

Guilherme Canhestro de Faria

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE POLARIZAÇÃO FLUORESCENTE PARA
DISCRIMINAR TÍTULOS SOROLÓGICOS DE BEZERRAS VACINADAS COM
AMOSTRA B19 DE *Brucella abortus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2010

F224a Faria, Guilherme Canhestro de, 1981-
Avaliação do teste de polarização fluorescente para discriminar títulos
sorológicos de bezerras vacinadas com amostras B19 de *Brucella abortus* /
Guilherme Canhestro de Faria. – 2010.
31 p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Brucelose em bovino – Teses.
3. Brucelose em bovino – Vacinação – Teses. 4. Vacina veterinária – Teses.
I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692 6

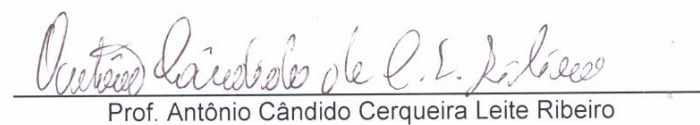
Dissertação defendida e aprovada em 06 de maio de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente



Dr. Luis Antônio Mathias



Prof. Antônio Cândido Cerqueira Leite Ribeiro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Alfredo de Faria e Lúcia Maria Canhestro de Faria, pelo constante incentivo à minha carreira profissional.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo carinho, apoio e incentivo aos estudos.

Ao meu orientador, Prof. Rômulo Cerqueira Leite, agradeço a oportunidade concedida, a atenção e confiança depositada.

Aos membros da banca examinadora Prof. Luis Antônio Mathias, Dr. Pedro Mota, Dr. Antônio Cândido e Prof. Marcos Xavier pelas importantes sugestões e críticas construtivas que enriqueceram este trabalho.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), na figura do seu diretor Dr. Altino Rodrigues Neto, e ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG), na figura dos seus coordenadores Dr. Ricardo Aurélio e Dr. Pedro Mota, pela liberação para as atividades acadêmicas.

Aos colegas e grandes amigos do LANAGRO/MG, em especial aos funcionários do setor de Diagnóstico de Doenças Bacterianas (DDB) e do setor de Controle de Produtos Biológicos (CPB).

À EMBRAPA Gado de Leite em Coronel Pacheco, na figura do Dr. Rui da Silva Werneck e do Dr. Antônio Cândido, pela colaboração e visão da importância da realização deste trabalho.

Aos amigos Klinger e Rebeca pela fundamental contribuição na coleta das amostras.

Ao amigo e colega Paulo Martins pelas importantes orientações técnicas para realização dos testes sorológicos.

Aos professores João Paulo Haddad e Marcos Xavier pela ajuda na realização dos testes estatísticos.

À professora Cláudia Penna pela colaboração na tradução do abstract.

À Nádia pelo auxílio na formatação.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. LITERATURA CONSULTADA	10
2.1. Brucelose.....	10
2.2. Brucelose no Brasil	11
2.3. Controle da brucelose bovina.....	11
2.4. Certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose	12
2.5. Testes sorológicos para brucelose bovina.....	12
2.5.1. Antígeno acidificado tamponado.....	13
2.5.2. Soroaglutinação lenta e 2-Mercaptoetanol	13
2.5.3. Fixação de complemento	14
2.5.4. Polarização fluorescente	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Vacinação	16
3.3. Coleta das amostras	16
3.4. Testes sorológicos.....	16
3.5. Antígeno acidificado tamponado	16
3.6. Soroaglutinação lenta em tubos e 2-Mercaptoetanol.....	16
3.7. Fixação de complemento	17
3.8. Teste de polarização fluorescente	17
3.9. Análise de dados	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Especificidade	18
4.2. Concordância entre os testes.....	23
4.3. Influência da raça e idade à vacinação	24
5. CONCLUSÕES	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1	Número de animais diagnosticados como positivos, negativos e suspeitos por teste em cada coleta	19
Tabela 2	Resultado das provas de 2-ME e FC nas quatro coletas realizadas após a vacinação.....	19
Tabela 3	Valores de especificidade com os respectivos intervalos de confiança (em 95%)	22
Tabela 4	Concordância (%) entre os testes após a vacinação	23
Tabela 5	Valores de kappa entre os testes após a vacinação.....	23
Tabela 6	Coefficiente de Spearman para correlação entre os resultados da FC com raça e idade à vacinação em todo o período estudado	25
Tabela 7	Porcentagem e número de animais classificados em cada grupo e estrato.....	26
Tabela 8	Porcentagem e número de amostras positivas na FC durante todo experimento	26
Tabela 9	Estudo de coorte para o Grupo 1 estratificado por idade à vacinação	26
Tabela 10	Estudo de coorte para o Grupo 2 estratificado por idade à vacinação	26
Tabela 11	Estudo de coorte para o Grupo 3 estratificado por idade à vacinação	27
Tabela 12	Estudo de coorte para idade à vacinação estratificado por grupo de raça	28

RESUMO

Os testes preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) para o diagnóstico sorológico da brucelose foram comparados com o teste de Polarização Fluorescente quanto à capacidade de discriminar títulos sorológicos decorrentes da vacinação com B19. Foram utilizadas 93 bezerras provenientes de um rebanho leiteiro certificado como livre de brucelose e tuberculose pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). As amostras de soro sanguíneo foram coletadas imediatamente antes da vacinação, e após 3, 6, 9 e 12 meses de vacinadas. Foram calculados os valores de especificidade para cada teste, assim como a concordância e o índice kappa entre os testes. A correlação da incidência de resultados positivos na Fixação de Complemento com a idade à vacinação e o grau de sangue zebu foi avaliada através do coeficiente de Spearman e por um estudo de coorte. Os valores de especificidade encontrados nas diferentes datas de coleta variaram de 41,94% a 94,57%, 62,37% a 97,83%, 69,89% a 97,83%, e 76,34% a 95,65% para os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), 2-Mercaptoetanol (2-ME), Fixação de Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (FPA) respectivamente. Quando avaliada a concordância entre os testes, os melhores valores encontrados foram entre a FC e o 2-ME, considerada perfeita após os 9 meses da vacinação ($k=1,0$). A FPA apresentou boa concordância com os dois testes confirmatórios preconizados pelo PNCEBT somente após os 9 meses da vacinação ($k>0,6$). Foi observada uma incidência significativamente maior de resultados positivos na FC naquelas bezerras de maior grau de sangue zebu e vacinadas mais tardiamente.

Palavras-Chave: Brucelose, Polarização Fluorescente, Fixação de Complemento, 2-Mercaptoetanol, Antígeno Acidificado Tamponado.

ABSTRACT

Tests for serologic diagnosis of brucellosis recommended by the Brazilian National Program for the Control and Eradication of Bovine Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) were compared with the Fluorescent Polarization Assay regarding the ability to discriminate serologic titles arising from the S19 vaccination. The 93 calves used in this experiment were originated from a brucellosis-free dairy farm according to the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA). The serum samples were obtained just before the vaccination and 3, 6, 9, and 12 months after that. Specificity values for each tests as well agreements and Kappa index values were calculated. The positive correlation between Complement Fixation Test and age at vaccination and Zebu blood degree was evaluated by Spearman Coefficient and Cohort Study. The Specificity coefficient ranged from 41.94 to 94.57%, 62.37 to 97.83%, 69.89 to 97.83%, and 73.34 to 95.65%, respectively, for the Rose-Bengal Test (RBT), 2-Mercaptoetanol (2-ME), Complement Fixation Test (CFT) and Fluorescent Polarization Assay (FPA). Regarding to the agreement between the tests, the bests values were obtained for the CFT and 2-ME relationship, that was considered perfect nine months after vaccination ($k=1.0$). The FPA test only presents good agreement with two recommended confirmatory tests of PNCEBT nine months after vaccination ($k>0.6$). Calves with higher Zebu blood degree and late vaccinated presented significantly higher positive results.

Keywords: *brucellosis, Fluorescent Polarization Assay, Complement Fixation Test, 2-Mercaptoetanol, Rose-Bengal Test.*

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose cujo principal sintoma e meio de transmissão entre os bovinos é o abortamento. A doença apresenta distribuição mundial, sendo que a erradicação foi alcançada por apenas alguns poucos países desenvolvidos, através da adoção de medidas sanitárias destinadas ao controle e à erradicação da doença nos animais. No Brasil, a brucelose bovina está disseminada por todo o território.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), se baseia na vacinação compulsória de bezerras com a vacina viva B19, no diagnóstico sorológico dos animais e sacrifício dos doentes. Porém, a vacina induz a produção de anticorpos que confundem os resultados dos testes sorológicos, falhando na identificação dos animais livres da doença. Para minimizar esse efeito, são vacinadas apenas as bezerras de 3 a 8 meses de idade e testadas somente fêmeas bovinas e bubalinas com mais de 24 meses.

Técnicas mais modernas de diagnóstico sorológico têm sido estudadas na busca de diminuir a interferência de anticorpos vacinais na identificação de animais doentes e sadios. O Teste de Polarização Fluorescente, já validado em vários países, pode ser uma ferramenta de grande utilidade para diferenciar animais vacinados com persistência de anticorpos daqueles naturalmente infectados. Neste trabalho, os testes preconizados pelo PNCEBT para o diagnóstico da brucelose foram comparados com a Polarização Fluorescente quanto à capacidade de discriminar títulos sorológicos decorrentes da vacinação com B19.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Brucelose

A brucelose é uma importante zoonose causada por uma bactéria Gram negativo, intracelular facultativa. No homem, foi isolada pela primeira vez por David Bruce, em 1886, do baço de doentes, mortos com a febre por ele chamada “Febre de Malta”. Dez anos após a descrição de Bruce, em 1897, Bernard Bang, veterinário dinamarquês, em companhia de Stribolt, descobriu, na Dinamarca, que o aborto infeccioso bovino, afecção conhecida no norte europeu e admitida como contagiosa para o gado, era causada pelo germe por eles isolado de fetos abortados de vacas (Pacheco e Mello, 1956).

A verificação de que o agente causador do aborto infeccioso das vacas contaminava também o homem foi feita em 1918, pela bacteriologista americana Alice Evans. Em 1920, Meyer e Shaw, levando em consideração as analogias entre os germes da “Febre de Malta” e do aborto infeccioso bovino, propuseram reuni-los num gênero único, sob o nome de *Brucella*, em homenagem a Bruce (Pacheco e Mello, 1956).

Existem várias espécies de *Brucella* identificadas, sendo as mais estudadas a *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* e *B. canis*. Geralmente, *B. melitensis* e *B. suis* são mais virulentas para o homem que a *B. abortus* e a *B. canis* (Brucellosis, 2006). Nos bovinos a mais importante é a *Brucella abortus*, cuja principal manifestação clínica é o abortamento no terço final da gestação, mas causa também lesões ósseas e bursites que depreciam as carcaças. A transmissão faz-se principalmente através dos líquidos e restos placentários do aborto, podendo também ocorrer através do leite e do sêmen.

No humano, a *Brucella* é o agente da febre ondulante, que pode persistir e progredir para uma doença crônica incapacitante com várias complicações. Artrites deformantes e osteomielites são as complicações mais frequentes da brucelose, ocorrendo em mais de 40% dos casos. Nos homens, orquites e epididimites estão presentes em cerca de 20% dos doentes. Endocardite é a manifestação cardiovascular mais comum, sendo reportada em cerca de 2% dos casos, e é tida como a causa mais comum de morte por brucelose. Na mulher, ao contrário do que ocorre com os animais, o abortamento não é um problema característico da doença, provavelmente devido ao tipo de placentação discóide e à ausência de eritról no tecido placentário (Brucellosis, 2006).

O quadro clínico não é específico nos animais ou no homem e o diagnóstico precisa ser auxiliado por testes laboratoriais. O tratamento da doença está disponível para a brucelose humana, mas a prevenção é o ideal, através do controle da infecção nos animais e da implementação de medidas de higiene individuais e na saúde pública (Brucellosis, 2006).

A doença está distribuída mundialmente, mas é nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento que a prevalência é maior, causando prejuízos econômicos inclusive pela criação de barreiras sanitárias para a exportação de carne bovina.

A maioria dos países desenvolvidos adotou, há mais de 20 anos, medidas sanitárias destinadas à erradicação da brucelose, obtendo êxito o Canadá, Dinamarca, Austrália, Inglaterra, Holanda, Suécia e Japão, enquanto outros países como a França e os Estados Unidos mantêm a doença controlada, com diminuição de sua ocorrência (Jardim *et al.*, 2006; Ragan, 2002).

2.2. Brucelose no Brasil

Estudos mostram que a brucelose bovina parece estar disseminada por todo território brasileiro, com menor ou maior prevalência dependendo da região estudada. O último

estudo nacional, que envolveu 15 Estados, foi publicado em 2009 (Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2009) e apresentou grande variação na prevalência de propriedades infectadas entre os Estados, sendo que Santa Catarina apresentou a menor prevalência, 0,32% (Sikusawa *et al.*, 2009) e Mato Grosso do Sul a maior prevalência, 41,5% (Chate *et al.*, 2009).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (Programa, 2006).

2.3. Controle da Brucelose Bovina

A brucelose é uma enfermidade cujas consequências econômicas para a produção pecuária, além dos reflexos na área de saúde pública, têm motivado, na grande maioria dos países, a adoção de medidas destinadas à sua erradicação ou, pelo menos, à diminuição de suas taxas de ocorrência. Um dos pilares nos quais se baseiam estas campanhas consiste na disponibilidade de métodos diagnóstico que sejam ao mesmo tempo confiáveis e de execução relativamente simples, além de outras características importantes, como por exemplo, os recursos necessários para sua realização (Mathias e MacMillan, 1995).

Uma das medidas estabelecidas de controle à brucelose é a vacinação compulsória com a cepa B19 viva, na dose de 60-120 X 10 UFC/dose pela via subcutânea, de todas as bezerras de 3 a 8 meses de idade, com o objetivo de evitar a persistência de títulos vacinais que possam dificultar a identificação dos animais infectados pelos testes sorológicos de rotina. Uma vez que a persistência desses anticorpos está relacionada principalmente a dose da vacina, via de administração, idade do animal e período de gestação (Nicoletti *et al.*, 1990).

2.4. Certificação de Propriedades Livres de Brucelose e Tuberculose

Os procedimentos de certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose obedecem aos princípios técnicos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A sua aplicação foi ajustada à realidade dos sistemas de produção brasileiros e às necessidades do PNCEBT (Programa, 2006).

O saneamento das propriedades que entram em processo de certificação é realizado testando todos os animais elegíveis para o diagnóstico e sacrificando os reagentes positivos. Os testes no rebanho são repetidos até a obtenção de três testes consecutivos sem um único animal reagente positivo, ao longo de um período mínimo de nove meses. Uma vez terminado o processo de saneamento, a propriedade obtém o certificado de livre dessas doenças, cuja manutenção depende do cumprimento de todas as regras e normas sanitárias estabelecidas pelo PNCEBT. As propriedades certificadas ficam obrigadas a repetir os testes anualmente. São exigidos também dois testes negativos para o ingresso de animais na propriedade, se eles não forem provenientes de outra propriedade certificada como livre (Programa, 2006).

2.5. Testes sorológicos para brucelose bovina

A importância do diagnóstico para o êxito das campanhas de combate à brucelose tem incentivado o desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas sorológicas voltadas para aquele objetivo (Mathias e MacMillan, 1995; Nielsen, 2002).

Anticorpos decorrentes da vacinação com a B19 são mais reativos em alguns testes diagnósticos que em outros. O aprimoramento dos testes sorológicos visando aprofundar o conhecimento da interferência da resposta vacinal sobre eles vem sendo o objetivo de um grande número de trabalhos científicos desenvolvidos em todo o mundo (Ornelas-Santos *et al.*, 1975;

Martin e Hudson, 1978; Nielsen *et al.*, 1989; Samartino *et al.*, 1999; Mathias *et al.*, 2001).

O desenvolvimento do primeiro teste de aglutinação para a detecção de anticorpos contra a infecção por *Brucella* foi descrito há mais de 100 anos. Desde então, muito esforço tem sido feito para aprimorar os métodos diagnósticos e a acurácia, culminando na produção de ensaios de ligação primária (ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA, Polarização Fluorescente) e procedimentos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Mathias e MacMillan, 1995; Nielsen e Gall, 2004).

Ensaio de ligação primária medem diretamente a interação entre antígeno e anticorpo, enquanto testes sorológicos convencionais, como do Antígeno Acidificado Tamponado e Fixação de Complemento, medem fenômenos secundários como aglutinação e ativação do complemento. Dependendo da sensibilidade (habilidade de um teste identificar corretamente um animal doente) e especificidade (habilidade de um teste identificar corretamente um animal que não tem a doença), os testes diagnósticos podem ser usados para triagem ou para confirmar a doença. Tradicionalmente, testes de triagem apresentam custo relativamente mais baixo, são rápidos e de alta sensibilidade, mas não apresentam necessariamente alta especificidade, enquanto testes confirmatórios devem mostrar alta sensibilidade e especificidade (Nielsen e Gall, 2004).

O diagnóstico sorológico da brucelose no Brasil é baseado no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (ATT) como teste de triagem, sendo os resultados positivos confirmados pelo teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME), realizado em paralelo com a soroaglutinação lenta em tubos (SAL), ou pelo teste de fixação de complemento (FC). É importante lembrar que as bezerras vacinadas só devem ser submetidas aos testes após os 24 meses de idade, para evitar reações decorrentes de anticorpos vacinais (Programa, 2006).

Em bovinos imunizados com a B19, a classe IgM apresenta concentrações máximas por volta do 13º dia após a vacinação, enquanto IgG1 é registrada em pequenas quantidades, com picos máximos entre o 28º e 42º dia pós-vacinal (Sutherland, 1980). Rodrigues e Giorgi (1973) também encontraram títulos aglutinantes máximos do 14º ao 28º dia após a vacinação. De forma semelhante, Ribeiro *et al.* (1997), ao vacinar 33 bezerras Nelore, também encontraram títulos máximos no 2-ME entre o 28º e 42º dia pós-vacinal, e esses animais mostraram resultados negativos nas provas do AAT, SAL e 2-ME por volta dos 10 meses pós-vacinais. Os mesmos autores sugeriram que essas provas poderiam ser empregadas mais precocemente que a recomendação do Ministério da Agricultura.

Rodrigues e Giorgi (1973) verificaram que, geralmente, quanto maior a idade do animal na época da vacinação com B19, maior o título aglutinante residual no decorrer dos anos que sucedem a vacinação, não indicando entretanto uma maior proteção contra a enfermidade. Verificou-se ainda que os animais vacinados mais jovens, entre 2 e 4 meses de idade, no prazo de 90 dias já se apresentavam sem aglutininas no soro sanguíneo.

O título vacinal em animais vacinados até os 8 meses de idade desaparece, na maioria das vezes, em até 1 ano pós-vacinação, mas naqueles animais em que a puberdade é mais precoce, esse título pode não desaparecer tão cedo ou persistir por muito tempo, o que interfere no diagnóstico sorológico e constitui um transtorno quando se implantam programas de controle e erradicação, como é o caso do PNCEBT, concebido e implantado no Brasil. Dos testes sorológicos convencionais, a reação de fixação de complemento geralmente apresenta maior capacidade de discriminação dos títulos vacinais (Nicoletti *et al.*, 1978).

A proporção de falsos positivos também é muito influenciada pela especificidade do teste utilizado, qualquer que seja a prevalência da doença. Para valores de

prevalência muito baixos, mesmo um teste de boa especificidade (99%) resulta em alta proporção de falsos positivos. Sendo assim, quando o diagnóstico é realizado em populações de baixa prevalência, devem ser utilizados teste de especificidade próxima a 100% (Programa, 2006).

2.5.1. Antígeno Acidificado Tamponado

O teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) é uma prova qualitativa rápida e prática. Baseia-se no princípio de que a capacidade de imunoglobulinas de classe M se ligarem a antígenos é marcadamente reduzida em baixo pH, reduzindo dessa forma reações inespecíficas. É um excelente teste de triagem, mas pode ser excessivamente sensível para o diagnóstico individual de animais, particularmente aqueles vacinados (WHO, 2006).

2.5.2. Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol

O teste do 2-ME é uma prova semiquantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova da soroaglutinação lenta em tubos. Baseia-se no fato de os anticorpos de classe IgM, com configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol. Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta) frente ao soro tratado com 2-ME (Programa, 2006).

Os resultados positivos na SAL e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou como devido a anticorpos residuais de vacinação com B19. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são aglutininas relacionadas à infecção,

devendo os animais ser considerados infectados (Programa, 2006).

A combinação dos testes de SAL e 2-ME apresenta como desvantagens: tempo longo para obtenção do resultado (aproximadamente 48 horas); gasto de grande quantidade de reagentes, ocupando grandes espaços quando se testam muitas amostras; uso de substância tóxica; e necessidade de as amostras de soro estarem em condições ótimas de conservação.

2.5.3. Fixação de Complemento

Uma das provas classicamente empregadas no diagnóstico sorológico da brucelose é a reação de fixação de complemento (FC), cujo valor como instrumento de auxílio para a execução de programas de controle de brucelose tem sido comprovado em vários países. Uma das vantagens descritas para o diagnóstico da doença em ruminantes tem sido a capacidade de ser relativamente menos sensível a anticorpos produzidos em resposta à vacinação com as vacinas vivas atenuadas de *B. abortus* cepa B19 e *B. melitensis* cepa Rev.1, mas apresentando alta sensibilidade e especificidade para animais naturalmente infectados (Alton *et al.*, 1988).

O teste de FC requer um total de cinco componentes, dos quais quatro devem ser titulados para a medição do quinto, que é o anticorpo no soro. O complemento consiste em uma complexa série de proteínas que, quando ativadas pela presença de um complexo antígeno-anticorpo, reagem de tal forma sequencial que causam a lise celular. A prova é realizada em dois estágios. No primeiro estágio, o antígeno de *Brucella* e o soro teste são misturados com o soro de cobaia (complemento). Se o soro teste contém anticorpos contra *Brucella*, o complemento será gasto ou fixado e não estará disponível no segundo estágio, quando será adicionado o indicador ou sistema hemolítico. No segundo estágio, eritrócitos de carneiro que foram sensibilizados, ou seja, misturados a anticorpos antieritrócito de carneiro (hemolisina), são adicionados. Se todo

complemento tiver sido fixado durante o primeiro estágio, não ocorrerá hemólise, o que significa que o soro contém anticorpo contra *Brucella* e é portanto positivo. Se ocorrer hemólise dos eritrócitos, significa que o complemento não foi fixado no primeiro estágio porque o soro não contém anticorpo contra *Brucella*, e o teste é portanto negativo (Alton *et al.*, 1988).

O soro sanguíneo naturalmente contém complemento e comumente também tem alguma atividade anticomplementar, que pode ser aumentada pela contaminação bacteriana. Nas amostras de soro a serem testadas, o complemento é inativado e a atividade anticomplementar é reduzida ou eliminada pelo aquecimento do soro. O processo é conhecido como inativação. O soro bovino deve ser inativado a 58 °C. Nos ruminantes, o principal anticorpo responsável pela fixação do complemento é a imunoglobulina IgG1. Anticorpos da classe IgG2 não fixam complemento de cobaia e quando presentes em grande quantidade são capazes de impedir a fixação do complemento por outras imunoglobulinas, levando dessa forma a reações de prozona. Anticorpos da classe IgM fixam complemento, mas sua capacidade para tal é comprometida pelo calor usado no processo de inativação do soro realizado antes da execução da prova (Alton *et al.*, 1988).

Um dos problemas com o emprego da FC é a diversidade de técnicas utilizadas nos diferentes países, o que dificulta a padronização do teste e a comparação entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios. Mais recentemente, difundiu-se bastante o uso de microtécnicas, que apresentam a vantagem de tornarem a prova mais rápida e mais econômica (Mathias e MacMillan, 1995). Segundo Alton *et al.* (1975), as macrotécnicas da FC são, em geral, cerca de uma diluição mais sensíveis que as microtécnicas.

Os métodos chamados de fixação a quente são aqueles em que no primeiro estágio as condições para a reação entre antígeno, anticorpo e complemento são fixadas a 37 °C por 30 minutos. Já os métodos de

fixação a frio são aqueles em que o primeiro estágio ocorre à temperatura de refrigeração por 14-18 horas. O método de fixação a quente é mais conveniente e apresenta menos problemas com reações de anticomplementariedade, tem sido usado com sucesso em diversos países em programas de erradicação da brucelose bovina. Por outro lado, seu maior inconveniente é que reações de prozona são mais freqüentes e precisam ser levadas em consideração (Alton *et al.*, 1988).

2.5.4. Polarização Fluorescente

O teste de polarização fluorescente (FPA) baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel (marcado com fluorocromo) e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. Moléculas menores giram aleatoriamente, a uma velocidade maior, resultando em maior despolarização da luz, ao passo que complexos maiores giram mais lentamente, e a despolarização da luz ocorre a uma taxa mais reduzida. Essa mudança da polarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente. Os resultados expressos em unidades de luz polarizada ou de milipolarização (mP). O valor em mP será maior quanto maior for a quantidade de anticorpos no soro analisado (Nielsen *et al.*, 2001).

O primeiro trabalho aplicando essa técnica ao diagnóstico da brucelose bovina foi desenvolvido por Nielsen *et al.* (1996). Nesse trabalho, os autores relatam que o teste de 8.669 soros de rebanhos canadenses livres de brucelose resultou em uma especificidade de 99,96%, e o teste de 561 soros de animais dos quais havia sido isolada *Brucella abortus* apontou uma sensibilidade de 99,02%. Os autores testaram ainda 250 soros de animais vacinados com a amostra B19 e obtiveram uma especificidade de 99,2%. Esses resultados mostraram a capacidade do teste de combinar elevada sensibilidade com elevada especificidade e mostraram ainda que a especificidade do teste é elevada mesmo quando usado para testar soros de animais vacinados.

Avaliando o teste de polarização fluorescente no México, foi observada uma sensibilidade relativa de 99,0% e especificidade relativa de 96,9%, utilizando-se como valor de ponto de corte 89,9 unidades de milipolarização (mP) (Dajer *et al.*, 1999).

Na Europa, a FPA foi avaliada em 146 amostras de soro de bovinos com isolamento de *Brucella abortus*, obtidos em vários países europeus, e em 1.947 amostras de soros de rebanhos britânicos livres de brucelose. Foi constatada sensibilidade de 96,6% e especificidade de 99,1%, sendo observado que o teste de polarização fluorescente foi o que apresentou maior valor quando somadas a sensibilidade e a especificidade de cada teste, em comparação com ELISA indireto, ELISA competitivo, fixação de complemento e soroaglutinação (McGiven *et al.*, 2003).

A capacidade do teste de polarização fluorescente de discriminar anticorpos decorrentes de vacinação daqueles decorrentes de infecção tem sido relatada (Nielsen *et al.*, 1996), assim como tem se mostrado clara sua boa performance em regiões onde há ocorrência de brucelose (Samartino *et al.*, 1999).

Na Argentina, onde se utiliza a vacina B19 em bezerras, na dose reduzida de 3-5 x 10 UFC/dose, foi realizada a validação da FPA pela avaliação de 733 amostras negativas nos testes do Antígeno Tamponado em Placa (BPAT) e no ELISA competitivo (cELISA), oriundas de rebanhos sem evidência de infecção, e de 1.039 amostras de animais positivos nos dois testes e provenientes de rebanhos onde *B. abortus* foi isolada. O soro de bezerras também foi coletado para análise após 26, 89, 240 e 272 dias da vacinação. O valor de ponto de corte de 87 mP foi determinado para a FPA, resultando em sensibilidade e especificidade relativas de 98,1% e 99,6% respectivamente. Foram encontradas pela FPA reações positivas em menos de 10% das bezerras após três meses da vacinação, enquanto o teste de FC e o 2-ME apresentaram reações positivas em cerca de 75% e 61% das amostras

respectivamente. Foi sugerido que se uma amostra de soro é positiva na FPA dois a três meses após a vacinação, há uma pequena chance de ser devido a anticorpos vacinais, no entanto, há mais de 90% de chance de ser decorrente de infecção. A especificidade da FPA para animais vacinados foi de 64,9% após 26 dias da vacinação, 92,1% após 89 dias, 98,6% após 242 dias e 97,1% após os 272 dias (Samartino *et al.*, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas 93 bezerras provenientes do rebanho da EMBRAPA Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco/MG e certificado como livre de brucelose e tuberculose pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Os animais eram da raça holandesa (Puro de Origem – P.O.) e girolando, com os graus de sangue variando do 3/4 zebu até o P.O.

3.2. Vacinação

Foram vacinadas 3, 27, 29 e 34 bezerras aos 4, 5, 6 e 7 meses de idade respectivamente, recebendo por via subcutânea a dose oficial estabelecida, ou seja, 2 mL, contendo 60-120 bilhões de UFC, da vacina viva preparada com *Brucella abortus* amostra B19.

3.3. Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de sangue de todas as bezerras imediatamente antes da vacinação, e após 90, 180, 270 e 365 dias. Após a retração do coágulo, o soro foi separado e mantido a -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

3.4. Testes sorológicos

Todas as amostras foram submetidas aos testes sorológicos no Laboratório Nacional Agropecuário em Pedro Leopoldo, Minas Gerais (LANAGRO/MG). A metodologia utilizada neste trabalho para a realização dos testes sorológicos de aglutinação e de

Fixação de Complemento é a mesma adotada pelo LANAGRO/MG para o diagnóstico oficial da brucelose bovina. A execução e leitura de todos os testes foram realizadas por apenas um analista.

3.5. Antígeno Acidificado Tamponado

Foi utilizada a técnica recomendada por Alton *et al.* (1988), empregando-se o antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3. Foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram aglutinação após quatro minutos.

3.6. Soroaglutinação Lenta em Tubos e 2-Mercaptoetanol

Foi utilizada a técnica recomendada por Alton *et al.* (1988), empregando-se o antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3. A interpretação foi baseada na observação da turbidez da suspensão e da presença de grumos quando os tubos são agitados suavemente. O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições deve ser classificado como: completo, incompleto ou negativo. Amostra com reação completa é aquela em que a suspensão proveniente da mistura do soro com o antígeno aparece transparente e límpida, com presença de aglutinação que não se rompe facilmente com a agitação suave do tubo. Amostra com reação incompleta é aquela em que a suspensão proveniente da mistura do soro com o antígeno aparece turva, com pelo menos 25% de turbidez, e uma agitação suave do tubo não rompe a aglutinação. Amostra com reação negativa é aquela em que a suspensão aparece turva e uma agitação suave do tubo não revela aglutinação.

O título é o inverso da maior diluição em que ocorreu uma reação positiva (completa ou incompleta), sendo o título da prova de soroaglutinação lenta independente daquele encontrado na prova de soroaglutinação lenta com 2ME, em um mesmo soro. A interpretação dos resultados foi realizada segundo a tabela estabelecida pelo PNCEBT para bezerras vacinadas com B19. Dessa forma, animais não reagentes ou

com título 25 incompleto no 2-ME, e título 100 incompleto ou superior na SAL, são considerados inconclusivos. Animais com título 25 ou superior no 2-ME são considerados positivos.

3.7. Fixação de Complemento

Foi empregada a microtécnica com incubação a 37 °C nas duas fases da reação, recomendada por Alton *et al.* (1988), com antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3 para a prova de soroaglutinação em tubos. Todos os reagentes utilizados foram padronizados de acordo com a técnica acima citada.

O complemento consistiu de soro de cobaia, sendo empregadas cinco unidades hemolíticas 50%. O sistema hemolítico consistiu de suspensão de hemácias de carneiro, padronizada em espectrofotômetro para a concentração de 3% de células, acrescida de igual volume de uma suspensão de hemolisina, que consiste de anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro.

O teste, realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U”, consiste em colocar 25 µL do soro teste, inativado em banho-maria a 58 °C por 30 minutos, em diluições duplas de 1:2 até 1:128, 25 µL de antígeno e 25 µL de complemento e, após agitação em agitador de microplacas, incubar em estufa bacteriológica a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, são acrescentados 25 µL do sistema hemolítico, a placa é novamente agitada e o material incubado nas condições mencionadas acima, com uma nova agitação após os primeiros 15 minutos. Em seguida as placas são centrifugadas sob temperatura de refrigeração a 1.500 rpm por 10 minutos. A leitura é realizada comparando com uma escala de hemólise, observando-se o grau de fixação de complemento, com base na quantidade de hemácias restantes e no aspecto do sobrenadante.

O resultado final do teste foi expresso em título, ou seja, a maior diluição do soro que apresentar pelo menos 25% de fixação de complemento. Foram consideradas

positivas as amostras que apresentaram título maior ou igual a quatro.

3.8. Teste de Polarização Fluorescente

Para o diagnóstico da brucelose, o método de polarização fluorescente usa o Polissacarídeo-O (OPS) extraído de células de *B. abortus* e conjugado com fluoresceína. O equipamento de leitura de polarização fluorescente modelo Sentry 100® (Diachemix, USA) foi usado para mensurar o estado de polarização do OPS conjugado. Quando não há anticorpos contra *B. abortus*, a polarização é baixa. Quando há anticorpos, estes se ligam ao conjugado e a polarização aumenta.

Foi utilizado o “*Brucella abortus* Antibody Test Kit” produzido por Diachemix, USA. O Kit é composto de quatro componentes, são eles: um controle negativo; um controle positivo; um tampão de reação concentrado 25X; e o antígeno conjugado.

Foram utilizados tubos de borosilicato (10 X 75 mm) em perfeito estado de conservação, evitando-se aqueles tubos arranhados, sujos ou que tenham qualquer defeito próximo à área de leitura.

Para a interpretação dos resultados do teste, foram adotadas duas metodologias. A primeira, descrita na bula do kit, utilizou pontos de corte variáveis (FPAa), ou seja, considerou positivas amostras com leituras de superiores a 20 mP da média de três leituras do controle negativo. As amostras negativas foram aquelas em que a leitura foi menor que 10 mP acima da média das leituras do controle negativo. As amostras que apresentaram resultados entre 10 mP e 20 mP acima da média do controle negativo foram consideradas suspeitas. Amostras positivas e suspeitas foram retestadas em duplicata usando 20 µL da amostra. Se ambos retestes leram menos de 10 mP acima da média do controle negativo, a amostra foi considerada negativa. Se algum dos retestes se manteve na faixa de 10 a 20 mP superior à média do controle negativo, a amostra foi considerada suspeita. Se ambos retestes apresentaram valores superiores a

20 mP da média do controle negativo, a amostra foi considerada positiva.

A segunda metodologia adotada para interpretação dos resultados da polarização fluorescente utiliza um ponto de corte fixo (FPA_b), que foi estabelecido através de um estudo de validação realizado no LANAGRO/MG (dados não publicados), que utilizou 1.206 amostras de soro que apresentavam resultados concordantes nos testes de Fixação de Complemento e no 2-Mercaptoetanol, estabelecendo assim a população infectada (resultados positivos nos dois testes) e a não infectada (resultados negativos nos dois testes). Para determinação do ponto de corte foi utilizada a técnica *two-graph-receiver operation characteristic* (TG-ROC), pela qual foi estabelecido em 93,6 mP.

3.9. Análise dos dados

Foi calculada a especificidade apresentada por cada teste, com seus respectivos intervalos de confiança (em 95%), em cada coleta e no período total.

A proporção de concordância entre os testes, em cada coleta e em todo período, foi calculada pelo número de amostras diagnosticadas como positivas pelos dois testes, mais o número de amostras diagnosticadas como negativas nos dois testes, dividido pelo total de amostras. A avaliação da concordância entre os testes foi realizada através do coeficiente kappa, empregando-se o pacote estatístico WinEpiscope 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001).

A correlação entre a raça das bezerras e os resultados positivos na FC, e idade à vacinação com resultados positivos na FC foi avaliada através do coeficiente de Spearman para correlações entre

ordenações, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico Stata 10.0. Dos 93 animais utilizados no experimento, apenas de um não se conhecia a raça, sendo portanto retirado desta análise.

Foi avaliada também a influência da raça e da idade à vacinação na persistência dos títulos sorológicos utilizando-se o programa estatístico WinEpiscope 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001) pelo estudo de coorte estratificado. Os animais foram divididos em dois grupos de idade à vacinação (vacinados de 4 a 5 meses, e de 6 a 7 meses), em três grupos de raça (Grupo 1: 1/4, 3/8, 1/2; Grupo 2: 5/8, 3/4, 7/8; Grupo 3: 15/16, 31/32, holandês puro-P.O.) e comparou-se com o resultado do teste de Fixação de Complemento (se positivo ou negativo). Empregou-se o intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Especificidade

Todos os 93 animais testados neste trabalho apresentaram resultado negativo em todos os testes sorológicos realizados nas amostras de soro coletadas imediatamente antes da vacinação.

A quantidade de animais em cada coleta classificados como negativos, suspeitos, ou positivos por teste estão demonstrados na Tabela 1. Para efeito de análise, as amostras que resultaram suspeitas na FPA com ponto de corte variável (FPA_a) foram consideradas negativas. Os pontos de corte da FPA_a durante todo o experimento variaram de 82,76 a 91,7 mP. Para a FPA_b foi utilizado o valor de 93,6 mP como ponto de corte.

Tabela 1: Número de animais diagnosticados como positivos, negativos e suspeitos por teste em cada coleta

Meses após vacinação	AAT		SAL/2-ME		FC		FPA a			FPA b	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Susp	Pos	Neg	Pos
0	93	0	93	0	93	0	93	0	0	93	0
3	39	54	58	35	65	28	66	5	22	81	12
6	81	12	82	11	85	8	78	4	11	81	12
9	86	7	88	5	88	5	82	4	7	87	6
12	87	5	90	2	90	2	86	2	4	88	4

AAT: Antígeno Acidificado Tamponado; SAL/2-ME: Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol; FC: Fixação de Complemento; FPA a: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte variável; FPA b: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte fixo validado (93,6 mP); Neg: Negativo; Pos: Positivo; Susp: Suspeito.

Aos 12 meses após a vacinação, devido ao óbito de uma bezerra por motivos não relacionados a este trabalho, e que já estava negativa em todos os testes nas duas coletas anteriores, foi coletado material de apenas 92 animais.

Em todas as coletas nenhum animal apresentou resultado inconclusivo no SAL/2-ME, ou seja, nenhuma amostra apresentou título de 100 ou maior na soroaglutinação lenta, com título de 25 incompleto (25I) ou não reagente no 2-mercaptoetanol.

Segundo Alton (1978), os testes de aglutinação em bezerras vacinadas aos 6

meses de idade podem se manter positivos por até 18 meses, enquanto o teste de FC resultará negativo para a maioria desses animais 6 meses após a vacinação; no entanto, uma pequena proporção reações persistentes na FC, talvez menos de um por cento, pode ocorrer. Esta proporção não foi observada no presente trabalho, em que cerca de dez por cento dos animais ainda estavam positivos na FC 6 meses após a vacinação.

Os resultados dos testes de 2-ME e FC, em cada coleta realizada após a vacinação, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados das provas de 2-ME e FC nas quatro coletas realizadas após a vacinação.

COLETA II - 3 meses após vacinação										
FC	2-ME									Total
	NR	25I	25	50I	50	100I	100	200I	200	
NR	24	9	-	-	-	-	-	-	-	33
2	12	11	1	8	-	1	-	-	-	33
4	-	2	-	6	-	1	-	-	-	9
8	-	-	-	2	1	4	-	-	-	7
16	-	-	-	-	-	-	2	3	1	6
32	-	-	-	-	-	-	-	2	1	3
64	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total	36	22	1	16	1	6	2	5	4	93

continua

continuação

COLETA III - 6 meses após vacinação										
FC	2-ME									Total
	NR	25I	25	50I	50	100I	100	200I	200	
NR	72	7	-	-	-	-	-	-	-	79
2	2	-	-	4	-	-	-	-	-	6
4	-	1	-	3	-	1	-	-	-	5
8	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total	74	8	0	7	0	4	0	0	0	93

COLETA IV - 9 meses após vacinação										
FC	2-ME									Total
	NR	25I	25	50I	50	100I	100	200I	200	
NR	81	3	-	-	-	-	-	-	-	84
2	1	2	1	-	-	-	-	-	-	4
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
8	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
16	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
32	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
128	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Total	82	5	1	1	0	1	0	3	0	93

COLETA V - 12 meses após vacinação										
FC	2-ME									Total
	NR	25I	25	50I	50	100I	100	200I	200	
NR	86	3	-	-	-	-	-	-	-	89
2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
8	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total	86	4	0	2	0	0	0	0	0	92

FC: Fixação de Complemento; 2-ME: 2-Mercaptoetanol; NR: Não reagente

Nas amostras coletadas três meses após a vacinação, todos os animais positivos no SAL/2-ME também estavam positivos no AAT. No teste da FC, duas bezerras diagnosticadas como positivas estavam negativas no SAL/2-ME, sendo que uma delas também estava negativa no AAT. No teste de polarização fluorescente, utilizando-se o ponto de corte variável (FPAa), dos 22 animais classificados como positivos e 5

dos classificados suspeitos, 3 amostras positivas e 1 suspeita já estavam negativas em todos outros testes.

Nas amostras coletadas seis meses após a vacinação, o teste do SAL/2-ME não apresentou nenhuma amostra com título superior a 100 incompleto. Todos os animais diagnosticados como negativos pelo AAT também foram assim

diagnosticados pelo SAL/2-ME e pela FC, mas dois foram positivos e outros dois suspeitos na FPAa.

Aos nove meses após a vacinação, na 4ª coleta, das 7 amostras com resultado positivo na FPAa, 3 estavam negativas no AAT, enquanto 3 das 4 amostras suspeitas na FPAa também estavam negativas no AAT. Das 5 amostras positivas no SAL/2-ME, 3 apresentaram título de 200I/200I e positivas em todos outros testes (animais número: 8142, 8422 e 8439). O animal 8142 foi negativo em todos os testes aos 6 e 12 meses após a vacinação, o 8422 já estava negativo na FC aos 6 meses da vacinação e se manteve positivo aos 12 meses apenas no AAT e na FPA. Somente os animais 8439 e 8458 foram positivos em todos os testes durante todo período estudado.

Na 5ª coleta, doze meses após a vacinação, a FC e o SAL/2-ME continuaram com os maiores e iguais valores de especificidade, 97,82%. Nenhuma amostra apresentou aglutinação nas diluições acima de 1:50 no teste do 2-ME, assim como título superior a 8 na FC. Vinte e seis animais (cerca de 28%) apresentaram aglutinação na SAL mas nenhuma reação no 2-ME ou na FC, porém um animal com título de 25 incompleto foi classificado como suspeito pela FPA, apresentando 85,8 mP. O outro animal classificado como suspeito pela FPA (85,7 mP) não apresentou reação na FC, com título de 25 incompleto na SAL e no 2-ME. Os dois animais classificados como suspeitos pela FPA foram portanto negativos em todos os outros testes. Entre os 4 animais positivos na FPA, dois também estavam positivos em todos os testes e 1 apenas no AAT.

Foi encontrado um acentuado número de animais reagentes apenas na prova de SAL após 12 meses da vacinação. O que está de acordo com o observado por Alton (1978), que relatou que a queda na quantidade de IgM presente no soro após a vacinação acontece mais cedo e de forma mais abrupta que a de IgG, porém a molécula de IgM é cerca de dez vezes mais reativa que

a IgG, consequentemente, após a vacinação, reações visualizadas nos testes diagnósticos decorrentes da presença de IgM são mais duradouras.

Os valores de especificidade de cada teste, em cada coleta, e seus respectivos intervalos de confiança (em 95%), estão representados abaixo na Tabela 3.

Os valores de especificidade encontrados no AAT e no 2-ME se assemelham aos de outros autores em estudos semelhantes com grandes populações (Samartino *et al.*, 1999) e em rebanhos livres que utilizam vacinação (Koh e Morley, 1981; Dohoo *et al.*, 1986), porém diferem de alguns trabalhos que apresentam resultados mais promissores com um número reduzido de animais ou com doses reduzidas da vacina (Ribeiro *et al.*, 1997; Samartino *et al.*, 2000; Jardim *et al.*, 2006). Apesar da queda acentuada nas reações sorológicas, os testes do AAT e 2-ME apresentaram respectivamente 5 e 2 animais positivos aos 12 meses pós-vacinais, o que corrobora a recomendação do PNCEBT de não utilizá-los neste período.

Estudos indicam que a FC apresenta elevada especificidade, capacidade de discriminação de títulos vacinais e boa correlação com o isolamento do agente etiológico, o que permitiu a sua adoção como teste de referência para avaliação de outros testes sorológicos (Nicoletti *et al.*, 1978; Samartino *et al.* 1999; Dajer *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1998). Por outro lado, essa técnica é bastante trabalhosa, requerendo a utilização de reagentes recém-preparados, pessoal especializado e não há uma padronização internacional (Alton *et al.*, 1975). Os resultados de especificidade da FC no presente experimento, apesar de próximos, não obtiveram os mesmos resultados descritos pelos outros autores, mas confirmaram a boa especificidade do teste, que a partir do 6º mês pós-vacinal apresentava o maior valor de especificidade e se manteve assim até o final do estudo.

Tabela 3: Valores de especificidade com os respectivos intervalos de confiança (em 95%)

		Meses após a vacinação					
		0	3	6	9	12	Total
AAT	Especific. %	100	41,94	87,1	92,47	94,57	83,19
	Erro Pad. %		10,03	6,81	5,36	4,61	3,4
	Lim. Inf. %		31,91	80,28	87,11	89,96	79,79
	Lim. Sup. %		51,96	93,91	97,84	99,17	86,59
SAL/2-ME	Especific. %	100	62,37	88,17	94,62	97,83	88,58
	Erro Pad. %		9,85	6,56	4,58	2,96	2,89
	Lim. Inf. %		52,52	81,61	90,04	94,86	85,68
	Lim. Sup. %		72,21	94,74	99,21	100,0	91,47
FC	Especific. %	100	69,89	91,4	94,62	97,83	90,73
	Erro Pad. %		9,32	5,7	4,58	2,96	2,64
	Lim. Inf. %		60,57	85,7	90,04	94,86	88,09
	Lim. Sup. %		79,22	97,1	99,21	100,0	93,37
FPA a	Especific. %	100	76,34	88,17	92,47	95,65	88,14
	Erro Pad. %		8,64	6,56	5,36	4,17	3,29
	Lim. Inf. %		67,7	81,61	88,11	91,48	84,85
	Lim. Sup. %		84,98	94,74	97,83	99,87	91,43
FPA b	Especific. %	100	87,1	87,1	93,54	95,65	90,83
	Erro Pad. %		6,81	6,81	4,99	4,17	2,94
	Lim. Inf. %		80,29	80,29	88,55	91,48	87,89
	Lim. Sup. %		93,91	93,91	98,53	99,87	93,77

FPA a: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte variável; FPA b: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte fixo validado (93,6 mP).

Os resultados de especificidade encontrados para a FPA também foram inferiores aos encontrados pelo trabalho semelhante realizado por Samartino *et al.* (1999) na Argentina, e em pesquisas realizadas no Canadá, 99,96% (Nielsen *et al.*, 1996), com animais adultos na Argentina, 99,6% (Samartino *et al.*, 1999), e no Reino Unido, 99,1% (McGiven *et al.*, 2003). Por outro lado, Dajer *et al.* (1999) observaram especificidade relativa à FC de 96,9%, com o valor de 89,9 mP como ponto de corte, o que se aproxima bastante dos valores encontrados no presente trabalho para a FPA (95,65%, com erro padrão de 4,17%, no intervalo de confiança de 95%),

com ponto de corte variável ou fixo a 93,6 mP, após os 12 meses da vacinação.

A especificidade relativa da FPA já foi determinada no LANAGRO/MG (dados não publicados) quando utilizado o ponto de corte de 93,6 mP, alcançando 98,3%. Os valores observados no presente trabalho, com este ponto de corte e com ponto de corte variável, encontram-se ligeiramente abaixo. A utilização do ponto de corte fixo possibilitou que o teste alcançasse valores mais altos de especificidade no início do experimento e quando avaliando o período total.

4.2. Concordância entre os testes

O valor de kappa é uma medida de concordância que é ajustada para medir a concordância além do acaso. Pode variar de menos infinito até +1. O valor de menos infinito representa perfeita discordância, zero representa nenhuma concordância além do acaso e +1 representa concordância perfeita. Valores de kappa entre 0,4 e 0,5 indicam um moderado nível de concordância, se entre 0,5 e 0,6 pode

ser considerado como suficiente, se entre 0,6 e 0,8 a concordância é boa (nível esperado quando o mesmo teste diagnostica o mesmo animal em ocasiões diferentes) (Noordhuizen *et al.*, 2001).

As proporções de concordância entre os testes calculados em cada coleta e em todo período estão evidenciadas na Tabela 4. A Tabela 5 apresenta os coeficientes kappa para avaliação da concordância entre os testes.

Tabela 4: Concordância (%) entre os testes após a vacinação

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	Todo período
AAT x SAL/2-ME	77,41	98,92	95,69	96,74	92,18
AAT x FC	69,89	95,69	95,69	96,74	89,48
AAT x FPAa	59,13	94,62	93,54	96,47	85,98
SAL/2-ME x FC	86,02	94,62	100	100	95,14
SAL/2-ME x FPAa	77,41	95,69	95,69	97,82	91,62
FC x FPAa	78,49	92,47	95,69	97,82	91,1
FC x FPAb	78,49	91,4	96,77	97,82	91,1
FPAa x FPAb	89,24	94,62	97,84	97,82	94,87

AAT: Antígeno Acidificado Tamponado; SAL/2-ME: Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol; FC: Fixação de Complemento; FPA a: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte variável; FPA b: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte fixo validado (93,6 Mp).

Tabela 5: Valores de kappa entre os testes após a vacinação

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	Todo período
AAT x SAL/2-ME	0,566	0,95	0,644	0,588	0,733
AAT x FC	0,434	0,777	0,644	0,588	0,621
AAT x FPAa	0,274	0,752	0,537	0,65	0,498
SAL/2-ME x FC	0,69	0,708	1	1	0,785
SAL/2-ME x FPAa	0,481	0,794	0,644	0,657	0,633
FC x FPAa	0,456	0,591	0,644	0,657	0,57
FC x FPAb	0,39	0,554	0,71	0,657	0,523
FPAa x FPAb	0,647	0,752	0,846	0,739	0,731

AAT: Antígeno Acidificado Tamponado; SAL/2-ME: Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol; FC: Fixação de Complemento; FPA a: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte variável; FPA b: Teste de Polarização Fluorescente com ponto de corte fixo validado (93,6 Mp).

Na comparação entre os resultados do AAT e 2-ME, os valores percentuais de concordância aparecem altos, principalmente a partir do 6º mês pós-vacinal, porém, os valores de kappa, com exceção da segunda coleta, estão muito abaixo do encontrado por outros pesquisadores, 0,84 (Megid *et al.*, 2000). Essa diferença pode ser explicada pela heterogeneidade entre o grupo de amostras utilizadas em cada estudo. O trabalho anterior foi realizado com amostras de

animais adultos, de diferentes propriedades e com histórico vacinal desconhecido, enquanto neste, foram usados apenas animais jovens, recém-vacinados e de um mesmo rebanho livre da doença. Dessa forma, quando comparamos dois testes, que apresentam capacidades diferentes de discriminar reações sorológicas vacinais, e utilizando amostras de populações com baixos títulos sorológicos, o valor de kappa esperado deve ser baixo.

A comparação entre os testes do 2-ME e FC já foi realizada por vários pesquisadores, obtendo, geralmente, valores elevados para o kappa. Paulin *et al.* (2002), ao realizarem o teste para bovinos vacinados e não vacinados, encontraram respectivamente os valores 0,919 e 0,885, enquanto Kuroda *et al.* (2004) encontraram 0,96 para bovinos e Pinto *et al.* (2005) encontraram kappa igual a 0,86 para búfalos de um rebanho infectado do Estado de São Paulo. O kappa entre esses dois testes já foi determinado pelo LANAGRO/MG (dados não publicados) a partir do resultado de 194 amostras de soro sanguíneo bovino, encaminhadas para confirmação dos resultados do teste de triagem; foi encontrado o valor de 0,75. Acreditou-se que o menor valor de kappa obtido em relação aos demais pesquisadores foi devido, principalmente, aos resultados discordantes obtidos nas diluições mais baixas de ambas as provas, indicando, portanto, que estudos conduzidos somente com soros de altos títulos sorológico e amostras não-reagentes, ou que contemplem um pequeno número de amostras com baixo título, poderiam superestimar o valor de kappa.

No presente trabalho, quando realizada a comparação das provas do 2-ME e FC, foram encontrados os maiores valores de kappa, sendo a concordância entre os dois testes considerada boa até os 6 meses da vacinação, e perfeita após esse período. O valor do kappa para os resultados de todas as amostras coletadas foi de 0,785. Este valor está muito próximo do encontrado anteriormente pelo LANAGRO/MG, 0,75 (dados não publicados), provavelmente pelos dois estudos terem utilizado um grande número de amostras com baixos títulos.

No México, ao se comparar o resultado do teste de polarização fluorescente com a FC, utilizando 89,9 mP como ponto de corte para a FPA, foi encontrado kappa de 0,96. Indicando que a FC poderia ser substituída pela FPA, obtendo os mesmos resultados, mas com as vantagens práticas da FPA (Dajer *et al.*, 1999).

A concordância, no presente trabalho, entre os testes de FPA e FC, pelo kappa, foi boa a partir do 9º mês pós-vacinal (entre 0,6 e 0,8). Quando considerado o período avaliado como um todo, o indicador kappa, para FPA e a FC, não demonstrou boa concordância (inferior a 0,6). Estes resultados estão muito abaixo dos encontrados no México, 0,96 (Dajer *et al.*, 1999) e posteriormente no LANAGRO/MG, 0,95 (dados não publicados), quando realizado o estudo de validação da FPA e estabelecido o ponto de corte de 93,6 mP. Esta diferença desestimula o uso da FPA nos primeiros meses pós-vacinais, uma vez que a especificidade encontrada na FPA foi ainda inferior à da FC.

O indicador kappa para a concordância das duas metodologias de interpretação de resultados da FPA (FPAa X FPAb) foi sempre superior a 0,6. Porém, o kappa entre FPAb e FC foi ligeiramente superior ao da FPAa e FC, quando consideramos apenas as últimas coletas, provavelmente devido aos melhores valores de especificidade encontrados quando se utilizou um ponto de corte fixo para a FPA.

4.3. Influência da raça e idade à vacinação

Por muito tempo tem sido aceito que quanto mais jovem as bezerras são vacinadas, menores são os níveis de anticorpos produzidos (Redman *et al.*, 1967; Rodrigues e Giorgi, 1973; Alton, 1978). Também é suposto que animais de raças sexualmente mais precoces apresentariam maior persistência de títulos sorológicos decorrentes da vacinação.

A prova de fixação de complemento foi escolhida como referência para avaliar a incidência de reações sorológicas vacinais, pois, de acordo com alguns autores, é uma prova bastante fidedigna e de alta especificidade, o que possibilita distinguir títulos sorológicos controversos pelas técnicas convencionais, tendo se tornado, em diversos países, a técnica de diagnóstico definitivo. A FC é considerada prova de referência recomendada pela OIE

para o trânsito internacional de animais (BRASIL, 2006).

Quando se utilizou o teste de Spearman para avaliar a correlação entre a raça das bezerras e a persistência de títulos sorológicos na FC, o grau de sangue holandês apresentou correlação negativa de

aproximadamente 10% com os resultados positivos na FC ($p < 0,05$). Por outro lado, a idade à vacinação das bezerras não apresentou influência significativa no resultado da FC ($p > 0,05$). Os resultados do coeficiente de correlação de Spearman com o respectivo nível de significância estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Coeficiente de Spearman para correlação dos resultados da FC com raça e idade à vacinação em todo o período estudado.

	Raça X Resultado FC	Idade à vacinação X Resultado FC
Coeficiente de Spearman	- 0,1156	0,0095
Nível de significância	0,0132	0,8385

FC: Fixação de Complemento.

A tendência observada, de os animais de maior grau de sangue zebu apresentarem resultados positivos na FC no período de um ano após a vacinação, pode ser considerada pequena, porém foi bastante significativa (quase 99% de significância), o que pode ser explicado pelo grande número de amostras utilizadas.

Provavelmente, a influência da idade à vacinação sobre o resultado do teste de FC não foi significativa pelo fato de a maioria dos animais ter sido vacinada após os 5 meses de idade e nenhum abaixo dos 4 meses.

As amostras foram então divididas em grupos de grau de sangue e idade à vacinação, com o objetivo de avaliar se a tendência encontrada poderia ser mais bem observada em algum grupo específico. Para isso, utilizou-se um estudo de coorte.

O aspecto mais importante dos estudos de coorte é poder estabelecer a incidência e investigar as potenciais causas que levam a uma determinada condição. A medida da força de uma associação nos estudos de coorte é a análise do risco relativo (RR), ou

seja, quantas vezes os indivíduos expostos desenvolvem a doença quando comparados com os não expostos. Quanto mais forte a associação, maior será o risco relativo ($RR > 1$) e, quando igual a 1, indica que não existe associação.

Algumas vezes o RR pode ser diferente entre outros grupos de variáveis, por exemplo, idade à vacinação. Nesse caso, a variável idade é chamada de fator de confundimento. Dessa forma, as amostras devem ser também separadas em estratos de acordo com a variável de confundimento. Para avaliar se houve diferença significativa entre cada estrato utiliza-se a estatística Breslow-Day (Noordhuizen *et al.*, 2001).

Os animais foram então classificados em três grupos de raça (Grupo 1: $\frac{1}{4}$, $\frac{3}{8}$, $\frac{1}{2}$; Grupo 2: $\frac{5}{8}$, $\frac{3}{4}$, $\frac{7}{8}$; Grupo 3: $\frac{15}{16}$, $\frac{31}{32}$, holandês puro - P.O.), e cada grupo foi dividido em duas faixas etárias de idade à vacinação, (Estrato 1: vacinadas de 4 a 5 meses; Estrato 2: vacinadas de 6 a 7 meses). A Tabela 7 apresenta a porcentagem e o número de bezerras classificadas em cada grupo e estrato.

Tabela 7: Porcentagem e número de animais classificados em cada grupo e estrato.

Idade à vacinação	Raça			Total
	Grupo 1: 1/4, 3/8, 1/2	Grupo 2: 5/8, 3/4, 7/8	Grupo 3: 15/16, 31/32, P.O.	
Estrato 1: 4-5 meses	5 (5,43%)	7 (7,61%)	17 (18,48%)	29 (31,52%)
Estrato 2: 6-7 meses	13 (14,13%)	27 (29,35%)	23 (25%)	63 (68,48%)
Total	18 (19,56%)	34 (36,96%)	40 (43,48%)	92 (100%)

A porcentagem e o número de amostras diagnosticadas como positivas pela FC, durante todo o experimento, em cada grupo e estrato, estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Porcentagem e número de amostras positivas na FC durante todo o experimento.

Idade à vacinação	Raça			Total
	Grupo 1: 1/4, 3/8, 1/2	Grupo 2: 5/8, 3/4, 7/8	Grupo 3: 15/16, 31/32, P.O.	
Estrato 1: 4-5 meses	4 (9,30%)	3 (6,98%)	6 (13,95%)	13 (30,23%)
Estrato 2: 6-7 meses	16 (37,21%)	6 (13,95%)	8 (18,60%)	30 (69,77%)
Total	20 (46,51%)	9 (20,93%)	14 (32,56%)	43 (100%)

Os Riscos Relativos de cada grupo de raça e em cada estrato de idade a vacinação, com os respectivos intervalos de confiança, estão representados nas Tabela 9, 10 e 11.

Tabela 9: Estudo de coorte para o Grupo 1 estratificado por idade à vacinação.

Grupo 1: 1/4, 3/8, 1/2 girolanda						
	RR	Aproximação Logarítmica		Aproximação X^2		x
		Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior	
Bruto	3,563	1,957	6,487	2,034	6,325	4,441
Mantel-H	3,593	1,962	6,579	2,041	6,325	4,432
4-5 meses	2,133	0,657	6,928	0,675	6,738	1,291
6-7 meses	4,374	2,135	8,961	2,269	8,429	4,408
Estatística Breslow-Day para homogeneidade de RR's entre os estratos usando MH-RR: Q(BD) = 6,662 com 1 grau de liberdade; p = 0,010						

Tabela 10: Estudo de coorte para o Grupo 2 estratificado por idade à vacinação

Grupo 2: 5/8, 3/4, 7/8 girolanda						
	RR	Aproximação Logarítmica		Aproximação X^2		x
		Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior	
Bruto	0,403	0,193	0,840	0,198	0,820	-2,509
Mantel-H	0,392	0,193	0,798	0,197	0,778	-2,678
4-5 meses	0,943	0,259	3,426	0,260	3,425	-0,089
6-7 meses	0,275	0,113	0,674	0,119	0,635	-3,024
Estatística Breslow-Day para homogeneidade de RR's entre os estratos usando MH-RR: Q(BD) = 0,976 com 1 grau de liberdade; p = 0,408						

Tabela 11: Estudo de coorte para o Grupo 3 estratificado por idade à vacinação

Grupo 3: 15/16, 31/32, holandês puro-P.O.						
	RR	Aproximação Logarítmica		Aproximação X^2		X
		Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior	
Bruto	0,628	0,332	1,188	0,334	1,181	-1,445
Mantel-H	0,623	0,325	1,194	0,327	1,187	-1,438
4-5 meses	0,605	0,203	1,800	0,206	1,780	-0,913
6-7 meses	0,632	0,282	1,420	0,284	1,411	-1,120
Estatística Breslow-Day para homogeneidade de RR's entre os estratos usando MH-RR: Q(BD) = 2,110 com 1 grau de liberdade; p = 0,206						

O Grupo 1 foi o único que apresentou Risco Relativo maior que 1,0, indicando que, para os animais deste grupo, o risco de apresentarem resultados positivos na FC foi cerca de 3,5 vezes maior. Este grupo foi também o único em que a idade dos animais à vacinação foi significativamente um fator de confundimento, de forma que os animais do Estrato 2 apresentaram risco maior que os animais do Estrato 1. O RR deste Estrato foi 2,13, porém, 1,0 está incluído dentro do intervalo de confiança (0,675 a 6,738) indicando que não houve associação positiva significativa neste Estrato. O valor da estatística Breslow-Day para o Grupo 1 excedeu o valor crítico de 6,64 (com $p < 0,01$), indicando dessa forma que interação entre raça e idade à vacinação está presente neste Grupo (Noordhuizen *et al.*, 2001).

Nos Grupos 2 e 3 o Risco Relativo foi menor que 1,0, indicando que para estes animais a raça se mostraria como um fator de proteção. Porém, não houve associação significativa para raça e a presença de

reações positivas para os animais desses grupos, uma vez que no Grupo 3, 1,0 estava dentro de intervalo de confiança do RR, enquanto que no Grupo 2, apesar de 1,0 estar fora do intervalo de confiança, o valor de X foi inferior ao valor crítico de 3,84 (com $p < 0,05$). Nos dois grupos o valor da estatística Breslow-Day foi inferior ao valor crítico da tabela do qui-quadrado, indicando portanto que a idade à vacinação não interferiu na incidência de resultados positivos dentro desses grupos, não houve interação.

Quando realizado o estudo de coorte para conferir se os animais vacinados mais tardiamente, ou seja, entre 6 e 7 meses, teriam maior risco de apresentar persistência de títulos na FC, não foi observada associação significativa. Porém o valor da estatística Breslow-Day foi muito superior ao valor crítico (6,64 para $p < 0,01$), indicando, portanto, que houve interação entre a idade à vacinação e a raça dos animais de cada grupo. Estes dados estão apresentados abaixo na Tabela 10.

Tabela 12: Estudo de coorte para idade à vacinação estratificado por grupo de raça.

Avaliação do Estrato 2 (vacinadas ao 6 e 7 meses) como fator de risco						
	RR	Aproximação Logarítmica		Aproximação X^2		X
		Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior	
Bruto	1,067	0,556	2,045	0,556	2,044	0,194
Mantel-H	1,045	0,542	2,017	0,542	2,017	0,133
Grupo 1	1,538	0,514	4,602	0,519	4,563	0,777
Grupo 2	0,519	0,130	2,073	0,133	2,023	-0,946
Grupo 3	0,996	0,346	2,872	0,346	2,872	-0,007
Estatística Breslow-Day para homogeneidade de RR's entre os estratos usando MH-RR: Q(BD) = 18,393 com 2 graus de liberdade; $p < 0,0001$						

5. CONCLUSÕES

Os testes confirmatórios adotados pelo PNCEBT apresentaram ótima capacidade de discriminação de títulos sorológicos vacinais ao final do experimento, com resultados de especificidade muito consistentes e próximos aos encontrados na literatura quando realizados em animais adultos. A concordância perfeita entre os resultados da FC e da SAL/2-ME, encontrada pelos valores de kappa após os nove meses da vacinação, demonstram que a partir deste período as duas técnicas teriam capacidade equivalente para discriminar reações decorrentes da vacinação.

A FPA apresentou bom desempenho ao longo deste trabalho. Nos últimos meses do experimento, foi encontrada alta especificidade e boa correlação com os testes confirmatórios adotados no Brasil, além dos benefícios inerentes à leitura da prova sem a influência da subjetividade do analista, facilidade de execução e rapidez na obtenção de resultados. A interpretação das leituras do teste pela adoção de um ponto de corte fixo, e validado para a situação brasileira, trouxe melhores resultados ao teste, com a vantagem ainda, de não classificar animais como suspeitos. Estes resultados mostram que, para estas condições de uso, principalmente a partir dos 12 meses da vacinação, a FPA poderia se apresentar como mais uma importante ferramenta para o diagnóstico correto de animais sadios e vacinados.

Foi encontrada uma incidência significativamente maior de resultados positivos na FC apenas naqueles animais com maior grau de sangue zebu vacinados mais tardiamente, entre os seis e sete meses de idade, indicando que, para esses animais, os anticorpos vacinais podem persistir a títulos detectáveis pelas provas sorológicas por um período relativamente maior.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an avaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Australian Veterinary Journal*. v. 51, p. 57-63, Feb. 1975.
- ALTON, G.G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Austalian Veterinary Journal*, v. 54, December, p. 551-557, 1978.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techiniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomic, 1988. 189p.
- ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA. Belo Horizonte: FEPMVZ, v. 61, supl. 1, p. 1-141, Nov. 2009.
- BRUCELLOSIS in humans and animals. Geneva: WHO/CDS/EPR/2006. 89p.

- CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 61, supl. 1, p. 46-55, 2009.
- DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIERREZ, E.; PENA, G.; GURRIA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Prev. Vet. Med.* v. 40, p. 67-73, 1999.
- DOHOO, I.R.; WRIGHT, P.F.; RUCKERBAUER, G.M.; SAMAGH, B.S.; ROBERTSON, F.J.; FORBES, L.B. Comparison of five serological testes for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Res.* v. 50, p. 485-493, 1986.
- JARDIM, G.C.; PIRES, P.P.; MATHIAS, L.A.; RIBEIRO, O.C.; KUCHEMBUCK, M.R.G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. *Pesq. Vet. Bras.* v. 26, n. 3, p. 177-182, 2006.
- KOH, S.H.; MORLEY, F.H.W. The effect of calthood vaccination with strain 19 on the serological diagnosis and eradication of bovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal*, v.57, p. 551-553, 1981.
- KURODA, R.B.S.; PAULIN, L.M.S.; NOZAKI, C.N.; SILVA JÚNIOR, F.F.; GERONUTTI, L.; MEGID, J. Prevalência da brucelose bovina na microrregião da Serra de Botucatu – estudo comparativo dos resultados das técnicas de soroaglutinação lenta em tubos, 2-mercaptoetanol e fixação de complemento. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 2, p. 137-142, 2004.
- MARTIN, S.W.; HUDSON, M.R. The effects of *Brucella* strain 19 vaccination on titers in the tube agglutination test: a case control study. *Can. J. comp. Med.* v. 42, p. 35-42, 1978.
- MATHIAS, L.A.; MACMILLAN, A.P. Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico da brucelose bovina. *Pesq. Vet. Bras.* v. 15, n. 4, p. 101-105, 1995.
- MATHIAS, L.A.; CHAVES, L.F.; CHEN, A.A.; GIRIO, R.J.S.; VALÉRIO NETO, W. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. *Pesq. Vet. Bras.* v. 21, n. 4, p. 139-142, 2001.
- MCGIVEN, J.A.; TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MACMILLAN, A.P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *J. Immunological Methods*, v. 278, p. 171-178, 2003.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 37, n. 5, 2000.
- NICOLETTI, P.; JONES, L.M.; BERMAN, D.T. Adult vaccination with standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in dairy herd infected with brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 173, n. 11, p. 1445-1449, 1978.
- NICOLETTI, P.; WINTER, A.J.; NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. The immune response to *B. abortus*: the cell mediated response to infections. In: *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 83-95, 1990.
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 5-9, 2002.

- NIELSEN, K.; CHERWONOGRODZKY, J.; DUNCAN, J.; BUNDLE, D. Enzyme immunoassay for the differentiation of the antibody response of *Brucella abortus* infected or strain 19 vaccinated cattle. *Am. J. Vet. Res.* v. 50, n. 5, 1989.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Meth.* v. 195, p. 161-168, 1996.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGIL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, B.; COATS, M.; HENNAGER, S.; DAJER, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* v. 66, p. 321-329, 1998.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HEHEGHAN, T.; McNAMRA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNA-MARTÍNEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet. Microbiol.*, v. 80, p. 163-170, 2001.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 447-459, 2002.
- NIELSEN, K.; GALL, D. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v. 23, n. 3, p. 989-1002, 2004.
- NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; THRUSFIELD, M.V.; GRAAT, E.A.M. *Application of quantitative methods in veterinary epidemiology*. 2. ed. Wageningen: Wageningen Pers, 2001. 429p.
- ORNELAS-SANTOS, P.P.; ARAÚJO, R.F.; REIS, R.; MOREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, J.B.; VIANA, F.C.; BARROS, D.G.; JARDIM, O.M. Brucelose bovina. I. Persistência da aglutinação pós-vacinal em bezerras de raças zebuínas vacinadas com amostra B-19. *Arq. Esc. Vet. U.F.M.G.* v. 27, n. 3, p. 363-373, 1975.
- PACHECO, G.; MELLO, M.T. *Brucelose*. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1956. 727 p.
- PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes de 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 4, p. 41-47, 2002.
- PINTO, M.R.A.; FAGLIARI, J.J.; MATHIAS, L.A.; MEGID, J.; SALGADO, V.R. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação de complemento e 2-mercaptoetanol, para diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. *ARS VETERINARIA*, v. 21, suplemento, p. 147-154, 2005.
- PROGRAMA Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006. 188p. (Manual Técnico).
- RAGAN, V. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 11-18, 2002.
- REDMAN, D.R.; DEYOE, B. L.; KING, N.B. Resistance of cattle to *Brucella abortus* following vaccination at two and three months of age. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 150, n. 4, p. 403-407, 1967.
- RIBEIRO, M.G.; SPAGO, N.; FAVA, N.; RATTI Jr.J.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.49, n.2, p. 137-150, 1997.

RODRIGUES, F.M.; GIORGI, W. Observação dos títulos aglutinantes em soros de bovinos de diferentes idades vacinados com amostra B19. *O Biológico*, v. 39, n.2, p. 36-39, 1973.

SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J. Immunoassay*, v. 20, n. 3, p. 115-126, 1999.

SAMARTINO, L.E.; FORT, M.; GREGORET, R.; SCHURING, G.G. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, v. 45, p. 193-199, 2000.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. Situação epidemiologic da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 61, supl. 1, p. 103-108, 2009.

SUTHERLAND, S.S. Immunology of bovine brucellosis. *Vet. Bull.*, v.50, p. 359-368, 1980.

THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J.P.; FRANKENA, K. Win Episcopa 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec*, v. 148, n.18, p. 567-572, 2001.