

T636.089 69  
S 2376  
1975

PEDRO PAULO ORNELLAS DOS SANTOS

BRUCELOSE BOVINA: ANTICORPOS BLOQUEADORES DA AGLUTINAÇÃO  
E RESISTENTES AO 2-MERCAPTOETANOL EM  
SOROS SANGUÍNEOS DE BOVINOS NÃO VACI -  
NADOS E VACINADOS COM AS AMOSTRAS B-19  
E 45/20.

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



467078803

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

OK  
02/03/04/06

Tese apresentada ao Departamento de  
Medicina Veterinária Preventiva da  
Escola de Veterinária da Universi -  
dade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Medicina Veteri -  
nária.

BIBLIOTECA - ESCOLA DE VETERINARIA UFMG

Belo Horizonte

Minas Gerais - BRASIL

1975

EDITADO POR:  
Fundação de Estudo e Pesquisa em  
Medicina Veterinária Preventiva  
Caixa Postal 567-Fone: 442-6734  
BELO HORIZONTE -- MINAS GERAIS

Tese aprovada em 05/12/1975

BANCA EXAMINADORA

Donaldo Reis

Prof. Donaldo Reis

Moreira

Prof. Elvio Carlos Moreira

Fred Emil Bräutigam Rivera

Prof. Fred Emil Bräutigam  
Rivera

*iii*

*Agradecimientos*



RONALDO REIS - Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - ORIENTADOR

ELVIO CARLOS MOREIRA- Professor Assistente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - CONSELHEIRO

MARÍLIA DA CONCEIÇÃO NOGUEIRA - LABORATORISTA



v

Conteúdo

INDICEPáginas

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	7
3. Material e Métodos	12
4. Resultados	19
5. Discussão	28
6. Conclusões	33
7. Resumo	36
8. Summary	40
9. Referências Bibliográficas	44

1. INTRODUÇÃO



A brucelose é uma enfermidade amplamente difundida em bovinos, suínos e caprinos nas Américas. O homem pode contrair a doença através de contato com animais infectados ou consumindo produtos crus de origem animal.

Grandes são as perdas que a brucelose bovina causa na economia de diferentes países. Algumas estimativas realizadas revelam que os prejuízos anuais são bastante grandes (APHIS, 1972).

Os prejuízos em milhões de dolares anuais em alguns países são os seguintes: Argentina 24,0; Costa Rica 1,5; Chile 4,0; México 20,0 e Uruguai 2,5.

Além de interferir bastante na exportação de bovinos, carnes e outros produtos, a área infectada paga pesado tributo a esta enfermidade e são as seguintes as estimativas das perdas sofridas pelos produtores devido a brucelose:

a produção de leite diminui em 22%; o número de bezerros perdidos (aborto) é de 40%; vacas livres de brucelose em média tem um bezerro em cada 11,5 meses, enquanto que vacas infectadas têm um bezerro em cada 20 meses e a necessidade de reposição de animais em rebanhos infectados aumenta em 30%.

A Dinamarca e a Suécia em 1957 praticamente erradicaram a brucelose de seus territórios e, no Brasil, programas sanitários estão sendo desenvolvidos para controle e posterior erradicação da brucelose animal.

Para a realização de um programa desta natureza é necessário o emprego de métodos precisos de diagnóstico.

Torna-se importante salientar que grandes são as dificuldades encontradas pelo veterinário de campo ao interpretar como negativos para brucelose os baixos títulos aglutinantes pelas provas clássicas de soroprecipitação em placa e em tubo (ALTON & JONES, 1969).

Embora extremamente úteis para levantamentos de prevalência e incidência em geral, estas provas apresentam limitações quanto a especificidade (falso reagente) e a sensibilidade (falsos negativos ou suspeitos) (HOERLEIN, 1953; ROSE & ROEPKE, 1957; ANDERSON & Cols., 1964 e AKKERMANS & HILL, 1972).

Estas limitações assumem maior importância nos programas de erradicação da doença. Por estas razões,



vários pesquisadores vem procurando desenvolver métodos cada vez mais sensíveis e específicos de diagnóstico da brucelose animal.

Reações cruzadas entre Brucella, Pasteurella, Versinia enterocolica sorotipo IX, e outros germes antigenicamente semelhantes, são relatados por vários autores (EMMEL & BOERVERS, 1932; STARR & SNIDER, 1934; WILSON, 1934 e CORBEL & DAY, 1973).

Praticamente todos os métodos propostos objetivam diferenciar aglutininas específicas de inespecíficas ou evidenciação de anticorpos incompletos, aumentando assim, a especificidade e sensibilidade.

- a) Teste do Cartão- "Card Test" (NICOLLETTI, 1967).
- b) Teste do antígeno acidificado (ROSE & ROEPKE, 1957).
- c) Teste de fixação de complemento (ANDERSON & Cols., 1964).
- d) Teste de imunofluorescência (MOODY & Cols., 1961).
- e) Teste da ultra-centrifugação (ROSE & Cols., 1964).
- f) Teste de inativação pelo calor (MORSE & Cols., 1955).
- g) Teste de Coombs (HALL, 1953).
- h) Teste do 2-Mercaptoetanol (ANDERSON & Cols., 1964).



Assim, os testes de Coombs (HALL & MANION, 1953); LE PENNEC & GOYON, 1965; LE PENNEC, 1966; McCAUGHEY & KERR, 1967 e Mc DEVITT, 1970) e do 2-Mercaptoetanol (ANDERSON & Cols., 1964; REDDIN & Cols., 1965 e ROSSI & CANTINI, 1968) têm sido usados, para diferenciar entre reações específicas e inespecíficas mas também para diferenciar aglutininas pós-vacinais das de infecção brucélica.

Atualmente o Brasil possui uma bovinocultura quantitativamente bastante desenvolvida, representada aproximadamente por 90.830.000 de cabeças, sendo que Minas Gerais 18.374.000 (BRASIL, 1974).

De 1966 a 1974 foram testados pelo soro-aglutinação 3.007.348 soros bovinos, tendo sido encontrado 4,9% suspeitos e 5,64% reagentes positivos. A brucelose constitui um dos fatores limitantes a seu crescimento e, com base nos levantamentos regionais, a doença ocorre em cerca de 10% da população bovina, com um índice médio de 20% de aborto.

O presente trabalho é uma tentativa de se conhecer melhor as reações de soro-aglutinação de bovinos e objetiva essencialmente:

- 1) Determinar a presença de anticorpos bloqueadores em soros de bovinos suspeitos de infecção brucélica natural, em bezerras vacinadas com amostra B-19 e vacas vacinadas com a amostra 45/20.
- 2) Avaliar a interferência causada pelos anticorpos blo-

queadores no diagnóstico da brucelose bovina pelas provas clássicas de soro-aglutinação em tubo;

- 3) Comparar os títulos das reações de Coombs, 2-Mer - captoetanol com as reações de tubo em bovinos suspeitos e vacinados contra brucelose.

2. REVISÃO DA LITERATURA



Ausência de aglutinação em significativo número de pessoas, reconhecidamente portadoras de brucelose, foram relatadas por WIENER (1944) e RACE (1944).

COOMBS & cols. (1945), empregando antiglobulina, evidenciaram a presença de anticorpos bloqueadores, principalmente contra o fator Rh, em soros humanos.

DICK & cols. (1947), relataram que após a revacinação de bovinos não infectados com brucela o sistema linfóide é estimulado a produzir em maior quantidade imuno-gamaglobulina M (IgM ou 19 s), enquanto nos animais infectados são formados imuno-gama-globulinas G (IgG ou 7s).

GRIFFITS (1947) demonstrou a existência de propriedades bloqueadoras da aglutinação, soro de humanos, com casos conhecidos de brucelose.

COX & KUTNER (1950) descreveram a ocorrência de anticorpos bloqueadores, em soros de bovinos, provenientes de rebanhos, clinicamente, suspeitos de possuírem infecção brucélica, embora com títulos aglutinantes de 10 U.I. ou negativos à prova em tubo, porém, quando submetido ao teste para anticorpos bloqueadores, títulos de 200 a 400 U.I. foram observados.

WILSON & MERRIFIELD (1951), examinando 130 soros provenientes de vários locais, concluíram que o método de Coombs é mais sensível do que os métodos convencionais. Este método provou efetivo aumento da sensibilidade da aglutinação, sem destruir sua especificidade (HALL & MANION, 1953).

FÓZ & GARRIGA (1954) enfatizam a importância e a frequência de anticorpos bloqueadores em casos de brucelose humana.

ZINNEMAN & cols. (1959) relatam que, os anticorpos aglutinantes eram encontrados nas frações gama e beta das globulinas de soros de pacientes brucêlicos, enquanto os anticorpos bloqueadores apareciam mais tardiamente, persistindo, por períodos mais longos, nas frações gama, passando, rapidamente, para as frações beta globulina, principalmente em pessoas com infecção subclínica ou crônica.

Estes anticorpos bloqueadores inibem, parcial ou totalmente, a aglutinação, quando adicionados em soro brucêlico de título conhecido.

KENYON & cols. (1961) sugeriram a aplicação do teste do 2-mercaptoetanol, para diferenciar aglutininas inespecíficas de específicas contra a brucelose.

HAJDU (1963) descreveu modificação da técnica de Coombs, verificando alta especificidade e fidelidade da prova, para o diagnóstico de brucelose, de aproximadamente 80.000 bovinos.

KOTSCHÉ (1963), examinando amostras de sangue de bovinos provenientes de áreas livres de brucelose, encontrou pelo método lento cerca de 0,87% de animais com reações de 50 U.I. e incompleta para 100 U.I.



ANDERSON & cols. (1964) verificaram a concordância de título entre os testes de fixação de complemento e as provas do leite e soro aglutinação em tubo quando aglutininas contra Brucella, resistentes ao 2-mercaptoetanol estavam presentes no soro sanguíneo e leite de bovinos.

NAGY & HIGNETT (1967), estudando o efeito da adição diária no leite, até o 15º dia de vida, de amostra virulenta de Brucella abortus, verificaram que os anticorpos bloqueadores eram evidenciáveis nos soros das bezerras duas a cinco semanas, após o aparecimento das aglutininas. Os títulos obtidos pelo método de Coombs eram superiores aos obtidos pelo método em tubo.

PANDA (1967), estudando 271 soros de cabras, constatou que 22, ou seja 8% eram reagentes positivos para o teste de anticorpos bloqueadores.

A destruição da atividade de anticorpo da macro-globulina, pela ação do 2-mercaptoetanol, oferece a oportunidade de classificar a distribuição dos anticorpos IgG e IgM, em bovinos positivos aos testes de tubo (ROSSI & CANTINI, 1968).

CUNNINGHAM (1968), estudou a resposta sorológica de bovinos vacinados. com a amostra 45/20, usando o teste de Coombs, fixação de complemento e o teste em tubo.



GARCIA-GARRILHO & SZYFRES (1970), vacinando bezerras holandesas, com idades variando de oito a quinze dias, com Brucella abortus, amostra B-19, concluíram que os animais com esta idade respondem, de forma variável e pouca intensa, à vacinação com amostra B-19. Os anticorpos fixadores do complemento e os resistentes ao 2-mercaptoetanol alcançam seu título máximo, mais tardiamente e se mantêm por períodos mais longos do que as aglutininas, nos animais vacinados entre oito e quinze dias de idade. A porcentagem de animais reagentes ao 2-mercaptoetanol é menor do que aos reagentes ao método em tubo.

GLAWISCHNIG & CORTES (1972) - usaram o teste do 2-mercaptoetanol, em soros de bovinos, para verificar a ocorrência de reagentes não específicos.

BEH (1974), observou que em bovinos vacinados com a amostra B-19 a maioria dos anticorpos são encontrados nas frações IgG, e IgM. Em bovinos que eram positivos ao teste de aglutinação a maioria estava em IgG<sub>1</sub> e pouco em IgM, sendo que os animais suspeitos tinham quantidades iguais de anticorpos em ambas as frações.

DAWSON & DURRANT (1975) relatam que os testes de Coombs e fixação de complemento, para fins de diagnóstico da brucelose equina, funcionam melhor que o teste lento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

### SOROS

Os animais que forneceram os soros para este trabalho foram divididos em dois grupos:

- a) Grupo I - soros de 921 fêmeas bovinas adultas de raças predominantemente zebuínas, não vacinadas contra brucelose e provenientes de 12 fazendas, situadas nos municípios de Pedro Leopoldo, Cordisburgo, Juiz de Fora, Jequitibã, Itambacuri e Corinto no Estado de Minas Gerais.
- b) Grupo II - soros de 18 fêmeas bovinas de raças zebuínas, vacinadas com a Brucella abortus amostra B-19, vacina comercial (dose de  $52,8 \times 10^8$  germes viáveis, subcutânea) ou 45/20 (dose de 2 ml intramuscular), vacina comercial com adjuvante oleoso.

Após a colheita do sangue, o soro era colocado em frascos de vidro, esterilizados, tipo penicilina, de 3 ml, identificados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Os soros dos animais do Grupo I foram divididos em três sub-grupos, da seguinte forma:

SUB-GRUPO I - 467 soros de bovinos, provenientes de três fazendas com títulos aglutinantes de até 25 Unidades Internacionais (U.I.).



SUB-GRUPO II - 402 soros de bovinos, provenientes de cinco fazendas com títulos aglutinantes de até 50 U.I.

SUB-GRUPO III- 52 soros de bovinos, provenientes de cinco fazendas, nas quais os animais apresentavam títulos aglutinantes menores, iguais ou maiores do que 100 U.I.

Os soros dos animais do Grupo II foram divididos em três sub-grupos, da seguinte forma:

SUB-GRUPO IV - 48 amostras de soros, provenientes de oito bezerras vacinadas com a Brucella abortus amostra B-19, nas idades entre um a 11 meses. Cada animal forneceu seis amostras de soro que foram colhidas ao sétimo, 30º, 120º, 270º, 330º e 600º dias após a vacinação.

SUB-GRUPO V - 20 amostras de soros, provenientes de cinco fêmeas adultas, vacinadas com a Brucella abortus amostra 45/20 (dose de 2 ml, intramuscular). Cada animal forneceu quatro amostras de soro, sendo que, foram colhidas ao sétimo e 30º dias após vacinação, e as outras foram colhidas com o mesmo intervalo após a revacinação efetuada cinco meses após a primeira.

SUB-GRUPO VI - 10 amostras de soros, provenientes de cinco novilhas vacinadas, com idades entre dois e 11 meses, com a Brucella abor-





tus, amostra B-19 ( dose de  $52,8 \times 10^8$  germes viáveis ) e desafiados com a Brucella abortus amostra 544 pela via conjuntival, na dose de  $20 \times 10^6$  germes viáveis. Cada animal forneceu duas amostras de soro, sendo que, uma foi colhida ao sétimo e a outra ao 30º dia após o desafio.

#### ANTÍGENOS

Para os testes de soro-aglutinação em tubo (SAT), 2-mercaptoetanol (2 ME) e Coombs, foi usado antígeno padrão gentilmente fornecido pelo Centro Panamericano de Zoonoses, Argentina. (partida série 23 e 24)

#### MÉTODOS SOROLÓGICOS

##### 1. Teste de soro- aglutinação em tubo

Foi conduzido, segundo o método decimal, de acordo com a técnica recomendada por UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE \_ NATIONAL ANIMAL DISEASE LABORATORY ( sem data ), consistindo no seguinte:

- a) com a pipeta especial, usada no método rápido, em placa, descarregar 0,08 ml de soro no primeiro tubo, 0,04 ml no segundo, 0,02 ml no terceiro, 0,01 no quarto e 0,005 ml no quinto tubo de hemólise;
- b) colocar 2,0 ml de antígeno para o método lento, previamente diluído a 1:100 em salina fenicada, em cada tubo. Isto resulta em diluições de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, respectivamente\*;

---

\* Para diluições maiores, dilui-se o soro a 1:16 e coloca-se as mesmas quantidades usadas para o soro não diluído; isto resulta em diluições de 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400.

- c) agitar e colocar em estufa a 37°C por 48 horas + 3 horas;
- d) Leitura.

## 2. Teste de Coombs

Foi realizado de acordo com a modificação feita por HAJDU (1963), porém com diluições a partir de 1:25 consistindo no seguinte:

- a) 2,3 ml de salina normal é colocada no primeiro tubo e 0,5 ml nos demais. Ao primeiro tubo adiciona-se 0,2 ml do soro a ser testado e aquecer a 70°C por 10 minutos;
- b) transfere-se 0,5 ml do primeiro tubo para o segundo, e após homogeneização, 0,5 ml desta mistura para o terceiro tubo e, assim por diante, descartando-se 0,5 ml do último tubo;
- c) colocar 0,5 ml do antígeno do método lento, previamente diluído a 1:100 em salina normal e incubar a 37°C por duas horas;
- d) colocar 1,5 ml de salina normal e homogeneizar;
- e) centrifugar a 3.000 r.p.m. 20 minutos, descartar o sobrenadante e colocar 2,0 ml de salina normal;
- f) repetir os itens d e e mais três vezes. Esta lavagem com salina é importante para remover todos os traços de soro;



- g) após a última centrifugação o depósito é resuspenso em 1,0 ml de anti-gama-globulina bovina previamente preparada;
- h) incubar a 37°C por 17-20 horas e fazer a leitura como no teste normal do tubo.

### 2.1. Produção de anti-gama-globulina bovina

A partir de um "pool" de soros de cinco bezerros, fracionou-se a gama-globulina com solução de sulfato de amônio a 3,12 M a 4°C, segundo a técnica preconizada por LEWIS & cols. (1964).

A gama-globulina assim obtida, foi inoculada em coelhos adultos de, aproximadamente, 2 kg (5 mg de gama-globulina em emulsão em volume igual de adjuvante completo de Freund, subcutânea).

Pela técnica anteriormente citada, obteve-se a anti-gama-globulina bovina que pela titulação em imunodifusão em lâmina, revelou-se positiva à diluição do antígeno a 1:320.

### 3. Teste do 2-Mercaptoetanol

Foi conduzido segundo o método decimal, de acordo com a técnica recomendada por UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - NATIONAL ANIMAL DISEASES LABORATORY (sem data), consistindo no seguinte:

- a) com a pipeta especial, usada no método rápido, em placa, descarregar 0,08 ml de soro no primeiro tubo, 0,04 ml no segundo, 0,02 ml no terceiro, 0,01 ml no quarto e 0,005 no quinto tubo de hemólise;

- b) colocar em cada tubo 1,0 ml de solução do 2-Mercaptoetanol a 0,1 M;
- c) colocar 1,0 ml do antígeno para o método lento, previamente diluído a 1:100 em salina normal. Isto resulta em diluições de 1:25 até 1:400;
- d) agitar e colocar em estufa a 37°C por 48 horas - <sup>+</sup> três horas;
- e) a leitura deve ser feita como no teste normal em tubo.



4. RESULTADOS

## GRUPO I

No SUB GRUPO I somente nove animais, ou seja, 1,92 % possuíam títulos aglutinantes de 25 U.I. apenas ao SAT e os restantes foram não reagentes aos três testes realizados.

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados dos SUB GRUPOS II e III, respectivamente.

No SUB GRUPO II observa-se, que somente 16 dos 402 animais testados (3,98%) possuíam títulos aglutinantes de 25 U.I. e eram não aglutinantes aos testes do 2-ME e de Coombs (Tabela 1).

A tabela 1 mostra ainda que 19 animais (4,72%) possuíam títulos de 50 U.I. e, destes 2 (10,53% tinham títulos iguais aos testes do 2-ME e de Coombs; 1 (5,27%) títulos de 25 U.I. aos testes do 2-ME e de Coombs; 14 (73,67%) foram não reagentes e 2 (10,53%) títulos de 25 U.I. somente no teste de Coombs ou no 2-ME. Dois animais, não reagentes ao SAT (0,49%), apresentavam títulos aglutinantes de 25 U.I. ao teste do 2-ME.

A tabela 2 mostra que no SUB GRUPO III, sete animais, entre 14 reagentes (50,00%), apresentavam, ao teste de Coombs, títulos superiores aos do SAT de uma a três diluições. Três animais apresentaram títulos mais altos ao 2-ME do que ao SAT e um animal título me-

nor. Sete animais tiveram títulos maiores ao teste de Coombs do que ao 2-ME e nenhum animal apresentou título menor.

#### GRUPO II

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados dos SUB GRUPOS IV e VI respectivamente.

No SUB GRUPO IV, a tabela 3 mostra que bezerras vacinadas com a amostra B-19, entre as idades de 1 a 11 meses, apresentam uma resposta sorológica máxima, aos sete dias, após a vacinação, com variação de 1.600 a 12.800 U.I.; aos 30 dias de 50 a 800; aos 120 dias de 25 a 400; aos 270 dias de 25 a 100; aos 330 dias de 50 a 100 e aos 600 dias de 25 a 100 U. I. (SAT).

Dois animais, de quatro, com idades inferiores a 60 dias, não apresentaram títulos aglutinantes ao SAT; Ao 2-ME um deles apresentou título de 25 U.I. e outro ao teste de Coombs apresentou título de 400 U.I. e título de 25 U.I. ao 2-ME aos sete dias, após a vacinação.

Os outros dois animais, após nove meses de vacinados, um apresentava os seguintes títulos aglutinantes: 50 U.I. ao SAT, 100 U.I. ao 2-ME e 400 U.I. ao teste de Coombs. Ao 11º e ao 20º mes os títulos eram de 50, 50 e 200 U.I. e de 0,0 e 50 U.I., respectivamente.



No SUB GRUPO V, composto de vacas vacinadas quando adultas com a amostra 45/20, ao sétimo e 30º dias após a vacinação e, ao 30º da revacinação ( cinco meses após a primeira ), os animais não apresentavam títulos aglutinantes, sendo que títulos de 25 U. I. foram observados sete dias após a revacinação somente ao SAT.

No SUB GRUPO VI, a tabela 4 mostra os resultados apresentados pelas bezerras vacinadas com a amostra B-19. e desafiadas com a Brucella abortus, amostra 544, no terço final da gestação.

Os títulos aglutinantes, sete dias após o desafio, variavam de 25 a 50 U.I. e no 30º dia de 25 a 200 U.I. ao SAT.

No 30º dia, tres animais apresentavam títulos de 100 ( dois ) e 200 U.I. ( um ) ao SAT e , um aumento de uma diluição foi observada em dois animais ao testes de Coombs e ao teste do 2º-ME, sendo que outro animal apresentava uma diluição menor aos testes de Coombs e 2-ME.

A tabela 4 mostra também que, bovinos de raças zebuínas, vacinados com a amostra B-19, entre as idades de 8 a 11 meses, à época do desafio, ou seja 840 dias após a vacinação, somente um animal apresentava título aglutinante de 25 U.I..

TABELA 1

Títulos aglutinantes (U.I.) pelos testes lento, 2-Mercaptoetanol e Coombs em 402 bovinos adultos provenientes de cinco fazendas, cujo título máximo encontrado foi de 50 unidades internacionais.  
(Sub Grupo II)

Nº de ordem	Soro nº	S.A.T.	ME	Coombs	Nº de ordem	Soro nº	S.A.T.	ME	Coombs
1	42 A	50	50	50	20	33 C	25	-	-
2	43 A	25	-	-	21	45 C	25	-	-
3	47 A	25	-	-	22	49 C	25	-	-
4	62 A	25	-	-	23	54 C	50	-	-
5	73 A	25	-	-	24	57 C	50	-	-
6	73 A1	50	50	50	25	47 D	25	-	-
7	1 B	25	-	-	26	53 D	25	-	-
8	2 B	25	-	-	27	56 D	50	-	-
9	3 B	50	-	-	28	57 D	50	-	-
10	8 B	25	-	-	29	58 D	50	-	-
11	14 B	25	-	-	30	59 D	50	-	-
12	20 B	50	-	-	31	60 D	50	-	-
13	21 B	50	-	-	32	61 D	50	-	-
14	24 B	25	-	-	33	63 D	50	25	-
15	33 B	50	-	-	34	64 D	50	-	-
16	2 C	50	25	25	35	67 D	25	-	-
17	14 C	-	25	-	36	69 D	-	25	-
18	27 C	50	25	-	37	72 D	50	-	-
19	32 C	25	-	-					

S.A.T. \* Teste do Soroaglutinação em tubo

2- ME = Teste do 2-Mercaptoetanol



TABELA 2

*Títulos aglutinantes (U.I.) pelos testes lento, 2-Mercaptoetanol e Coombs em 52 bovinos adultos provenientes de duas fazendas, nas quais títulos maiores do que 50 unidades internacionais foram encontrados .*

*( Sub Grupo III )*

<i>Nº de ordem</i>	<i>Soro nº</i>	<i>S.A.T.</i>	<i>ME</i>	<i>Coombs</i>
1	1 A	200	400	400
2	11 A	800	800	800
3	14 A	50	50	100
4	16 A	800	800	800
5	17 A	200	200	400
6	18 A	400	400	800
7	33 A	400	200	400
8	42 A	400	400	400
9	45 A	1600	1600	1600
10	65 A	800	800	800
11	71 A	200	800	800
12	6 B	50	50	200
13	36 B	200	400	800
14	82 B	50	100	400





TABELA 4

Títulos (U.I.) após desafio com Brucella abortus amostra 544, pelos testes lento, 2-Mercaptoetanol e Coombs em fêmeas bovinas vacinadas quando jovens (8-10 meses) com a amostra B-19 (SUB GRUPO VI )

Soro nº	Título antes do desa fio	Títulos pós-desafio (U.I.)					
		7º dia			30º dia		
		S.A.T.	ME	Coombs	S.A.T.	ME	Coombs
19	-	50	50	50	25	25	-
21	-	50	50	50	50	50	50
35	-	25	25	-	100	100	200
36	-	50	50	50	100	50	50
39	25	50	100	50	200	400	200

TABELA 5

Resultados dos testes do 2-Mercaptoetanol e Coombs em relação aos diferentes títulos do teste de soroaaglutinação em tubo de 921 bovinos adultos.

Título ao teste lento	Total de bo- vínos testa- dos	2- Mercaptoetanol		Coombs	
		Nº de bovinos reagen- tes	% rea- gentes	Nº de bovinos reagen- tes	%
1:25	25	0	0,0	0	0,0
1:50	22	7	31,8	7	31,8
1:200	11	11	100,0	11	100,0
não rea- gentes	863	1	0,1	1	0,1
TOTAL	921	19	2,06%		2,06%

Lento

1:25

1:50

1:200

não reagentes

ME e Coombs

100% não concordantes

68,2% não concordantes

100% concordantes

0,1% discordancia.



5. DISCUSSÃO

Em 467 bovinos ( Sub Grupo I ), possivelmente livres de brucelose encontrou-se nove (1,92% ) com reações de aglutinação de 25 U.I. apenas ao SAT. Esse fato ocorreu, provavelmente, devido a reações inespecíficas, provocadas pelos agentes antigenicamente semelhantes à Brucella.

Fato similar foi registrado por KÜTSCHÉ (1963) que encontrou 0,87% de bovinos com reações de 50 U.I. e incompleta de 100 U.I. em bovinos provenientes de áreas isentas de brucelose.

Na tabela 1, (sub grupo II) observa-se que 37 animais (9,20%) possuíam reações de 25 e 50 U.I. ao SAT e aos testes do 2-ME e Coombs somente cinco animais dos 37 (13,51%) apresentavam-se reagentes (igual ou menor do que 50 U.I.). A falta de concordância nos três testes pesquisadores, como a verificada, no sub grupo I, talvez seja devido também a reações inespecíficas.

Nos Sub Grupos I e II, títulos de 25 U.I. ao SAT não foram confirmados pelo teste de Coombs e do 2-ME. De um total de 19 soros com títulos de 50 U.I. ao SAT apenas dois (10,53%) confirmaram este título aos testes do 2-ME e Coombs. Estes resultados demonstram a ausência de anticorpos bloqueadores.

Títulos baixos ao SAT (25 ou 50 U.I.) podem ser inicial ou inespecíficos, já que predomina anticorpo tipo IgM

é destruído pela ação do 2-Mercaptoetanol (ANDERSON & cols. 1964) e, no teste de Coombs pela ação do calor (HAJDU, 1963)

Nos animais do sub grupo III (tabela 2), provenientes de duas fazendas, onde altos títulos aglutinantes foram encontrados, observa-se ainda, que todos os animais reagentes ao SAT, estão também reagentes ao teste de Coombs e do 2-ME, sendo que o teste de Coombs mostrou, geralmente, títulos superiores (até três diluições) ao SAT e ligeiramente superiores ao 2-ME.

Estes resultados são bastante concordantes com os de GLA - WISCHNIG & CORTES (1972) que examinando 634 soros de bovinos verificaram que os resultados do teste do 2-ME mostraram boa correlação com altos títulos aglutinantes, porém não, com títulos suspeitos ou duvidosos de 1:50 ou 1:100 incompleto.

Na tabela 2 observa-se ainda que oito animais de 52 (15,38%), apresentavam propriedades bloqueadoras ao teste de Coombs quando comparado ao SAT, de uma a três diluições. Estes resultados são confirmados em parte, com os encontrados por COX & HUTNER (1950), que estudando soros de 52 bovinos provenientes de três fazendas consideradas como suspeitas de possuírem brucelose, constataram a presença de 33 soros (63,46%) com propriedades inibidoras da aglutinação e, animais com títulos superiores a 40 U.I. nos métodos rápido e em tubo eram de 46,15% e 67,30%, respectivamente. Neste trabalho 26,92% dos animais do sub grupo III (14 de 52 animais) possuíam títulos superiores a 50 U.I. ao SAT.



Comparando os resultados dos animais não aglutinantes e aglutinantes a 25 U.I. ou mais, nos Sub Grupos I, II e III (tabela 5) obtidos pelo SAT com os que se obtiveram aos testes do 2-ME e Coombs, verificou-se que aqueles foram confirmados em 99,2%; nos aglutinantes a 50 U.I. a concordância foi de 68,2% e, os com aglutinações iguais ou maiores do que 200 U.I., a confirmação foi de 100%.

Os animais do Sub Grupo IV, composto por bezerras, com idades variando de 1 a 11 meses, vacinadas com a Brucella abortus, amostra B-19 (tabela 3) apresentaram resposta sorológica precoce e intensa, sendo que dois de quatro animais com idades inferiores a 60 dias, sete dias após a vacinação não apresentavam respostas sorológicas ao SAT e aos testes de Coombs e 2-ME. Esta ausência de resposta foi constatada também por GARCIA CARRILLO & SZYFRES (1970) em aproximadamente 50% de bezerras holandesas, vacinadas contra brucelose com 15 dias de idade.

Estas duas bezerras não reagentes ao SAT sete dias após a vacinação, ao teste de Coombs possuíam títulos de 25 e 400 U.I., respectivamente; ao 30º dia uma estava com título de 50 U.I. ao SAT, e aos testes do 2-ME e Coombs, enquanto o outro animal apresentava-se não aglutinante ao SAT e com títulos de 25 e 400 U.I. ao 2-ME e Coombs respectivamente. Esta irregularidade na resposta sorológica e a presença de anticorpos inibidores da aglutinação, talvez, seja devido a pouca maturidade das células do sistema linfóide de bovinos com idades inferiores a 60 dias, que produzem em maior quantidade anticorpos monovalentes.

No sub grupo V, composto de vacas vacinadas e revacinadas, após cinco meses, com a Brucella abortus, amostra 45/20, os testes de 2-ME e Coombs não evidenciaram a presença de anticorpos. Títulos aglutinantes de 25 U.I. somente ao SAT foram observados após a revacinação, desaparecendo rapidamente, a ausência de aglutinação, deve-se ao fato da amostra 45/20 possuir características não aglutinogênicas.

Tal fato, foi também parcialmente confirmado por CUNNINGHAM (1968) que vacinando 19 bezerras de seis a oito meses de idade com a amostra 45/20 e revacinando-as após três meses, observou que somente 30% apresentavam traços de aglutinação a diluição 1:10, sendo que após a revacinação, o quadro permaneceu praticamente inalterado e, aos cinco meses, os animais apresentavam-se totalmente não aglutinantes a diluição 1:10 ao SAT.

No sub grupo VI a tabela 4 mostra que bezerras vacinadas com a amostra B-19, sete dias após o desafio com  $20 \times 10^6$  germes de Brucella abortus, amostra 544, pela via conjuntival, houve pequeno aumento nos títulos aglutinantes. Esta baixa resposta sorológica, apresentada pelos animais deve ser atribuída aos altos níveis de imunidade vacinal e conseqüente, infecção branda dos animais neste período.

Entretanto, aumento de uma a três diluições foi observado ao SAT, 2-ME e Coombs, ao 30º dia após o desafio.



6 . CONCLUSÕES



1. Fatores bloqueadores da aglutinação não foram encontrados em soros de bovinos adultos com títulos iguais ou menores do que 25 U.I. ao SAT (sub grupo I).

2. Bovinos provenientes de fazendas, nas quais havia títulos aglutinantes maiores do que 50 U. I. ao SAT ( sub grupo III, tabela 2), observa-se grande especificidade do teste do 2-ME e de Coombs, principalmente em animais com títulos superiores a 200 U. I., nota-se também a presença do anticorpo bloqueador, caracterizado pelo aumento de até três diluições ao teste de Coombs em relação ao SAT.

3. Vacas vacinadas com a amostra 45/20 ( sub grupo V), não apresentavam respostas sorológicas evidenciáveis, nos três testes realizados e, títulos aglutinantes de 25 U.I. foram evidenciáveis somente sete dias após a revacinação, sendo que ao 30º dia todos os animais apresentavam-se não aglutinantes.

4. Em bezerras com menos de 60 dias de idade, vacinadas com a amostra B-19, observa-se também o aumento de até três diluições ao teste de Coombs em relação ao SAT (sub grupo IV, tabela 3), enquanto que bezerras com mais de 60 dias os títulos ao 2-ME e ao Coombs foram iguais ou menores do que ao SAT.

5. Soros com títulos aglutinantes baixos ( 25 U.I.), apresentaram-se totalmente não aglutinantes ao 2-ME e Coombs e ;

6. Soros com títulos de 50 U.I. apresentaram concordância de 31,80%, com os testes do 2-ME e Coombs (tabela 5) e ;

7. Títulos iguais ou maiores do que 200 U.I. ao SAT, apresentaram concordância de 100,00% aos testes do 2-ME e Coombs (tabela 5).

8. Com bases nos resultados encontrados o Teste de Coombs não apresentou vantagens em relação ao SAT, quando os animais apresentavam títulos aglutinantes baixos e eram não vacinados, Além disso, o teste requer aparelhagem mais complexa, com maior duração na sua execução, sendo também, bem mais oneroso.

7. RESUMO



Foram comparados os. títulos agluturantes encontrados pelos testes SAT, 2-ME e Coombs em bovinos vacinados e não vacinados.

Os animais não vacinados foram divididos em três sub grupos:

SUB GRUPO I - 467 soros de bovinos, provenientes de três fazendas com títulos aglutinantes de até 25 unidades internacionais (U.I.).

SUB GRUPO II - 402 soros de bovinos, provenientes de cinco fazendas com títulos aglutinantes de 50 U.I.

SUB GRUPO III - 52 soros de bovinos, provenientes de cinco fazendas nas quais os títulos aglutinantes eram menores, iguais ou maiores do que 100 U.I.

Os animais vacinados contra brucelose bovina, também foram divididos em três sub grupos:

SUB GRUPO IV - 48 amostras de soros, provenientes de oito bezerras vacinadas com a amostra B-19, nas idades de 1 a 11 meses, colhidas em períodos diferentes.

SUB GRUPO V - 20 amostras de soros, provenientes de cinco fêmeas adultas, vacinadas e revacinadas com a amostra 45/20. Cada animal forneceu quatro amostras de soro.

SUB GRUPO VI - Dez amostras de soros, provenientes de cinco novilhas vacinadas, com idades entre dois a 11 meses com a amostra B-19 e desafiadas ao terço final da gestação com a amostra 544.

Os seis sub grupos apresentaram os seguintes resultados nos três testes realizados:

- 1- Sub grupo I- Somente 1.92 % dos animais possuíam títulos aglutinantes de 25 U.I. apenas ao SAT.
- 2- Sub grupo II- Títulos aglutinantes de até 50 U.I. foram observados ao SAT, 2-ME e Coombs. 10,53% dos animais possuíam títulos de 25 U.I. somente ao teste de Coombs ou ao 2-ME.
- 3- Sub grupos III e IV- Aumento de até 3 diluições ao teste de Coombs em relação ao SAT foram observados e ao 2-ME os títulos eram iguais ou ligeiramente superiores.
- 4- Sub grupo V- Títulos aglutinantes de 25 U.I. foram observados somente sete dias após a revacinação, apenas ao SAT.
- 5- Sub grupo VI- Aumento de uma diluição foi observado ao teste de Coombs em relação ao SAT, e ao 2-ME os títulos eram iguais ou ligeiramente superiores.



8. SUMMARY

The agglutination titers found in vaccinated and non-vaccinated bovines were compared by the standart agglutination test (SAT), 2- Mercaptoethanol test (2-ME) and Coombs test.

The non-vaccinated animals were divided into three sub-groups:

Sub-Group I - 467 samples of bovine serum whose agglutination titers reached up to 25 U.I., collected from three farms.

Sub-Group II - 402 samples of bovine serum With titers of 50 U.I. collected from five farms.

Sub-Group III - 52 samples of bovine serum whose titers were less than 100 I.U. or 100 I.U. or higher than such figure.

The animals vaccinated against bovine brucellosis were also divided in three sub groups:

Sub Group IV - 48 samples of bovine serum from eight female calves vaccinated with strain B -19 at the age of one to 11 months collected at different times.

Sub Group V - 20 samples of serum from five adult cows, vaccinates with strain 45/20. Four samples were collected from each cow.

Sub Group VI - Ten samples of serum from five heifers at the age of two to 11 months; vaccinated with strain B-19 challenged at the final third of the gestation period with strain 544.

The following results were obtained:

1. Sub Group I - Only 1,92% of the animals had agglutination titers of 25 I.U. to the SAT.
2. Sub Group II - Agglutination titers of up to 50 I.U. were observed with the SAT, 2-ME and Coombs test. 10,53% of the animals presented titers of 25 I.U. only to the 2-ME or to Coombs test.
3. Sub Groups III and IV - An increase of up to three dilutions to the Coombs test in relation to SAT were observed. The titers in relation to 2-ME were equal or slightly higher than the SAT.



4. Sub Group V - Agglutination titers of 25 I.U. were observed seven days after re-vaccination only in relation to SAT.
5. Sub Group VI - An increase of one dilution was seen in the Coombs test in relation to SAT. Regarding the 2-ME titers were equal or slightly higher.

- ROSE, J.E., LAMBERT, G. & ROEPKE, M.H., 1964. Ultracentrifugation and heat-inactivation studies on seroagglutinins of pregnant heifers artificially infected with virulent Brucella abortus. Amer. J. Vet. Res. 25: 329-332.
- ROSSI, C. & CANTINI, G., 1968. Il test al mercaptoetanolonella diagnosi della brucellosi bovina. Vet. Ital. 19(11/12): 888-904.
- STARR, L.E. & SNIDER, G.E., 1934. Serologic relationship of Brucella and pasteurella. Inf. Dis. Chicago, 55: 384-389.
- UNITED STATES, DEPARTMENT OF AGRICULTURE, NATIONAL ANIMAL DISEASES LABORATORY. Diagnostic reagents division, Ames, Iowa, sem data. Diagnostic reagent Manual: 65.
- WIENER, A.S., 1944. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 56: 173.
- WILSON, G.S., 1934. The reputed antigenic relationship between organism of Brucella group on the one hand and of the pasteurella, pleistherella and proteus group on the other. J. Hyg., 34: 361-371.
- WILSON, N.M. & MERRIFIELD, E.V.O., 1951. The antiglobulin (Coombs) test in Brucellosis. Lancet 261, (6690): 913-919.
- ZINNEMAN, H.H., GLENCHUR, H. & HALL, W.H., 1959. The nature of blocking antibodies in human brucellosis. J. Immunol. 83: 206-211.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- AKKEMANS, J.P.W.M. & HILL, W.K.W., 1972. Yersinia enterocolitica serotype 9 infection as a factor interfering with the serodiagnoses of Brucella infections in swine Netherlands Brucella suis. Neth. J. Vet. Sci., 5(1):73 - 80 .
- ALTON, G.G. & JONES, L.M., 1969. Las tecnicas de laboratorio en la brucelosis. Serie de Monografias de la OMS. n° 55 Ginebra.
- ANDERSON, R.K., JENNESS, R.K., BRUMFIELD, H.P. & GOUGH, P., 1964. Brucella - agglutination antibodies: Relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. Science, 143 (3612): 1334-1335.
- APHIS 91-1, 1972. Brucellosis eradication. Recommended uniform methods and rules. Animal & plant health inspection service. USDA.
- BEH, K.J., 1974. Quantitative distribution of Brucella antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. Res. Vet. Sci., 17(4):1-4
- BRASIL, 1973. Ministério da Agricultura. Bol. Def. Sanit. Ani. Ano VII. Dez. (1-4): 31.
- BRASIL, 1974. Ministério do planejamento e Coordenação Geral Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro. Vol. 35:960 pags.

- COOMBS, R.R.A., MOURANT, A.E. & RACE, R.R., 1945. A new test for detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Brit. J. Exp. Pathol. 26: 255-266.
- CORBEL, M.J. & DAY, C.A., 1973. Assessment of fluorescent antibody absorption procedures for differentiation of the serological response to Yersinia enterocolitica serotype 9 and Brucella abortus in Cattle. Brit. Vet., 129:510-513.
- COX, D.C. & HUTNER, J.L., 1950. Brucella agglutinating phenomenon in bovine sera. Science, 111:545-546.
- CUNNINGHAM, B., 1968. The control and eradication of brucellosis. I. Serological responses in cattle Brucella 45/20 adjuvant vaccine. Vet. Rec. 82:7.
- DICK, J.R., VENZKE, W.E. & YORK, C.A., 1947. A method for differentiating between vacinal titers and infection titers of Brucella abortus in cattle. J. Am. Med. Ass. 111: 255-258.
- EMMEL, M.V. & BOEVERS, M.L., 1932. The differentiation of Pasteurella avicida and Brucella infection in the fowl J. Am. Med. Ass., 81:92-104.
- DAWSON, F.L.M. & DURRANT, D.S. 1975. Some serological reactions to "Brucella" antigen in the horse. Equine Vet. J. 7 (3): 137-140



- FOZ, A. & GARRIGA, S., 1954. Relation entre la fixation du complement et les anticorps incomplets ( Test de Coombs) dans la brucellose humaine. Revue d'immunol. Ther. Antimicrob. Tomo 18:288-298.
- GARCIA-CARRILLO, C. & SZYFRES, B., 1970. Efecto de la vacunacion temprana y de la revacunacion con Brucella abortus, cepa 19, sobre la respuesta serologica. Rev. Med. Vet., 51(3): 157-173.
- GLAWISCHNIG, E. & CORTES, A., 1972. Untersuchungen über die brauchbarkeit der mercaptoethanoltestes zur erkennung unspezifischer brucellose-reagenten. (Value of the mercaptoethanol test in the detection non-specific brucellosis reactions). Dtsch. Tierarztl. Wschr. 79(15): 361-365.
- GRIFFTS, J.J., 1947. Agglutination and an agglutinin "blocking" property in serum from known cases of brucellosis. Publ. Hlth. Rep. Wash., 62, 865.
- HAJDU, S., 1963. La specificité et la valeur des épreuves a l'antiglobuline modifiées par l'auter dans le diagnostic de la brucellose des bovines. Bull. Off. Int. Epiz., 60: 433-445.
- HALL, W.A. & MANION, R.E., 1953. Comparasion of the Coombs test with others methods for Brucella agglutination in serum. J. Clin. Invest., 32: 96-101
- HOELEIN, F.B., 1953. Studies on swine brucellosis. III, The differentiation of specific and non-specific agglutination titers. Cornell Vet., 43(1): 28-37.



- KENYON, A. J., ANDERSON, R. K. & JENNESS, R., 1961. A macroglobulin (12s) agglutinin for Brucella milk. J. Dairy. Sci., 44:1141-1142
- KOTSCHE, W., 1963. Nonspecific reactions to the slow serum agglutination test for Brucellosis and their significance in diagnosis and control of bovine Brucellosis. Arch. Exp. Vet. Med., 17, 859-875, in Vet. Bul., 1964, 34(5): 256, Abstr. 1625.
- LE PENNEC, J. & GOYON, M., 1965. Contribution à l'étude des anticorps brucellique bovine par le Coombs chauffée et la déviation du complément. Bull. Soc. Vet. Prat., 49:299
- LE PENNEC, J. 1966. Possibilité d'emploi du test de Coombs à un tube sur sérum chauffée 10 minutes 69° C en serologie antibrucellique bovine et ovine. Etude comparative avec S.A.W. en eau salée à 50 / 1000 de NaCl. Bull Acad. Vet., 39:85-90.
- LEWIS, V. J., JONES, W. L., BROOKS, J. B. & CHERNY, W. R., 1964. Technical considerations in the preparation of fluorescent antibody conjugats. Appl. Microbiol. 12: 343.
- Mc CAUGHEY, W. J. & KERR, W. R., 1967. The Coombs or anti-globulin test in the horse. Vet. Rec. 81, 542.

- Mc DEVITT, D.G., 1970. Relevance of the anti-human globulin "Coombs" test and, the complement fixation test in the diagnosis of brucellosis. J. Hyg. (Camb) 68, 173.
- MOODY, D.M., BIEGELEISEN, J.Z. & TAYLOR, G.G., 1961. Detection of Brucellae and their antibody by fluorescent antibody and agglutination tests. J. Bacter. 81: 990-995
- MORSE, E.V., SCHNEIDER, F.W. & MCNUTT, S.H., 1955. The effect of incubation at 56°C on the tube agglutination test for bovine Brucellosis. Am. J. Vet. Res., 16: 269-273
- NAGY, F.K. & HIGNETT, P.G., 1967. The long-term effects of Brucella infection of newly-born calves. Res. Vet. Sci., 8: 247-255
- NICOLETTI, P., 1967. Utilization of the card test in Brucellosis eradication. J. Am. Vet. Med. Ass. 151 : 1778-1783.
- PANDA, S.N., 1967. Significance of blocking antibodies in goats. Indian J. Anim. Hlth., 6(2): 267-271.
- RACE, R.R. 1944. An "incomplete antibody in human serum". Nature. London. 153, 771.
- REDDING, J.L., ANDERSON, R.K., JENNES, R., SPINK, W.W., 1965. New Engl. J. Med., 272, 1263
- ROSE, J.E. & ROEPKE, M.H., 1957. An acidified antigen for detection of non-specific reaction in the plate agglutination test for bovine brucellosis. Amer. J. Vet. Res., 18: 550-555.