p.09-22, 1995.

NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. Antibody isotype response in adult cattle vaccinated with *Brucella abortus* S19. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.19, p.205-214, 1988.

OLASCOAGA, C.R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, v.18, n.3-4, p.107-41, 1976.

PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; RENOUX, G.; GESTIN, J.; PHILIPPON, A. Brucellose bovine experimentale. XII- Persistence a la âge adulte de la infection congénitale de la génisse. **Am. Rech. Veter.**, v.4, n.3, p.419-435, 1973.

- PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R. La vaccination antibrucellique administrée par voie conjontivale. **Dev. Biol. Stand.**, v.56, p.681-87, 1984.
- PINOCHET, L.V.; ÁBALOS, P.P.; SÁNCHEZ, M.L.; PALAVICINO, I.H.; VENT, M.A. Preparacion y evaluacion de un antígeno para descartar respuesta postvacunal a *Brucella abortus* cepa 19. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.4, n.1, p.43-48, 1989.
- PINOCHET, L.V.; ÁBALOS, P.P.; STEPHENS, L.K.; DURÁN, M.N. Normalización de un antígeno soluble para descartar respuesta postvacunal a *Brucella abortus* cepa 19. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.5, n.02, p.119-123, 1990.
- POESTER, F.P.; THIESSEN, S.V. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande do Sul. **Memorias del XIV Congresso Panamericano de Ciencias Veterinarias**, Acapulco-México, 09-15 octubre, p.520-523, 1994.
- AGOTTANI, J. V. B.; GONÇALVES, M. L. L. Brucelose. In: Tuberculose bovina, brucelose e portaria ministerial 23/76. Curitiba: Divisão de Defesa Sanitária Animal, 1996.p.25-51.
- STEVENS, M. G.; HENNAGER, S.G.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, F.N. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.4, p.1065-1066, 1994.
- SUTHERLAND, S.S. Immunology of bovine brucellosis. **The Veterinary Bulletin**, v.50, n.05. p.359-368, 1980.
-

SUTHERLAND, S.S. Evaluation of the enzyme-linked-immunosorbent assay in the detection of cattle infected with *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v.10, p.23-32, 1984.

VIANA, F.C.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; REBELO, R. M. Avaliação de testes sorológicos no diagnóstico de brucelose crônica. **Arquivos Escola de Veterinária da UFMG**, v.33, n.2, p.277-285, 1981.

VIANA, F.C.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; VILELA, L.G.; MENDES, G.J.; DIAS, O.T. Vacinação contra a brucelose bovina com dose reduzida (Amostra B-19) por via conjuntival. **Arquivos Escola de Veterinária UFMG**, v.34, n.2, p.279-287, 1982.

VIANA, F.C.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; MODENA, C. M.; TORRES, A. M. C. Avaliação técnica da estratégia de vacinação contra brucelose bovina com dose reduzida (amostra B-19). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.41, n.3, p.191-204, 1989.

VIANA, F.C.; SILVA, J.A.; FONSECA, V. O.; ANGELI, J. L.; SILVA, I. J. Vacinação de reprodutores bovinos com a amostra B-19 em dose reduzida por via conjuntival. I- Pesquisa de aglutininas anti-*Brucella* no soro sanguíneo e líquido seminal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.1, p.7-14, 1995.