

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DIANA MARIA LIMA LOSSANO

**AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA_i) NA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *Brucella abortus* EM NOVILHAS
IMUNIZADAS COM VACINA AMOSTRA B19**

ALEGRE – ES

2020

DIANA MARIA LIMA LOSSANO

**AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA_i) NA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *Brucella abortus* EM NOVILHAS
IMUNIZADAS COM VACINA AMOSTRA B19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

ALEGRE-ES

2020

FICHA CATALOGRÁFICA (versão final)

DIANA MARIA LIMA LOSSANO

**AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA) NA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *Brucella abortus* EM NOVILHAS
IMUNIZADAS COM VACINA AMOSTRA B19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovado em 27 de abril de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Dirlei Molinari Donatele
Universidade Federal do Espírito Santo

Com muito amor, dedico este trabalho aos meus pais, Ailton e Geralda, ao meu companheiro Júnior e aos meus filhos Maria Aparecida (*in memoriam*) e Filadelphio.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Agradeço primeiramente a Deus que me fortalece toda vez que estou em dificuldades, a esse Deus maravilhoso que nunca nos desampara, que age perfeitamente sempre. Maria Nossa Mãe do céu que sempre recorre a Deus por nós, que cobre-nos com seu manto de carinho e amor.

Minha mãe, Geralda das Graças Lima Lossano, agradeço pela força, pelo carinho, pelas orações e por todas as vezes que não me deixou desistir. Meu Pai, meu irmão e minha irmã, por saber que mesmo nos momentos difíceis posso contar com vocês.

Meu esposo Clóvis José Fernandes Lamas Júnior: amigo, companheiro, aquele que me apoiou, que me ajudou, que ficou com as crianças todos os momentos que precisei para estudar e conseguir vencer mais essa etapa na minha vida.

Meus filhos, Maria Aparecida Lamas Lossano (*in memoriam*) que esteve o tempo todo comigo me animando e me dando forças para continuar pois não foi fácil, me fez lutar pelo o que eu queria e me deu todas as forças que eu precisava, mesmo querendo minha atenção e eu as vezes não podia dar, mas sempre que estávamos juntas era maravilhoso, e hoje me ajuda do céu, está lá, me vendo vencer essa etapa na minha vida, que dedico especialmente a você (minha Maria Aparecida). Meu filho Filadelphio Paiva Lamas Lossano que desde tão pequeno me ajuda e me dá força e alegrias para continuar feliz ao seu lado.

Minha amiga Camila Maraçati Jordão, que tanto me incentivou e me ajudou, com suas orações, na loja, com muito carinho e amizade. As minhas colaboradoras e amigas Fabíola Rodrigues Zampili e Thays Rodrigues Zampili, por cuidarem tão bem dos negócios na minha ausência.

Minhas amigas que vou levar para a vida toda, que nos conhecemos na caminhada do mestrado Beth (Elisabeth Prado) e Mayara Riva, pessoas incríveis, que não mediram esforços para me ajudar em tudo o que precisava, acredito que Deus coloca anjos na vida da gente, e vocês foram esses anjos.

Ao meu orientador, Marcos Santos Zanini, que desde o início foi uma pessoa dedicada, responsável, inteligente e de um coração enorme, sempre entendeu minha situação diante de cada obstáculo com respeito e humildade, abrigada mesmo de coração por tudo, aprendi muito com você, vou levar para a minha vida tudo que aprendi você merece todo meu respeito.

A Banca de Qualificação e Defesa, por terem aceitado participar deste momento tão especial para mim, Professores: Dirlei Molinari Donatele, Ana Paula Madureira, José de Carvalho.

As alunas do Laboratório de Microbiologia que ajudaram na realização dos testes de ELISAI.

Aos amigos e aos professores, agradeço por todo carinho, pela paciência e ensinamentos passados, e pela atenção que tiveram comigo.

Aos produtores e a Área experimental da UFES, que forneceram os animais para serem utilizados no experimento.

“O Senhor é meu Pastor e nada me faltará.”

Salmo, 23:1

RESUMO

LOSSANO, DIANA MARIA LIMA. **Avaliação de um teste imunoenzimático indireto (ELISAI) na detecção de anticorpos anti *Brucella abortus* em novilhas imunizadas com vacina amostra B19.** 2020. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2020.

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa causada tradicionalmente pela bactéria *Brucella abortus*. O diagnóstico por métodos sorológicos e a vacinação com a cepa *B. abortus* B19 são as formas convencionais e tradicionais de controle da doença. O teste sorológico de triagem oficial padrão no Brasil é Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), entretanto, não é aceito internacionalmente, sendo necessários outros testes para sua validação. Diante do exposto, objetivou-se avaliar e validar um protocolo de ELISA indireto utilizando soro de animais vacinados tendo, como antígeno para sensibilização da placa de poliestireno, moléculas solúveis extraídas de uma vacina comercial de *Brucella abortus* amostra B19. Em paralelo, o teste AAT foi utilizado como controle para os resultados obtidos. Para tanto, foram coletados soros de 22 novilhas vacinadas com B19 em propriedades rurais dos municípios de Jerônimo Monteiro, Alegre e São José do Calçado, Espírito Santo, Brasil, nos tempos máximos de oito, 12 e 16 meses pós vacinação com B19 e submetidos aos testes ELISA indireto e AAT, para verificar a presença qualitativa de anticorpos. Os resultados foram avaliados pelos testes estatísticos de Qui-quadrado de duas variáveis para verificar associação entre os resultados. Calculou-se o índice de concordância Kappa e também sensibilidade e especificidade, e valores preditivos positivos e negativos. O protocolo de ELISAI, utilizando antígenos solúveis de vacina comercial de *Brucella abortus* deste experimento mostrou sensibilidade (0,7826) e especificidade (0,3023) atingindo o objetivo deste experimento para detecção de anticorpos anti-*brucella* em fêmeas impúberes vacinadas com B19 nos tempos de oito, 12 e 16 meses pós vacinação. Entretanto, observou-se que não existe uma associação significativa entre os resultados dos testes AAT e ELISAI como mostra o teste de qui-quadrado para tabela de contingência 2x2 ($\chi^2=0,545$, $p=0,46$).

Palavras-chave: brucelose. diagnóstico. sorologia

ABSTRACT

LOSSANO, DIANA MARIA LIMA. **Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAI) on the detection of antibodies *Brucella abortus* in heifers vaccinated with B19 vaccine.** 2020. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2020.

Bovine brucellosis is an infectious disease caused traditionally by the bacteria *Brucella abortus*. Diagnosis by serological methods and vaccination with the *B. abortus* B19 strain are the conventional and traditional forms of disease control. The standard official serological screening test in Brazil is Acidified Antigen (AAT), however, it is not accepted internationally and further tests are necessary for its validation. Given the above, the objective was to evaluate and validate an indirect ELISA protocol using serum from vaccinated animals having, as an antigen for sensitizing the polystyrene plate, soluble molecules extracted from a commercial vaccine of *Brucella abortus* sample B19. In parallel, the AAT test was used as a control for the results obtained. For this purpose, sera were collected from 22 heifers vaccinated with B19 in rural properties in the municipalities of Jerônimo Monteiro, Alegre and São José do Calçado, Espírito Santo, Brazil, at the maximum times of eight, 12 and 16 months after vaccination with B19 and submitted to indirect ELISA and AAT tests to verify the qualitative presence of antibodies. The results were evaluated using the Chi-square statistical tests of two variables to verify the association between the results. The Kappa agreement index was calculated, as well as sensitivity and specificity, and positive and negative predictive values. The ELISAI protocol, using soluble antigens from the commercial vaccine of *Brucella abortus* in this experiment, showed sensitivity (0.7826) and specificity (0.3023), reaching the objective of this experiment to detect anti-*brucella* antibodies in impoverished females vaccinated with B19 at the time eight, 12 and 16 months after vaccination. However, it was observed that there is no significant association between the results of the AAT and ELISAI tests as shown by the chi-square test for the 2x2 contingency table ($\chi^2 = 0.545$, $p = 0.46$).

Key-words: brucellosis. diagnosis. serology

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 -	Estrutura antigênica de <i>S Brucella</i> . (A) Estrutura geral dos antígenos de <i>Brucella</i> ; (B) estrutura das proteínas da membrana externa (Omp) e das seções S-LPS.....	15
Figura 2 -	Diagrama esquemático de lipopolissacarídeo da membrana de bactérias gram-negativas.....	17
Figura 3 -	Respostas antigênicas de oito novilhas vacinadas com 3×10^{10} de <i>Brucella abortus</i> B19, 10 meses pós vacinação IgM e IgG ₁ mensurados pela técnica de ELISA.....	21
Figura 4 -	Reação de aglutinação: antígeno e anticorpo de um teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) em uma fêmea bovina reagente para brucelose bovina.....	33
Figura 5 -	Número de animais reagentes e não reagentes para os testes de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Teste imunoenzimático indireto (ELISAI) nos diferentes tempos de coleta.....	36

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

2-ME – 2-Mercaptoetanol

AAT – Antígeno Acidificado Tamponado

B – *Brucella*

ELISAI – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay indirect

FPA – Teste de Polarização Fluorescente

GVOS – Glóbulos Vermelhos de Ovinos

HN – Haptenos Nativos

IgG1 – Imunoglobulina G1

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mbp – Milhões de pares de bases

Omp – Outer membrane proteins/ proteínas da membrana externa

PBS – Tampão fosfato salino

PNCEBT – Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal

R-LPS - Lipopolissacarídeo rugoso

sp. – Espécie

SAT – Teste de Soroaglutinação em Tubos

S-LPS - Lipopolissacarídeo liso

TAL – Teste do Anel em Leite

TFC – Teste de Fixação do Complemento

UI – Unidades Internacionais

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1 -	Leitura do resultado do teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Teste imunoenzimático indireto (ELISAI) em amostras de soro de 22 novilhas vacinadas com vacina comercial Brucelina B19 Vallée®.....	35
Tabela 2 -	Frequência dos resultados dos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e do Teste imunoenzimático indireto (ELISAI) realizados em novilhas vacinadas contra Brucelose com a cepa B19.....	37
Tabela 3 -	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) com respectivos IC _{95%} do método de imunoenzimático indireto (ELISAI) considerando o método Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como padrão ouro.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Gênero <i>Brucella</i>	14
2.1.1 Espécies e Morfologia	14
2.2 Antígenos brucélicos: aspectos relevantes para o diagnóstico.....	17
2.3 Reações cruzadas com outras bactérias.....	18
2.4 Vacinação bovina contra brucelose.....	19
2.4.1 Amostra <i>Brucella abortus</i> 19 (B19).....	19
2.4.2 Amostra <i>Brucella abortus</i> RB51.....	22
2.5 Técnicas oficiais no Brasil para diagnóstico da brucelose bovina Brasil (MAPA, I.N. 10/2017).....	22
2.5.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT).....	23
2.5.2 Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME).....	24
2.5.3 Teste de Polarização Fluorescente (FPA).....	25
2.5.4 Teste de Fixação de Complemento (TFC).....	26
2.5.5 Teste do Anel em Leite (TAL).....	26
2.5.6 Teste imunoenzimático indireto (ELISAI).....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Localização da experimentação e animais.....	30
3.2 Obtenção do antígeno solúvel de <i>B. abortus</i>	30
3.3 Protocolo da técnica de ELISAI.....	31
3.4 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado – AAT.....	32
3.5 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÕES	42
6 REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa provocada tradicionalmente pela bactéria intracelular facultativa *Brucella abortus*. Ela tem morfologia de coco bacilos gram-negativos, imóveis infectando animais e o homem. Sendo uma zoonose, acarreta problemas sanitários e prejuízos econômicos. As principais manifestações nos animais são abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e baixa produção de leite. Todos esses fatores contribuem para uma considerável baixa na produção de alimentos (BARBOSA *et al.*, 2013; MOLINARO, 2009; NIELSEN, 2004).

A doença apresenta grande importância pois acarreta problemas sanitários e prejuízos econômicos, devido à considerável redução na produção animal e por se tratar de uma zoonose de distribuição mundial. Desta forma, a brucelose encontra-se na lista da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e resulta em barreiras para a comercialização dos produtos de origem animal e dos próprios animais, sendo motivo de restrições ao mercado internacional (OIE, 2018).

Assim, torna-se importante destacar que existe uma prevalência heterogênea do número de focos nos rebanhos bovinos dos estados brasileiros. Para o ano de 2016, as prevalências variaram entre 0,9% a 6,4% e o estado do Espírito Santo apresentou 3,8% do rebanho infectado (BARDDAL, 2019).

O diagnóstico da brucelose, com a identificação e a eliminação dos animais reagentes, é essencial para o controle e a vigilância dessa doença (MOLNÁR *et al.*, 1997). O diagnóstico da brucelose pode ser realizado por meio de métodos diretos, ligados à identificação do microrganismo, ou por meio de métodos indiretos, com a detecção de anticorpos contra *B. abortus*. A vacinação também é uma forma de controle da doença, entretanto, para animais vacinados com a vacina B19, os testes de diagnóstico somente deverão ser aplicados às fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, quando estas forem vacinadas até oito meses de idade (BRASIL, 2017).

Como testes indiretos sorológicos oficiais de triagem, conforme a Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2017), podem ser utilizados os testes de

1 soroaglutinação como Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o Teste do Anel em
2 Leite (TAL). Enquanto, que como testes confirmatórios oficiais para resultados
3 duvidosos dos testes de triagem podem ser utilizados o teste do 2-Mercaptoetanol
4 (2-ME) associado ao Teste de Soroaglutinação em Tubos (SAT), o Teste de Fixação
5 de Complemento (TFC) e o Teste de Polarização Fluorescente (TPF). Entretanto,
6 outros testes diretos e indiretos de diagnóstico para brucelose, tais como o Teste
7 imunoenzimático indireto, classicamente denominado ELISAI (Indirect Enzyme-
8 Linked Immunosorbent Assay) que possui alta sensibilidade e especificidade e
9 assemelham-se ao AAT em resultados, podem ser utilizado para complementar ou
10 substituir os testes confirmatórios segundo a legislação do MAPA (BRASIL, 2017).

11 O teste de ELISAI para brucelose tem seu método descrito pela primeira vez
12 em 1971 por Engvall e Perlman (1971). Após isto outras variáveis do ELISAI foram
13 aplicados ao soro e ao leite (LAMB *et al.*, 1979; SAUNDERS *et al.*, 1977; THOEN *et*
14 *al.*, 1979) com diferentes materiais imunossorventes, antígenos, condições de
15 revestimento e conjugados sendo que a experiência levou à consolidação de apenas
16 algumas variantes da técnica de ELISAI (DUCROTOY *et al.*, 2016).

17 Assim, como contribuição para os estudos quanto aos métodos de
18 diagnóstico para brucelose bovina, objetivou-se desenvolver um protocolo de
19 ELISAI, tendo como diferença dos protocolos descritos na literatura, o antígeno
20 utilizado para sensibilização da placa de poliestireno, moléculas solúveis de uma
21 vacina comercial de *Brucella abortus* amostra B19 lisada pelo processo de
22 congelamento/descongelamento. Esse processo libera, além dos constituintes da
23 membrana externa que são os principais antígenos utilizados pelos protocolos
24 descritos na maioria da literatura para testes sorológicos anti *Brucella* spp, também
25 diversos outros antígenos internos bacterianos que podem ser indutores de
26 produção de anticorpos (BERMAN *et al.*, 1980). Por fim, este antígeno complexo foi
27 utilizado no teste de ELISAI para verificar a presença de anticorpos anti-*Brucella* em
28 fêmeas impúberes vacinadas com B19 nos tempos de oito, 12 e dezesseis meses
29 pós vacinação.

30

31

32

33

2. REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão aborda aspectos relacionados diretamente com o objetivo deste estudo, ou seja, o estímulo provocado pela vacinação, sua avaliação e implicações. Assim sendo, a revisão está focada nos aspectos estruturais, bioquímicos e antigênicos relevantes para os métodos de diagnóstico em geral.

2.1 Gênero *Brucella*

2.1.1 Espécies e Morfologia

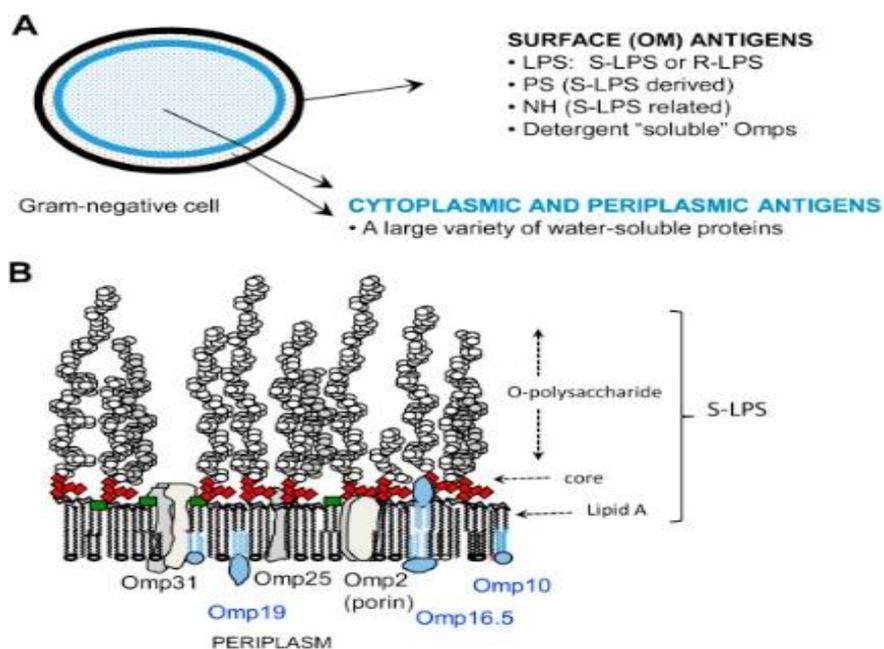
A brucelose é uma zoonose causada pelas bactérias do gênero *Brucella*, que afeta grande variedade de mamíferos domésticos e selvagens. Classicamente, o gênero inclui seis espécies: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis* e *Brucella ovis*. Os seres humanos não são uma fonte de contágio para a brucelose, e os animais domésticos constituem o principal reservatório para infecção humana. Entre os animais domésticos, os ruminantes são altamente suscetíveis à brucelose, sendo infectados preferencialmente pelas espécies *B. melitensis* e *B. abortus*. O gênero *Brucella* pertence taxonomicamente ao filo Proteobacteria composto por bactérias gram-negativas considerando a sequência genética 16S rRNA (MORENO, 2014).

As bactérias do gênero *Brucella* spp. são parasitas intracelulares facultativos, apresentando-se como cocos, cocobacilos ou bastonetes curtos, com 0,5-0,7 x 0,6-1,5 mm, gram-negativos, não possuem cápsula, e arranjam-se em forma individual, em cadeias curtas ou em pequenos grupos. O genoma do gênero *Brucella* contém dois cromossomos de 2,1 e 1,5 Mpb, exceto o genoma do biovar 3 de *B. suis*, pois possui um único cromossomo que codifica 3,1 Mpb. Um sequenciamento de rRNA definiu fortes relações filogenéticas da *Brucella* com o *Ochrobactrum anthropi*, uma bactéria ambiental associada com infecções oportunistas (BARBOSA *et al.*, 2013; CORBEL, 1997; MOLINARO, 2009; NIELSEN, 2004).

1 O gênero *Brucella* spp é composto de bactérias produtoras de nitrato
 2 redutase, e possuem um sistema de transporte de elétrons baseado no sistema
 3 citocromo possuindo o oxigênio ou nitrato comoceptor final de elétrons. Bactérias
 4 deste gênero requerem CO₂ suplementar para seu crescimento, especialmente no
 5 cultivo primário. As colônias no ágar dextrose são transparentes, elevadas,
 6 convexas com bordos inteiros, geralmente lisas e com superfície brilhante. A
 7 temperatura ótima para crescimento é de 37 ° C, ocorrendo também o crescimento
 8 numa faixa entre 20 ° C e 40 ° C, em pH ótimo de 6,6 a 7,44 (CORBEL, 1997).

9 Especialmente as espécies *B. melitensis* e *B. abortus* possuem membrana
 10 externa composta de lipopolissacarídeos de forma lisa (S-LPS), molécula complexa
 11 de lipídeos e carboidratos presente na parede celular de bactérias gram negativas
 12 em geral. Esta membrana externa de LPS contém o lipídeo A ligado a um
 13 polissacarídeo de duas seções: o oligossacarídeo central (“core”) e o O-
 14 polissacarídeo (Figura 1) sendo os antígenos protéicos entremeados no “core” e
 15 lipídeo A envolvidos na resposta imune mais consistente e duradoura envolvendo
 16 células de memória (DUCROTOY, 2016).

17 Figura 1 - Estrutura antigênica de S *Brucella*. (A) Estrutura geral dos antígenos de
 18 *Brucella*; (B) estrutura das proteínas da membrana externa (Omp) e das seções S-
 19 LPS.
 20



21
 22 FONTE: Ducrotoy (2016).
 23

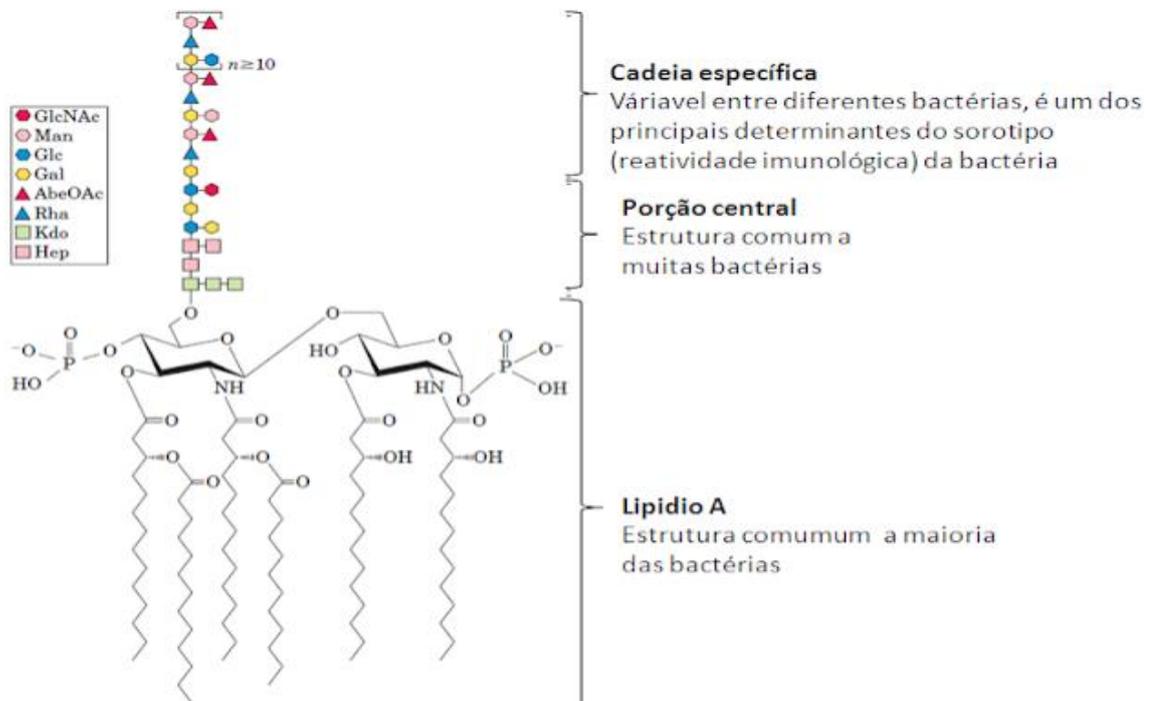
1 O polissacarídeo O é a parte mais externa do S-LPS, cobre a membrana
2 externa quase inteiramente, e representa a principal molécula de superfície
3 composta de um homopolímero de N-formil-perosamina. Esta estrutura é relevante
4 para indução de imunidade e diagnóstico. A localização estrutural de antígenos
5 determina se os anticorpos podem ser detectados com suspensões bacterianas,
6 com extratos ricos em componentes externos ou apenas com frações
7 periplasmáticas-citosólicas, ou seja, proteínas solúveis em água ou com proteínas
8 purificadas, definindo assim o método de extração dos antígenos que podem ser
9 usados em testes sorológicos. O Lipídeo A é a porção embebida na membrana
10 externa da parede celular onde estão inseridas as proteínas solúveis de membrana
11 externa ou porinas (Omp). Após a morte da bactéria, o lipídeo A é liberado e
12 funciona como uma endotoxina, que pode levar ao choque séptico. O cerne (“core”)
13 polissacarídico tem função estrutural. O polissacarídeo O funciona como antígeno e
14 é útil na tipagem das bactérias gram-negativas (ZACCHEUS *et al.*, 2013).

15 Estruturalmente, o LPS pode ser liso (Smooth) ou rugoso (Rough),
16 dependendo da espécie de *Brucella*. Esses dois LPS ligados ao lipídio A da parede
17 externa está presente nas demais bactérias gram-negativas, e diferem
18 respectivamente na presença e na ausência de uma seção longa de O-
19 polissacarídeo (Figura 1 B). O S-LPS é encontrado em cepas do tipo selvagem de
20 todas as espécies clássicas de *Brucella*, mas não em *B. ovis* e *B. canis* que
21 possuem um R-LPS entretanto, ambas apresentações de LPS são indutoras de
22 respostas inflamatória e imune. A Cadeia O-específica se repete igual e
23 densamente na membrana externa sendo formada de diferentes oligossacarídeos
24 (Figura 2). Estão presentes no LPS ainda resíduos de ácidos graxos na porção do
25 lipídeo A, além do oligossacarídeo central e a Cadeia O-específica que são o
26 principal indutor de diferentes sorotipos da bactéria. Diferentes espécies bacterianas
27 possuem estruturas de LPS diferentes, ainda que possuam uma região lipídica
28 (lipídeo A) comum, também denominada endotoxina pois nesta estão ligados os
29 OMPs, “core” (NELSON; COX, 2011).

30 Esse conjunto que forma o LPS é o maior fator de virulência de bactérias
31 gram negativas, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das
32 reações inflamatórias. Esta endotoxina é um antígeno fraco não específico que é
33 pobremente neutralizado por anticorpos, entretanto sendo capaz de ativar a cascata
34 do complemento. A ativação do complemento envolve a formação de cininas, outro

1 importante mediador da inflamação. Além do mais, ativa plaquetas, mastócitos,
 2 basófilos e células endoteliais. O LPS induz os macrófagos a secretarem outras
 3 proteínas, as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator alfa de necrose tumoral, oxigênio
 4 reativo, nitrogênio intermediário (óxido nítrico), interferons, fatores ativadores de
 5 plaquetas e prostaglandinas. (NELSON; COX, 2011).

6 Figura 2 - Diagrama esquemático de lipopolissacarídeo da membrana de bactérias
 7 gram-negativas



8
 9
 10
 11

FONTE: Nelson e Cox (2011).

12 Particularmente, as espécies *B. abortus* e *B. melitensis* são antígenicamente
 13 muito próximas em função de seus antígenos comuns: S-LPS (smooth)
 14 polissacarídeos haptênicos relacionados aos polissacarídeos hidrolíticos
 15 (equivalente ao O-polissacarídeo); os haptenos nativos (NH) e o polissacarídeo B; e
 16 antígenos proteicos. Essa classificação é relevante, pois a primeira categoria apenas
 17 provoca e/ou reage com anticorpos. Enquanto que a segunda evoca respostas
 18 mediadas por anticorpos e por células da resposta imune celular pela presença de
 19 resíduos proteicos (DUCROTOY *et al.*, 2018).

20

21

22 2.2 Antígenos brucélicos: aspectos relevantes para o diagnóstico

23

1 O arranjo estrutural do S-LPS (Figura 1B) torna os epítomos de O-
2 polissacarídeos, mas não o núcleo ou os epítomos lipídicos A, facilmente acessíveis
3 aos anticorpos quando se utilizam bactérias S intactas como antígenos de
4 diagnóstico. Conseqüentemente, os testes realizados com células S *Brucella*
5 detectam principalmente anticorpos anti-O-polissacarídeos. Devido ao fato de não
6 apresentarem carga superficial, tornam-se suspensões estáveis adequadas para
7 testes de aglutinação. Além disso, embora a maioria das bactérias gram-negativas
8 ative o complemento independentemente de anticorpos, as S *Brucellas* não o fazem
9 significativamente. Portanto podem ser usadas como antígenos no TFC
10 (BARQUERO-CALVO *et al.*, 2007).

11 Ao contrário das células S, a superfície das células R é entremeada com
12 áreas carregadas e hidrofóbicas que causam autoaglutinação, de modo que as
13 formas R *Brucella* não formam suspensões estáveis. A autoaglutinação, a falta de
14 epítomos de O-polissacarídeo e o fato de a superfície dos mutantes R ativar o
15 complemento possivelmente pela via da lectina, os tornam inadequados para o
16 diagnóstico sorológico (FERNANDEZ-PRATA *et al.*, 2001).

19 **2.3 Reações cruzadas com outras bactérias**

20
21 Os O-polissacarídeos de *Brucella* reagem de maneira cruzada com outras
22 bactérias gram-negativas que contêm proporções variáveis de perosamina. Entre
23 essas bactérias, a *Yersinia enterocolitica* sorotipo O: 9 gera a reatividade cruzada
24 mais forte. Causando infecções relativamente leves em bovinos, suínos e
25 possivelmente em ovinos sendo uma causa identificada de reações sorológicas
26 positivas falsas em testes de brucelose. Outras bactérias potencialmente
27 causadoras de reações cruzadas em ruminantes são *Escherichia coli* 0157 e
28 *Salmonella* grupo N (O: 30), sendo que estas demonstram uma reatividade cruzada
29 menos intensa, fato esperado devido às diferenças estruturais dos polissacarídeos
30 *Brucella* spp. que possuem somente algumas parcelas mínimas de oligossacarídeo
31 central e a Cadeia O em comum com estas enterobactérias (PERRY; BUNDLE,
32 1990).

2.4 Vacinação bovina contra brucelose

A Instrução Normativa nº 10/2017 do MAPA (BRASIL, 2017) preconiza que é obrigatória a vacinação de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina na faixa etária de três a oito meses. Deve-se utilizar uma dose única de vacina viva liofilizada, elaborada com amostra 19 de *Brucella abortus* (B19). Porém, esta pode ser substituída pela vacina contra brucelose não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51, na espécie bovina, em fêmeas a partir de oito meses de idade. Essas duas vacinas são recomendadas pela Organização Mundial de Saúde animal (OIE), como boas indutoras de imunidade celular (BRASIL, 2006).

A proteção dada pelas vacinas contra *B. abortus* está relacionada a uma forte resposta imune Th1. A resposta imune frente à brucelose é resultado de uma ação coordenada das células T CD4 + e CD8 +, sendo o interferon- γ a citocina central na resposta imune contra *B. abortus* (DORNELES *et al.*, 2015). No entanto, a maioria das avaliações de rotina de imunização e de infecção são baseadas na resposta humoral mediada por anticorpos (BRASIL, 2017). Estudos realizados no Brasil por Leal Filho *et al.* (2016), no Mato Grosso do Sul, e por Casseb *et al.* (2015), no Pará, demonstraram uma diminuição da soroprevalência da brucelose, atribuída ao programa de vacinação, corroborando com Barbosa *et al.* (2016), que afirmaram ser a vacinação a melhor forma de evitar a brucelose.

2.4.1 Amostra *Brucella abortus* 19 (B19)

A amostra B19 de *Brucella abortus* foi isolada do leite de uma vaca Jersey no ano de 1923. Ela foi espontaneamente atenuada por ter sido deixada por mais de um ano em temperatura ambiente. Essa amostra inicialmente foi estudada pelo pesquisador John Buck em 1923, passando, a partir da década de 1930, a ser utilizada mundialmente como vacina (NICOLETTI, 1990). Esta amostra lisa não possui a enzima D-eritrose-1-fosfato desidrogenase, presente em amostras patogênicas, que no útero gravídico multiplicam-se intensamente utilizando este álcool como fonte de energia. A enzima D-eritrose-1-fosfato desidrogenase é essencial para processamento do eritritol e isso provoca a inibição do crescimento

1 bacteriano da amostra B19, quando há presença deste álcool produzido por fêmeas
2 bovinas prenhes. A ausência desta enzima é consequência de uma deleção de 702
3 pares de base do gen *ery* no genoma da amostra B19 (SANGARI; AGÜERO;
4 GARCÍA-LOBO, 2000).

5 A cepa B19 de *B. abortus* é efetiva contra a infecção por *B. abortus* em
6 bovinos, e a cepa Rev.1 de *B. melitensis* é efetiva contra a infecção por *B. melitensis*
7 e *B. ovis* em cabras e ovelhas, respectivamente. Apesar de serem eficazes, ambas
8 possuem desvantagens, como, por exemplo, são patogênicas para seres humanos
9 (podendo causar a doença acidentalmente), podem também causar aborto quando
10 administradas a fêmeas bovinas gestantes (WALLACH *et al.*, 2004), além de
11 induzirem a produção de anticorpos em animais imunizados, o que interfere nos
12 testes de diagnóstico sorológico de animais infectados a campo (CHEVILLE *et al.*,
13 1993). A cepa também é patogênica para bovinos machos, seres humanos e outras
14 espécies animais, considerando que já houve relatos de infecções humanas
15 resultantes de acidentes vacinais (WALLACH *et al.*, 2004).

16 A resposta imune frente ao conjunto LPS é representada pelos anticorpos
17 IgG1, IgM, IgA e IgG2. Animais vacinados com B19 apresentam uma queda
18 expressiva destes anticorpos a partir de 10-12 meses pós-vacinação (Figura 3),
19 enquanto estes mesmos anticorpos permanecem com taxas elevadas em animais
20 infectados. Em relação a esses animais, com o passar do tempo, ocorre uma
21 tendência de aumento da concentração de IgG1 com decréscimo na concentração
22 de IgM e estabilidade das demais imunoglobulinas (BALDI *et al.*, 1996; NIELSEN;
23 DUNCAN, 1988; SIMPSON *et al.*, 2018).

24

25

26

27

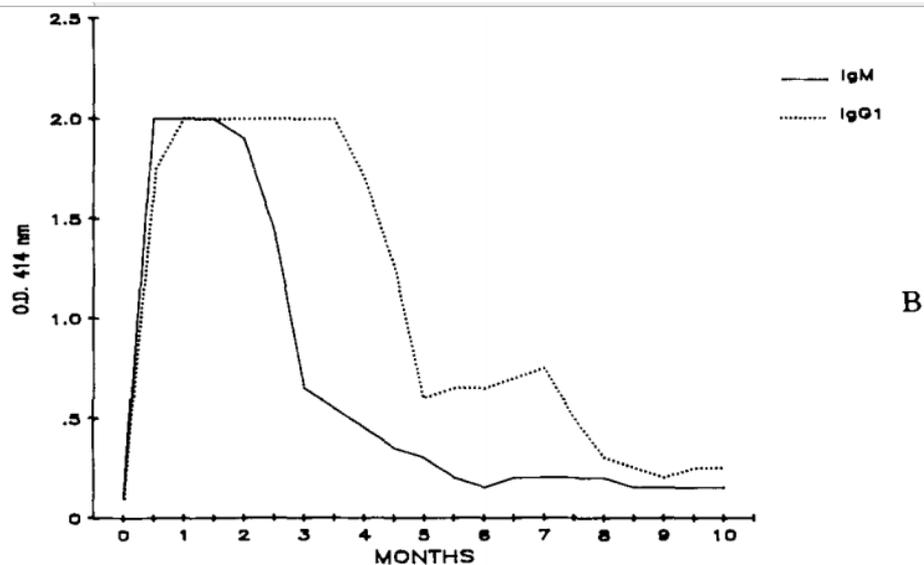
28

29

30

31

1 Figura 3 - Respostas antigênicas de oito novilhas vacinadas com 3×10^{10} de *Brucella*
 2 *abortus* B19, 10 meses após vacinação IgM e IgG₁ mensurados pela técnica de
 3 ELISA.



4
 5 FONTE: Nielsen e Duncan (1988).
 6

7 A vacinação é recomendada somente para bezerras entre três e oito meses
 8 de idade, pois a persistência de anticorpos está relacionada com a idade da
 9 vacinação. Se as fêmeas forem vacinadas com idade superior a oito meses, há
 10 grande probabilidade de produção de anticorpos que, no caso, podem perdurar e
 11 interferir no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade. Quando a vacinação
 12 com B19 ocorre até os oito meses de idade, tais anticorpos desaparecem
 13 gradativamente e, assim, permanecem as células de memória. Os animais acima de
 14 24 meses são totalmente negativos nas provas sorológicas, e apresentam um rápido
 15 decréscimo do nível de anticorpos de forma a atingir títulos inferiores a 25UI depois
 16 de 12 meses pós vacinação (BRASIL, 2006). A B19 pode induzir aborto em fêmeas
 17 prenhes quando vacinadas durante a gestação. Ela também é patogênica para
 18 bovinos machos, homem e outras espécies animais, considerando que já houve
 19 relatos de infecções humanas resultantes de acidentes vacinais (WALLACH *et al.*,
 20 2004).

21 Quando a vacinação com B19 ocorre até os oito meses de idade, tais
 22 anticorpos desaparecem gradativamente e, assim, permanecem as células de
 23 memória. Os animais acima de 24 meses são totalmente negativos nas provas
 24 sorológicas e apresentam um rápido decréscimo do nível de anticorpos, de forma a
 25 atingir títulos inferiores a 25UI depois de 12 meses pós vacinação (BRASIL, 2006).

1 Ressalta-se que os anticorpos vacinais não são detectados em animais adultos
2 quando a vacinação com dose padrão respeita a idade preconizada pelo PNCEBT,
3 pois, nestes casos, a titulação se estende, normalmente, até os 18 meses de idade
4 (COSTA *et al.*, 1999).

5 Pois, quando presentes, os anticorpos são detectados por meio das técnicas
6 de diagnóstico convencionais, ELISA ID e TFC, porém não diferenciam os
7 anticorpos vacinais dos anticorpos induzidos por infecção de campo (COSTA *et al.*,
8 1999; FERRAZ, 1999; MEGID *et al.*, 1999; SAMARTINO *et al.*, 1999; VIANA *et al.*,
9 1982).

10

11

12 **2.4.2 Amostra *Brucella abortus* RB51**

13

14 A vacina RB51 foi antecedida em sua proposta pela amostra *B. abortus* 45/20.
15 Ela corresponde a uma amostra rugosa com baixa capacidade de indução de
16 anticorpos frente a cadeia de LPS, mas indica-se que amostras rugosas também
17 poderiam ser utilizadas na imunização contra amostras lisas (BRASIL, 2017).

18 Segundo a OIE, a estratégia encontrada foi desenvolver uma amostra
19 mutante rugosa com uma quantidade mínima de cadeia de lipídios O, estável e
20 suficientemente atenuada. Considerando este objetivo, foi desenvolvida uma
21 amostra mutante rifampicina resistente, numerada como 2309 e denominada *B.*
22 *abortus* amostra RB51. Nessa sigla, o R representa a característica rugosa o B faz
23 referência a *Brucella* e o número 51 é derivado da quantidade de passagens que
24 foram necessárias para selecionar a amostra com essas características. Esta
25 amostra demonstrou induzir imunidade semelhante a produzida pela amostra B19
26 (SCHURIG; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002). No Brasil, ela é empregada para
27 a vacinação estratégica de fêmeas com idade superior a oito meses (BRASIL, 2017).

28

29

30 **2.5 Técnicas oficiais no Brasil para diagnóstico da brucelose bovina**

31

1 Desde o início da história da brucelose, quase todos os tipos de testes
2 imunológicos têm sido pesquisados para o diagnóstico da doença em ruminantes
3 (BRINLEY; MORGAN, 1967; MACMILLAN, 1990; MCGIVEN, 2013; NIELSEN,
4 2002). A busca persistente por diagnósticos confiáveis enfatiza a inexistência do
5 teste perfeito, ou seja, fácil e robusto, acessível e capaz de identificar todos os
6 indivíduos infectados, diferenciando os animais não infectados, vacinados ou com
7 anticorpos provocados por bactérias que reagem de maneira cruzada (NILSEN,
8 2002).

9 Os testes de diagnóstico da brucelose utilizados como testes oficiais de
10 triagem, conforme a Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017, do
11 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2017), podem
12 ser os testes indiretos de soroprecipitação com AAT e o TAL. Enquanto que como
13 testes confirmatórios oficiais, podem ser utilizados o 2-ME associado ao SAT, o TFC
14 e o TPF (BRASIL, 2017).

15

16

17 **2.5.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)**

18

19 O AAT, conforme o Art. 24 da IN nº 10 (BRASIL, 2017), é utilizado como teste
20 de triagem para diagnóstico de rotina para fêmeas com idade igual ou superior a 24
21 meses, se vacinadas com a B19. Este teste também pode ser utilizado para fêmeas
22 com idade igual ou superior a oito meses, para animais vacinados com a RB51 ou
23 não vacinadas e para machos com idade igual ou superior a oito meses, destinados
24 à reprodução. Seu custo de produção e execução quando comparado com os
25 demais testes é certamente o de melhor relação custo/benefício. A maioria dos soros
26 de animais bacteriologicamente reagentes apresentam reação a essa prova. Como
27 podem ocorrer alguns poucos casos de reações falso-reagentes em decorrência da
28 utilização da vacina B19, sugere-se a confirmação por meio de testes de maior
29 especificidade para se evitar o sacrifício de animais não infectados (BRASIL, 2006).

30 É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado.
31 A leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. Nas provas clássicas de
32 aglutinação, reagem tanto anticorpos IgM como IgG, enquanto que, nessa prova,
33 reagem somente os isotipos da classe IgG1. O pH acidificado da mistura soro-

1 antígeno inibe a aglutinação do antígeno pelas IgM (OIE, 2018). O AAT detecta com
2 maior precocidade as infecções recentes, sendo, nesse aspecto, superior à prova
3 lenta em tubos. As reações falso-reagentes são decorrentes de reações que pode
4 ocorrer devido à presença de anticorpos não específicos presentes nas infecções
5 por outras bactérias, como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp, *Escherichia*
6 *coli* O:157, ou *Pseudomonas* sp. Observa-se reações falso-reagentes também como
7 testagem no período de 16 meses pós vacinação com B19, sendo então
8 recomendada a vacinação até oito meses de idade e a aplicação do teste somente
9 após 24 meses de idade (BRASIL, 2006).

10 O antígeno para o AAT é preparado com células mortas de *B. abortus* S99 ou
11 S1119-3 por centrifugação a 23.000 g por 10 minutos a $5^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$ para retirar o
12 meio de cultura. Este antígeno é ressuspenso uniformemente em solução salina de
13 fenol estéril (0,5%) na proporção de 1 grama/22,5 mL. A cada 35 mL desta
14 suspensão, 1 mL de rosa bengala a 1% (p/v) é incorporado. A mistura é agitada
15 durante 2 horas em temperatura ambiente, sendo posteriormente filtrada por meio de
16 algodão estéril e centrifugada a 10.000 g por 15 minutos para depositar as células
17 coradas. Em seguida, elas são novamente ressuspensas na taxa de 1 g de células
18 para 7 mL de diluente (21,1 g de NaOH dissolvido em 353 mL de solução salina de
19 fenol estéril, seguido da adição de 95 mL de ácido láctico e ajustado para 1056 mL
20 com solução salina de fenol estéril). A cor desta suspensão deve ser de um rosa
21 intenso e o sobrenadante de uma amostra centrifugada deve estar livre de
22 impurezas; o pH deve ser $3,65 \pm 0,05$. A concentração final de microrganismo deve
23 ser aproximadamente 8% e armazenado a $5^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$ no escuro e não ser
24 congelado (OIE, 2018). É uma prova qualitativa na qual a aglutinação entre
25 anticorpo do animal e a *Brucella* corada indica a presença ou a ausência de IgG1.
26 (OIE, 2018).

27 Greve *et al.* (2017), em estudo comparativo de sensibilidade e especificidade
28 entre testes diagnósticos para brucelose bovina, observaram que o AAT se mostrou
29 como um teste de triagem por ser rápido, de fácil execução, de baixo custo e alta
30 sensibilidade. É o único de rotina realizado por médicos veterinários habilitados pelo
31 MAPA.

32

33

2.5.2 Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME)

De acordo com o Art. 26 da Instrução Normativa 10 do MAPA (BRASIL, 2017), o teste do 2-ME associado ao Teste de soroaglutinação lenta será utilizado como teste confirmatório em animais reagentes ao teste do AAT, para machos e para fêmeas com idade superior a oito meses, vacinadas ou não com a RB51. É uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Baseia-se no fato de os anticorpos da classe IgM, com configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol devido a ação do 2-ME sobre as pontes dissulfeto e cadeia J que unem as unidades pentaméricas da IgM (BRASIL, 2006).

Soros com predomínio de IgM apresentam reações não reagentes nessa prova, e reações positivas na prova lenta que detectam somente IgG. A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento na prova lenta frente ao soro tratado com 2-ME, pois neste teste utilizamos duas baterias de diluições de tubos de soro sendo uma bateria tratada com 2-ME e outra não tratada (prova lenta). A prova lenta é padronizada a partir de um soro padrão internacional que detecta imunoglobulinas IgM e IgG e o resultado é expresso em unidades internacionais. Os resultados reagentes na prova lenta e não reagentes no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou devido a anticorpos residuais de vacinação com B19. Resultados reagentes em ambas as provas indicam a presença de IgG e, nesse caso, os animais devem ser considerados infectados (BRASIL, 2006).

2.5.3 Teste de Polarização Fluorescente (FPA)

O FPA é utilizado como teste único ou como teste confirmatório em caso de animais reagentes ao teste do AAT ou inconclusivos ao teste do 2-ME, conforme Art. 27 da Instrução Normativa 10/2017 do MAPA (BRASIL, 2017). O teste de FPA baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel (polissacarídeo O marcado com conjugado com fluoresceína) e essa mesma

1 molécula ligada ao anticorpo que girarão mais lentamente. Moléculas menores não
2 ligadas ao anticorpo girarão a uma velocidade maior, resultando em maior
3 despolarização da luz. Essa mudança da polarização da luz é detectada por um
4 analisador de polarização fluorescente. Os resultados expressos em unidades de luz
5 polarizada ou em unidades de milipolarização (NIELSEN *et al.*, 2001).

6 O FPA tem apresentado excelente desempenho, entretanto, ainda é pouco
7 difundido em países subdesenvolvidos, devido desvantagens de alto custo e
8 dependência de importação de equipamentos e reagentes necessários para realiza-
9 lo (MATHIAS *et al.*, 2007).

10

11

12 **2.5.4 Teste de Fixação de Complemento (TFC)**

13

14 Conforme o Art. 28 da Instrução Normativa 10/2017 do MAPA (BRASIL,
15 2017), o TFC será utilizado como teste confirmatório para animais reagentes ao
16 teste do AAT ou para os que apresentaram resultado inconclusivo ao teste do 2-ME
17 ou inconclusivo no FPA. Ressalta-se que o TFC é preconizado para trânsito
18 internacional como teste de referência, sendo empregado em vários países que
19 erradicaram a doença ou estão em processo de erradicação.

20 O TFC utiliza glóbulos vermelhos de ovinos em solução de 2%-3%,
21 sensibilizados (GVOS) com anticorpos de soro de coelho anti-GVOS. Dessa forma, é
22 possível obter 100% de lise dos GVOS quando há presença de complemento
23 extraído de *Cavia porcellus* (porquinho da índia). Este conjunto compõe o sistema
24 revelador do teste. O TFC constitui-se em adicionar diluições diversas do soro
25 bovino a ser testado suspeito de conter anticorpos anti-*Brucella* a uma concentração
26 conhecida e padronizada de células de *Brucella*, seguido da adição do complemento
27 (*Cavia porcellus*). Espera-se que este complemento se ligue ao complexo anticorpo
28 bovino anti-*Brucella* + células de *Brucella* e, assim, não fique disponível para lisar as
29 hemácias do conjunto GVOS adicionado a seguir (OIE, 2018).

30

31

32 **2.5.5 Teste do Anel em Leite (TAL)**

1 O teste consiste em adicionar 30 µL de uma solução a 4% de *Brucella abortus*
2 amostra S99 ou S1119-3 padronizadas internacionalmente e corada com
3 hematoxilina ao volume de 1 a 3 mL de leite resultante de coleta de leite
4 representativa do rebanho. A amostra representativa deve ser previamente mantida
5 entre 2 ° C e 8 ° C por, pelo menos, 24 horas antes da realização do TAL. Havendo
6 presença de anticorpos no leite, ocorrerá formação de complexos com a *B. abortus*
7 da solução corada. Após uma hora de repouso e incubação a 37 ° C, estes
8 complexos serão carregados pelos glóbulos de gordura para a superfície do tubo
9 fazendo com que se forme um anel azulado na camada superior de creme do leite.
10 Na ausência de formação de complexos (anticorpo do leite + *Brucella* corada), o anel
11 de creme terá a coloração branca e o leite presente no tubo terá uma tonalidade
12 azulada. Essa cor resulta da homogeneização de *Brucella* corada no leite e indica
13 reação não reagente.

14 Conforme a legislação vigente, o TAL poderá ser utilizado para
15 monitoramento de rebanhos. Vale ressaltar que ele não é um teste para uso de um
16 único animal, visto que diversos fatores podem interferir no seu resultado.
17 Considera-se o resultado do teste como reagente quando a intensidade da cor do
18 anel for igual ou maior que a da coluna de leite. Nesse caso, os animais do
19 estabelecimento de criação deverão ser submetidos a testes sorológicos individuais
20 para diagnóstico da brucelose (MAPA, 2006; OIE, 2018). De acordo com Aznar *et al*
21 (2014) a técnica tem como vantagens, ser de simples execução, praticidade,
22 segurança e de grande utilidade na profilaxia da brucelose bovina, além de ter uma
23 boa sensibilidade. Segundo o mesmo autor, tem como desvantagens, ser realizada
24 preferencialmente no gado leiteiro, sendo somente aplicada em animais em
25 lactação, pode apresentar resultados falso-positivos dependendo da procedência do
26 leite, como colostro e mastite.

27

28

29 **2.5.6 Teste imunoenzimático indireto (ELISAI)**

30

31 O Art. 30 da Instrução Normativa 10/2017 do MAPA (BRASIL, 2017)
32 preconiza que outros testes diretos e indiretos de diagnóstico para brucelose
33 poderão ser utilizados para complementar ou substituir os testes especificados nesta

1 norma. Isso poderá ser feito após aprovação e nas condições estabelecidas pelo
2 Departamento de Saúde Animal (DSA-MAPA). O teste de ELISAI é uma dessas
3 opções.

4 Essa técnica tem seu protocolo genérico inicial consolidado por Engvall e
5 Perlmann (1971) e ela passou a ser utilizada em diversas modalidades de
6 diagnóstico até os dias de hoje.

7 Como referência inicial da técnica de ELISAI para brucelose, tem-se o
8 protocolo desenvolvido por Thoen *et al.* (1979). Este protocolo consiste em deixar
9 um antígeno, mais especificamente uma amostra de *Brucella* lisada, em contato com
10 uma superfície sólida representada por pequenos poços de uma placa de
11 poliestireno por um período de 12 horas. Assim sendo, por meio de cargas não
12 covalentes, proteínas e outras moléculas do microrganismo lisado fixam-se ao
13 poliestireno. Essa etapa é denominada de sensibilização da placa. Em seguida, os
14 poços contendo estes antígenos são lavados com solução tampão, a fim de retirar o
15 excesso de detritos do microrganismo que não aderiram ao fundo do poço. Após o
16 soro ser testado suspeito de conter anticorpos (anticorpo primário), anti-*Brucella* é
17 adicionado aos poços. Havendo anticorpos específicos que reconheçam o antígeno
18 fixado a placa, estes irão se ligar à essa camada de antígeno.

19 A seguir, lavam-se os poços para retirar o excesso de soro e de anticorpos
20 primários que não formaram complexos antígeno-anticorpo. Então, é adicionado aos
21 poços um anti-anticorpo espécie bovina denominado de anticorpo secundário. Ele é
22 quimicamente conjugado a uma enzima, peroxidase ou fosfatase alcalina e, a partir
23 disso, forma um complexo no fundo do poço constituído de antígeno ligado ao
24 anticorpo primário do soro teste que, por sua vez, será detectado pelo anticorpo
25 secundário conjugado a enzima. Realiza-se uma nova lavagem para retirar o
26 anticorpo secundário em excesso.

27 Finalmente adiciona-se um substrato cromógeno para a enzima ligada ao
28 anticorpo secundário e faz-se leitura em espectrofotômetro para medir a coloração
29 da reação e para indiretamente determinar a quantidade de anticorpo secundário
30 que se ligou ao anticorpo primário do soro teste. As enzimas de detecção mais
31 utilizadas são peroxidases e fosfatases (THOEN *et al.*, 1979). Dessa forma, a
32 característica marcante do ELISAI, é a utilização de anticorpos secundários para um
33 maior nível de especificidade do teste.

1 Numerosas variações do ELISAI têm sido descritas para bovinos, pequenos
2 ruminantes e suínos. Para isso, emprega-se diferentes preparações de antígeno
3 conjugando antiglobulina-enzima e substrato/cromógenos. Vários ELISAs
4 comerciais utilizam células inteiras e proteínas solúveis como antígenos que, no
5 caso, foram validados em extensos testes de campo. Eles estão disponíveis e são
6 amplamente utilizados (OIE, 2018).

7 Entre os testes rápidos disponíveis no mercado internacional e que utilizam
8 diferentes antígenos, podemos citar “IDEXX Brucellosis antibody test kit” (IDEXX,
9 Montpellier, France), “*Brucella abortus* IgG ELISA kit” (Fitzgerald Ind. Int., USA),
10 “*Brucella abortus* IgM ELISA kit” (Fitzgerald Ind. Int., USA), “*Brucella abortus* IgG
11 Assay kit” (DEMEDIATEC Diagnostics GmbH, USA) e “*Brucella abortus* IgM Assay kit”
12 (DEMEDIATEC Diagnostics GmbH, USA).

13 O teste sorológico ELISAI vem sendo utilizado junto com o AAT, em um
14 projeto para a erradicação da brucelose bovina, o qual ressalta a importância de um
15 exame com alta especificidade e sensibilidade para detectar animais doentes. O
16 procedimento evitaria que um foco fosse finalizado por apresentar exames negativos
17 apenas no AAT, porém podendo possuir animais portadores, não detectados. O
18 diagnóstico por ELISAI em leite e em soro poderia ser um avanço para as ações de
19 vigilância ativa contra a brucelose (BAUMGARTEN *et al.*, 2016).

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização da experimentação e animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – Campus Alegre, UFES sob o número 014/2019. Coletou-se sangue da veia jugular em tubos estéreis com vácuo nas datas de 15/05/2019, 15/09/2019 e 15/01/2020. O sangue foi proveniente de 22 novilhas com idade média de sete meses que haviam sido vacinadas no período de cinco a oito meses de vida (setembro/2018) com a vacina Brucelina B19 Vallée[®], partida 023/2018, vacina B19, conforme o Regulamento do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Desta forma, as coletas se deram no máximo oito, 12 e 16 meses pós vacinação. Utilizou-se esses tempos devido a resposta imunológica dos animais, para demonstrar que, no decorrer dos meses, essa resposta reagente tende a diminuir. Essas novilhas estavam alocadas e distribuídas em diferentes propriedades rurais do Espírito Santo, nos municípios de Jerônimo Monteiro, Alegre e São José do Calçado. Não foram realizados testes previamente a coleta sanguínea, entretanto foi entendido que todos os animais estavam não reagentes, uma vez que não foram reagentes ao teste AAT de triagem após 16 meses de vacinação, conforme preconiza a legislação. Utilizou-se nos testes como controle negativo três bovinos machos com idade de quatro meses não reagente, e como controle positivo três fêmeas bovinas adultas acima de três anos reagente, todos definidos pelo teste de triagem oficial AAT.

Após a coleta, os tubos foram acondicionados em caixa refrigerada e levados ao Laboratório de Microbiologia Veterinária e Zoonoses – UFES, Alegre - ES, no qual realizou-se os protocolos laboratoriais. As amostras foram centrifugadas a 3,600 g/15 min, sendo, então, aspirado o soro e acondicionado em microtubos de 1500 microlitros (µL) para congelamento a -20 ° C.

3.2 Obtenção do antígeno solúvel de *Brucella abortus*

1 A metodologia para obtenção do antígeno solúvel foi segundo Berman *et al.*
2 (1980) e Chand, Sadana e Batra (1990) com algumas modificações pela introdução
3 do processo de congelamento/descongelamento em substituição a sonicação e
4 tratamento químico para lise do microrganismo assim como a amostra de *Brucella*.
5 Utilizou-se *Brucellas abortus* de um frasco da vacina viva atenuada liofilizada
6 Brucelina B19 Vallée®, partida 023/2018, ressuspendeu-se em 10 mL de solução
7 salina 0,9% e centrifugou-se a 4.200 *g*. Após centrifugação, ressuspendeu-se o
8 sedimento em 10 mL de solução salina 0,9% e centrifugou-se por mais duas vezes.

9 Em seguida, homogenizou-se o sedimento em 1,5 mL de PBS em tubo
10 criogênico de 2,0 mL e imerso em nitrogênio líquido por 5 minutos. Posteriormente, o
11 tubo foi imerso em banho maria 37 ° C por 5 minutos. Repetiu-se esse processo de
12 congelamento/descongelamento por quatro vezes. Centrifugou-se a 19,000 *g* por 1h
13 e 30 minutos à 4 ° C. O sobrenadante coletado foi acondicionado em saco de diálise
14 (Inlab® referência 132) e dialisado para permanência de partículas na solução com
15 peso superior a 12.000 kilodaltons utilizou-se para este processo a imersão do saco
16 de dialise em 1000 mL de PBS, sendo submetido a trocas do PBS a cada 6 horas
17 durante um tempo total de 36 horas. O material remanescente do saco de diálise foi
18 avaliado quanto a concentração de proteínas pelo Método de Bradford e ajustado
19 para concentração de 1 mg/mL. Por fim, o material foi aliquotado em microtubos de
20 200 µL e congelado a -20 ° C e, posteriormente utilizou-se como antígeno para
21 sensibilização de placas para o teste de ELISAI (BERMAN *et al.*, 1980).

22 23 24 **3.3 Protocolo da técnica de ELISAI** 25

26 O protocolo de ELISA desenvolvido baseou-se nas etapas preconizadas por
27 Berman *et al.*, (1980) e BALDI *et al.* (1996). A sensibilização das placas de
28 poliestireno de 96 poços, de fundo plano (Corning Costar Corporation Cambridge,
29 USA), utilizou-se o antígeno solúvel, descrito anteriormente, e, em seguida, as
30 placas foram incubadas por 12 horas/4 ° C. Após a incubação, lavou-se com solução
31 tampão PBS 0,02M, pH 7,2. Em seguida, bloqueou-se as placas com 100 µL de
32 solução de albumina bovina a 0,2% por cavidade e incubou-se a 37 ° C, durante 1h.

1 Diluiu-se os soros testes (soros das novilhas oito, 12 e 16 meses pós
2 vacinação) em PBS, pH 7,2 (1:2.000), distribuiu-se nos poços das placas
3 (100µL/poço) e incubou-se por uma hora a 37 ° C. Após a incubação com os soros
4 teste (anticorpo primário), lavou-se as placas com PBS a 0,05% de Tween 20 e
5 submetidas à incubação com anticorpo secundário espécie específico (anti-IgG
6 conjugado com peroxidase, Rheabiotech®), na diluição 1:10.000. A seguir, foram
7 novamente lavadas e receberam 100µL do substrato cromogênico (orthophenylene-
8 diamine, OPD, Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato a 0,15M, pH 5,0. Passados
9 15 minutos, a reação foi bloqueada com 10µL de H2SO4, e realizou-se a leitura em
10 espectrofotômetro de microplacas com filtro de 490nm.

11 Como ponto de corte para determinar os soros reagentes utilizou-se o valor
12 de três desvios padrão resultantes da leitura de animais reagentes e não reagentes,
13 fazendo com que o teste para definição de animais reagentes, seja mais rigoroso, e,
14 aumentando assim a sua especificidade, quando comparado a testes que utilizam
15 como ponto de corte um ou dois desvios padrão (BALDI *et al.*, 1996; SIMPSON *et*
16 *al.*, 2018).

17

18

19 **3.4 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado – AAT**

20

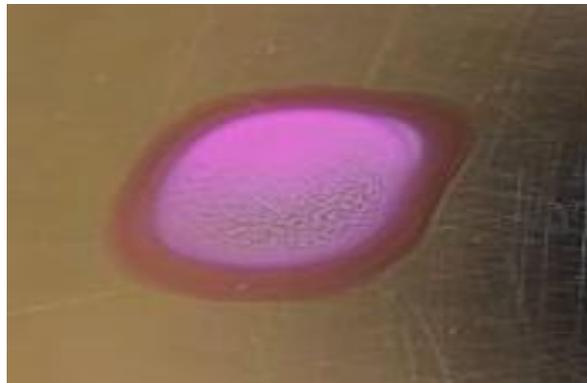
21 O Antígeno utilizado foi do Laboratório Microssules Partida 001/19. Como
22 padrão ouro para avaliação da presença de anticorpos anti-*Brucella* nos mesmos
23 tempos, utilizou-se o teste oficial do Antígeno Acidificado Tamponado-AAT descrita
24 no Manual do PNCEBT (BRASIL, 2006), descrita a seguir.

25 Inicialmente, equilibrou-se os soros congelados e o antígeno à temperatura
26 ambiente por 30 minutos. Posteriormente, homogeneizou-se os soros antes de
27 realizar a prova. Utilizando a pipeta de Bang, dispensou-se 30 µL de cada soro
28 sobre um quadriculado individual da placa de vidro. O antígeno foi agitado
29 suavemente e colocado 30 µL ao lado de cada soro em todos os quadriculados
30 utilizados. Sucessivamente homogeneizou-se o soro e o antígeno com misturador
31 individual ou múltiplo e, a seguir, foram realizados movimentos circulares para obter
32 um círculo aproximado de 2 cm.

33 Posteriormente, agitou-se a placa com movimentos oscilatórios, numa
34 frequência de, aproximadamente, 30 movimentos por minuto, de modo a permitir que

1 a mistura soro-antígeno fluísse lentamente dentro de cada círculo. A placa foi
 2 agitada continuamente por 4 minutos e colocada na caixa de leitura com luz indireta
 3 para a realização da leitura do resultado de cada quadriculado da reação soro e
 4 antígeno. Registrou-se os resultados desconsiderando as reações de aglutinação
 5 que ocorreram após os 4 minutos. Ressalta-se que a presença de aglutinação
 6 (grumos) é considerada como resultado reagente e a ausência como resultado não
 7 reagente (Figura 4).

8
 9 Figura 4 – Reação de aglutinação: antígeno e anticorpo de um teste Antígeno
 10 Acidificado Tamponado (AAT) em uma fêmea bovina reagente para brucelose
 11 bovina



12
 13 FONTE: Arquivo pessoal
 14

15 3.5 Análise estatística

16
 17 Os dados clínicos e resultados dos testes diagnósticos foram tabulados
 18 utilizando-se o programa Microsoft Excel. Os cálculos estatísticos foram realizados
 19 por meio do programa GraphPad Prism, versão 5.0, assumindo significância
 20 estatística $\alpha < 0,05$. Utilizou-se um cálculo para uma amostra aleatória simples com
 21 aproximação da distribuição normal binomial e população infinita por meio da
 22 fórmula:

$$n = \frac{1,96^2 P_{esp}(1 - P_{esp})}{d^2}$$

23 na qual n = tamanho da amostra, P_{esp} = prevalência esperada e d = erro.

24 A estimativa foi feita considerando-se 5% de erro e uma confiança de 95%, e
 25 uma prevalência média nacional de 1% da brucelose, chegando-se a um valor de
 26 $n \approx 15$ animais. Considerou-se 30% de perda de animais durante o período do
 27 experimento, optou-se por trabalhar com uma amostra de 22 animais.

1 Para avaliar diferenças do mesmo teste no mesmo animal em diferentes
2 momentos de coleta, foi realizado um teste de Qui-quadrado de uma variável. As
3 análises de qui-quadrado para uma variável com o objetivo de verificar se existia
4 uma diferença significativa entre as frequências observadas e esperadas pelo acaso
5 para número de animais reagentes nos testes de AAT e ELISAI, separadamente.
6 Realizou-se uma análise em tabela de contingência, mediante teste de qui-quadrado
7 de duas variáveis, com o objetivo de verificar associação entre os resultados dos
8 diferentes testes (AAT e ELISAI) para todo o experimento e para cada momento em
9 separado. Por fim, ainda para verificar a concordância entre os testes AAT e ELISAI
10 realizou-se o cálculo do índice de concordância Kappa.

11 Realizou-se também os cálculos de sensibilidade e de especificidade além
12 dos valores preditivos positivo e negativo (ALMEIDA FILHO; ROUQUAYROL, 2006).
13 Para todos os testes, utilizou-se o Teste AAT como referência de controle
14 positividade por ser considerada a prova de mais representativa no panorama de
15 diagnóstico da brucelose no Brasil, confirmatória pelo PNCEBT.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes do AAT e ELISAi são apresentados em paralelo na Tabela 1, afim de possibilitar a avaliação de concordância ou não entre os testes.

TABELA 1 – Leitura do resultado do teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Teste imunoenzimático indireto (ELISAi) em amostras de soro de 22 novilhas vacinadas com vacina comercial Brucelina B19 Vallée®.

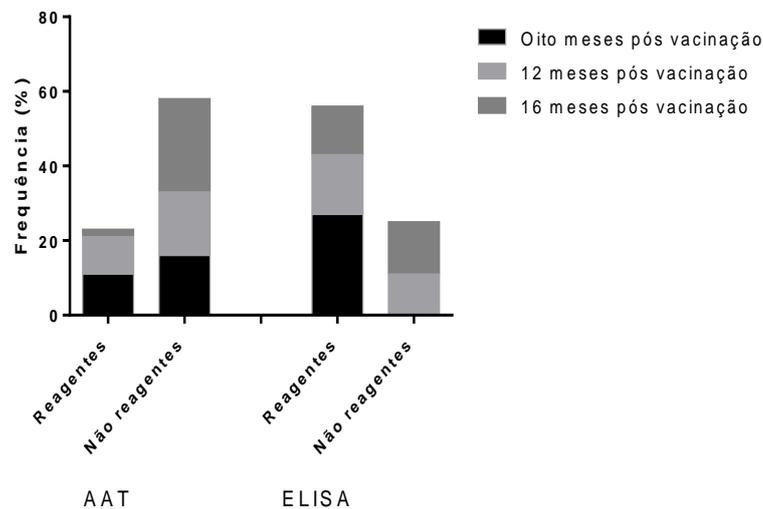
Novilhas	Coleta pós vacinação					
	oito meses		12 meses		16 meses	
	AAT	ELISAi	AAT	ELISAi	AAT	ELISAi
1	+	+	-	+	-	+
2	+	+	+	+	+	+
3	-	+	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-	+
5	+	+	+	+	-	+
6	+	+	+	+	-	-
7	-	+	-	+	-	+
8	-	+	-	+	-	+
9	-	+	-	+	-	-
10	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	+	-	+
13	-	+	-	+	-	+
14	+	+	+	-	-	-
15	-	+	-	+	-	-
16	-	+	-	+	-	-
17	-	+	-	+	-	-
18	+	+	+	-	+	-
19	-	+	-	+	-	-
20	-	+	-	-	-	-
21	+	+	+	+	-	+
22	+	+	+	+	-	+
	11+/11-	22+	10+/12-	16+/6-	02+/20-	10+/12-

+ representa os animais reagentes; - representa os animais não reagentes;

1 Observou-se que no tempo de oito meses pós a vacinação, metade das
 2 novilhas (50%) apresentou resultado reagente no teste AAT, enquanto, no mesmo
 3 tempo, no teste do ELISAI todas as novilhas (100%) foram reagentes. Aos 12 meses
 4 pós vacinação 45,46% das novilhas foram reagentes no AAT, enquanto que 72,73%
 5 foram reagentes no ELISAI. E, por fim, aos 16 meses pós vacinação, apenas 9,09%
 6 foram reagentes no AAT, e 45,46% foram reagentes no ELISAI.

7 A Figura 5 ilustra como variaram os animais reagentes e não reagentes para
 8 os testes de AAT e ELISAI nos diferentes momentos de coleta.

9
 10 Figura 5 - Número de animais reagentes e não reagentes para os testes de Antígeno
 11 Acidificado Tamponado (AAT) e Teste imunoenzimático indireto (ELISAI) nos
 12 diferentes tempos de coleta
 13



14
 15
 16 Observa-se uma diferença significativa entre as frequências observadas e as
 17 esperadas ao acaso ($\chi^2=6,348$, $p=0,042$) para o número de reagentes no teste AAT.
 18 Isso mostra, portanto, que essa frequência tende a diminuir com o passar do tempo.

19 Os resultados observados para o ELISAI neste estudo, sendo identificado
 20 22/22 reagentes na primeira coleta, 16/22 reagentes na segunda coleta e 10/22
 21 reagentes na terceira coleta, indicam um declínio significativo entre as frequências
 22 observadas e as esperadas ao acaso ($\chi^2=7,172$ $p=0,028$), mostrando, portanto, que
 23 essa frequência tende a diminuir com o passar do tempo. Entretanto, não existe uma
 24 associação significativa entre os resultados dos testes AAT e ELISAI nos tempos

1 avaliados como mostra o teste de qui-quadrado para tabela de contingência 2x2 (χ
2 $^2=0,545$, $p=0,46$) com os dados presentes na Tabela 2.

3

4 TABELA 2 - Frequência dos resultados dos testes Antígeno Acidificado Tamponado
5 (AAT) e do Teste imunoenzimático indireto (ELISAI) realizados em novilhas
6 vacinadas contra Brucelose com a cepa B19.

		AAT		Total
		Reagente	Não Reagente	
ELISAI	Reagente	18	30	48
	Não Reagente	5	13	18
Total		23	43	66

7

8 Considerando sensibilidade como a capacidade do teste identificar
9 corretamente os indivíduos reagentes, e especificidade como a capacidade de teste
10 identificar corretamente os indivíduos não reagentes, estão apresentados na tabela
11 3, os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor
12 preditivo negativo (VPN) do teste de ELISAI.

13 Observa-se uma sensibilidade aceitável (0,7826) do teste de ELISAI
14 considerando Nielsen (2004) que em trabalho de revisão comparou sensibilidade de
15 testes de diversos trabalhos científicos de diagnóstico de brucelose verificando o
16 melhor desempenho o teste de polarização fluorescente para detectar as novilhas
17 reagentes para anticorpos vacinais anti-*Brucella abortus*, entretanto uma
18 especificidade fraca (0,3023), para detectar as novilhas não reagentes,
19 considerando os resultados do teste AAT como referência. Além disso, mediante
20 coeficiente Kappa (Kappa=0,068; $p=0,738$) pôde-se demonstrar uma concordância
21 pobre com o teste ATT, de acordo com a classificação de Miot (2016), uma vez que
22 o número de concordâncias observadas ($n=31$; 46,97%) foi, apenas, ligeiramente
23 superior àquela esperada ao acaso ($n=28,5$; 43,11%).

24

25

26

27

28

1 TABELA 3 - Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo(VPP) e
 2 valor preditivo negativo (VPN) com respectivos IC_{95%} do método de imunoenzimático
 3 indireto (ELISAI) considerando o método Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)
 4 como padrão ouro.

	Valores	IC _{95%}
Sensibilidade	0,7826	0,5630 a 0,9254
Especificidade	0,3023	0,1718 a 0,4613
Valor predito positivo	0,3750	0,2395 a 0,5265
Valor predito negativo	0,7222	0,4652 a 0,9031

5 *IC_{95%} - Intervalo de confiança de 95%.

6

7 Esta diferença de resposta antigênica entre animais imunizados somente
 8 com antígenos de *Brucella* spp. íntegras (AAT), na qual predomina como antígeno o
 9 S-LPS e animais imunizados com antígenos solúveis diversos de *Brucella* spp.,
 10 também foi observado por Berman *et al.* (1980) em ensaios de imunoeletroforese.
 11 Chand, Sadana e Batra (1990) utilizando antígenos sonicados para dot ELISA, bem
 12 como Sutherland, Le Cras e Evans (1982) tratando células de *Brucella* spp. com
 13 0.25N NaOH, observaram uma sensibilidade de 96% e especificidade de 81%, tendo
 14 como referência os testes de fixação de complemento e soroprecipitação.

15 Simpson *et al.* (2018) utilizando o teste comercial “IDEXX Brucellosis
 16 antibody test kit” (IDEXX, Montpellier, France) e comparando com o Teste Rosa de
 17 Bengala, equivalente ao AAT, observaram um Kappa de 0,63 entre os testes, porém
 18 quando os mesmos animais foram avaliados 15 meses pós vacinação, o AAT
 19 identificou somente 14% dos animais vacinados, enquanto o ELISAI identificou o
 20 dobro de animais reagentes (32%), sendo alguns animais sorologicamente
 21 reagentes até 4,5 anos.

22 Em contrapartida para Colby (2002) que utilizou S-LPS ou células íntegras de
 23 *Brucella* spp. em todos os testes executados se verifica elevada concordância entre
 24 o ELISAI e AAT. Molnár *et al.* (2002), verificaram sensibilidade de 97,14% e
 25 especificidade de 95,66% para o ELISAI utilizando o teste de ELISA competitivo
 26 como padrão, e uma concordância de 96,13% e 93,18% entre a sensibilidade e
 27 especificidade entre AAT e ELISAI, respectivamente.

1 Paulin *et al.* (2009), utilizando como padrão o TFC e células íntegras de
2 *Brucella abortus* observaram entre o ELISAI e AAT um Kappa com valor de 0,91,
3 indicando uma ótima concordância, contraditórios aos resultados de Maturino
4 (2014) que utilizando a técnica ELISAI com amostra lisa de *Brucella abortus*,
5 avaliando 666 animais selecionados aleatoriamente no momento do abate,
6 submeteu-as à prova de triagem AAT. Das amostras reagentes ao AAT, obteve-se
7 uma prevalência estimada em 1,2%, e uma prevalência do teste ELISAI de 13,21%
8 (n=86). Assim como Rocha *et al.* (2018) que, em 118 amostras de soros de
9 bubalinos examinados por meio da técnica AAT, nenhum animal foi reagente a
10 técnica. Quando esses soros foram testados pelo ELISAI utilizando antígeno solúvel,
11 obteve 82 amostras reagentes ou seja 69% das amostras. Sendo que a
12 concordância entre os dois testes foi de 30,5%.

13 Entende-se que o teste de ELISAI desenvolvido neste estudo utilizando
14 antígenos solúveis, possui uma aceitável sensibilidade ($\chi^2=0,7826$) e fraca
15 especificidade ($\chi^2=0,3023$). Heck et al (1982) utilizando antígeno solúvel avaliaram
16 85 novilhas vacinadas com B19 e infectaram 31 novilhas com *Brucella abortus*
17 amostra 2308, e posteriormente confirmaram a infecção por cultivo após eutanásia.
18 Os anticorpos foram detectados por ELISAI em soros de 93% das vacas com cultura
19 positiva enquanto menos de 55% dos animais infectados foram identificados por
20 qualquer outro método sorológico (Card Test, precipitação por Rivanol, aglutinação
21 em tubo e fixação de complemento). Similarmente, os anticorpos foram detectados
22 em 82% das vacas negativas da cultura pelo método ELISAI, provavelmente
23 também à detecção de anticorpos frente a antígenos internos do microrganismo,
24 comuns a todas as amostras de *Brucella spp.* mas que também podem
25 ocasionalmente serem identificados em outros microrganismos gram negativo.

26 Uma vez que existem estruturas comuns entre os microrganismos gram
27 negativos, tais como lipídeo A e lipoproteínas. No estudo, por meio de isolamento
28 por cultura em 66 novilhas entre animais vacinados e infectados, utilizando teste de
29 ELISAI utilizando antígeno solúvel de *Brucella abortus* (BERMAN *et al.*, 1980)
30 detectaram 93,9% dos animais reagentes, enquanto os testes Card test (equivalente
31 ao AAT), precipitação com Rivanol, aglutinação lenta 2ME e fixação de
32 complemento detectaram sorologicamente somente 50-55% destes animais
33 reagentes. Entre os animais que não tiveram isolamento do microrganismo o ELISAI
34 identificou 82%, enquanto os demais testes não apresentaram nenhum resultado

1 reagente. Baseado neste experimento conclui-se uma alta sensibilidade para o teste
2 de ELISAI, mas uma baixa especificidade para animais infectados com respectivo
3 isolamento, embora, esta seja uma conclusão precipitada, pois os animais
4 infectados sem isolamento certamente estabeleceram mecanismos de autocura ou
5 reação cruzada que resultam em não isolamento, mas sorologia reagente.

6 No estudo realizado com o AAT verificou-se 11 animais reagentes (50%) aos
7 oito meses pós vacinação, enquanto que este número permanece praticamente
8 inalterado aos 12 meses pós vacinação com 10 soros reagentes. Enquanto que aos
9 16 meses pós vacinação observou-se um resultado não reagente para maioria dos
10 animais sendo que este achado está em acordo com a indicação do MAPA, em não
11 realizar o AAT antes dos 24 meses de vida. Alguns autores registraram ausência
12 total de anticorpos vacinais antes dos 24 meses de vida em fêmeas vacinadas até
13 oito meses de idade (AGUIRRE *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1997; SUTHERLAND;
14 LE CRAS; EVANS, 1982) pelos testes AAT e 2ME. Para esses autores, foram
15 verificados resultados não reagentes quanto à presença de anticorpos em todas
16 fêmeas vacinadas entre três e 12 meses pós vacinação.

17 Esta não é uma conclusão unânime visto que outros autores (ALTON, 1978;
18 HERR; BRUGGE, 1985; MACMILLAN, 1990; SAMARTINO *et al.*, 1999) utilizando
19 distintos testes verificaram a presença de anticorpos muito além de 16 meses pós
20 vacinação ou 24 meses de vida. Assim como a OIE (2018) entende que o TFC por
21 possuir um sistema padronizado de unidades é mais específico que o AAT, sendo
22 utilizado como teste de referência internacional para comercialização. A mesma
23 Organização (OIE) afirma que o desempenho diagnóstico de alguns ensaios
24 imunoenzimáticos (ELISA) e o ensaio de polarização de fluorescente (FPA) é
25 comparável ou melhor que o TFC e, como são tecnicamente mais simples de
26 executar e mais robusto, seu uso pode ser preferido.

27 O estudo mostrou que o protocolo de ELISAI desenvolvido possui potencial
28 para monitorar bovinos vacinados e infectados na proposta de triagem com maior
29 sensibilidade que o AAT, uma vez que os testes confirmatórios sempre podem ser
30 realizados. Particularmente, em relação a animais vacinados o ELISAI desenvolvido
31 poderá ser uma ferramenta relevante de avaliação de proteção vacinal a longo prazo
32 sendo que para os animais reagentes suspeitos de infecção podem ser descartados
33 com o método do 2-Mercaptoetanol (2-ME) soro aglutinação lenta ou outros testes
34 confirmatórios que indiquem presença de IgMs.

1 Como diferencial do protocolo já realizado por Berman *et al.* (1980) e Heck *et*
2 *al.* (1982) na utilização de Ag solúvel observa-se uma maior especificidade do
3 antígeno, visto o uso do processo de dialise realizado eliminando assim moléculas
4 antigênicas menores de 100 kilodaltons que são em geral antígenos comuns a
5 diversos microrganismos capazes de induzir reação cruzada.

6 Por fim, apesar de usar o AAT como teste referência para definir os animais
7 reagentes, o protocolo de ELISAI desenvolvido que resulta numa sensibilidade
8 maior, uma vez que avalia uma diversidade maior de antígenos e, por conseguinte,
9 um conjunto de anticorpos mais amplo, não sendo passível de comparação com o
10 AAT. Mas apresenta uma especificidade baixa, se tiver como referência o AAT, que
11 no estudo mostrou se baixa, considerado como teste de triagem pelo MAPA,
12 mas apresenta uma maior especificidade por avaliar exclusivamente o LPS liso
13 bacteriano.

14 Abrindo assim a necessidade de novas pesquisas, como testar o ELISAI em
15 animais não vacinados, em animais vacinados com a RB51, ou em um maior
16 número de animais infectados reagentes no AAT a campo relacionando com outros
17 testes confirmatórios para diagnóstico da brucelose.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

5. CONCLUSÕES

O protocolo de ELISAI, utilizando antígenos solúveis de uma vacina comercial de *Brucella abortus* amostra B19 foi validado para detecção de anticorpos anti-*Brucella* em fêmeas impúberes vacinadas.

6. REFERÊNCIAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

AGUIRRE, N. P.; VANZINI, V. R.; ECHAIDE, S.T. de; VALENTINI, B.S.; DE LUCCA, G.; AUFRANC, C.; CANAL, A.; VIGLIOCCO, A.; NIELSEN, K. Antibody dynamics in holstein friesland heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 23, n. 4, p. 471-478, 2002. DOI: 10.1081/IAS-120015478.

ALMEIDA FILHO, Naomar de; ROUQUAYROL, Maria Zélia. Introdução à Epidemiologia. 4. ed. Rio de Janeiro. **Guanabara-Koogan**, 2006.

ALTON, G.G. Recent developments in vaccination against bovine Brucellosis. **Australia Veterinary Journal**, v. 54, p. 511-557, 1978. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1978.tb02410.x.

AZNAR, M.N.; SAMARTINO, L. E.; HUMBLET, M. F.; SAEGERMAN, C. Bovine brucellosis in Argentina and bordering countries: update. **Transboundary and emerging diseases**, v. 61, n.2, p.121–133, 2014. DOI: 10.1111/tbed.12018

BALDI, P. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; GOLDBAUM, F. A.; ABDO´N, L. F.; VELIKOVSKY, C. A.; KITTELBERGER, R.; FOSSATI, C. A. Humoral Immune Response against Lipopolysaccharide and Cytoplasmic Proteins of *Brucella abortus* in Cattle Vaccinated with *B. abortus* S19 or Experimentally Infected with *Yersinia enterocolitica* Serotype 0:9. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 4, p. 472–476, July 1996. DOI: 1071-412X/96/\$04.0010.

BARBOSA, B.; ELISEI, C.; SOARES, C.O.; SANCHES, C.C.; LAURIA, I.E.N.; BASTOS, R.; ROSINHA, G.M.S. Análise da sensibilidade e especificidade do gene virb5 na detecção de *Brucella spp.* por PCR em sangue de bovinos. **Bio (In) Formação**, v. 6, n. 6, p. 6-17, 2013.

BARBOSA, E. S.; ARAÚJO, J. I. M.; DA SILVA, A. L. A.; DE ARAUJO, J. M. Perfil do conhecimento dos produtores sobre a brucelose na saúde pública, em Redenção do Gurgueia-Piauí. **Publicações Veterinárias e Zootecnia (Pubvet)**, v. 10, p. 795-872, 2016.

BARDDAL, J. E. I. **Brucelose e tuberculose**: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Carne Bovina. Brasília, 11/04/19. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/carne-bovina/2019/53a-ro/pncebt_reuniao-camara-setorial-da-carne_11_04-convertido.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2020, 11:30.

BARQUERO-CALVO E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D. S.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHACÓN-DÍAZ, C.; RUCAVADO, A.; MORIYÓN, I.; MORENO, E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. **PloS One**, v. 2, 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000631.

- 1 BAUMGARTEN, K. D.; SILVA, J. C.; NEVES, M. V. O.; ROSSI, A. K.; DETTMER, R.;
2 ULSENHEIMER, I.; PEREIRA, F. V.; FLORES, P.; NOEBAUER, M.; DAMO, C.;
3 PENSO, T. D.; LOPES, B. M. T. Análise comparativa de testes sorológicos com
4 antígeno acidificado tamponado e ELISA, no diagnóstico da brucelose bovina, em
5 rebanhos suspeitos e em saneamento de focos. **Revista de Educação Continuada**
6 **em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 2, p. 87-87, 2016.
7
- 8 BERMAN, D. T.; WILSON, B. L.; MORENO, E.; ANGUS, R. D.; JONES, L. M.
9 Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay.
10 **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 355–362. 1980. DOI: 0095-
11 1137/80/04-0355/08\$02.00/0.
12
- 13 BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
14 (MAPA). **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da**
15 **Tuberculose Animal (PNCEBT)** – Brasília:MAPA/SDA/DSA, 2006.
16
- 17 BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
18 (MAPA). Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017. Aprova o Regulamento
19 Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da
20 Tuberculose Animal – PNCEBT. **Diário Oficial [da] República Federativa do**
21 **Brasil**, Brasília, 20 jun. 2017. Seção 1, p. 4-8.
22
- 23 BRINLEY MORGAN, W.J. The serological diagnosis of bovine brucellosis.
24 **Veterinary Record**. v. 80, n. 21, p. 612–620, 1967. DOI: 10.1136/vr.80.21.612.
25
- 26 CASSEB, A.R.; CRUZ, A.V.; JESUS, I.S.; SILVA, S.P.; NEGRÃO, A. M.; BARROS
27 NETO, S.; GALINDO, G. A.; TAVARES, B. B. Soroprevalência da brucelose bovina e
28 bubalina no Estado do Pará. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, p. 42-45, 2015.
29
- 30 CHAND, P.; SADANA, J. R.; BATRA, H. V. Comparison of a dot-ELISA and a plate-
31 ELISA for bovine brucellosis diagnosis. **The Veterinary Record**, v. 127, n. 7, p. 169–
32 170, 1990. DOI: 10.1136/vr.127.7.169.
33
- 34 CHEVILLE, N.F.; STEVENS, M. G.; JENSEN, A. E.; TATUM, F.M.; HALLING, S. M.
35 Immune responses and protection against infection and abortion in cattle
36 experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. **American Journal**
37 **of Veterinary Research**, v. 54, p. 1591–1597, 1993.
38
- 39 COLBY, L.A.; SCHURING, G.G.; ELZER, P.H. An indirect elisa to detect the
40 serologic response of elk (*cervus elaphus nelsoni*) inoculated with *Brucella abortus*
41 strain rb5. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 4, p. 752-759, 2002. DOI:
42 10.7589/0090-3558-38.4.752.
43
- 44 CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2,
45 p. 213-221, 1997. DOI:10.3201/eid0302.970219.
46
- 47 COSTA, G.M.; ABREU, V.L.V.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, J.A.; MARTINS, N.E.
48 Avaliação do teste de imunodifusão mediante emprego do polissacarídeo “O” no
49 diagnóstico da brucelose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
50 **Zootecnia**, v. 51, n. 4, p.317-322, 1999.

- 1 DORNELES, E. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ARAÚJO, M. S.;
2 SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A. P. Immune response triggered by *Brucella*
3 *abortus* following infection or vaccination. **Vaccine**, n. 33, v.31, p. 3659–3666, 2015.
4 DOI:10.1016/j.vaccine.2015.05.057.
5
- 6 DUCROTOY, M. J.; CONDE-ÁLVAREZ, R.; BLASCO, J. M.; MORIYÓN, I. A review
7 of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. **Veterinary**
8 **Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 81-102, 2016. DOI: 10.1016 /
9 j.vetimm.2016.02.002.
10
- 11 DUCROTOY, M. J.; MUÑOZ, P. M.; CONDE-ÁLVAREZ, R.; BLASCO, J. M.;
12 MORIYÓN, I. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis
13 of cattle brucellosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 151, p. 57–72, 2018. DOI:
14 10.1016/j.prevetmed.2018.01.005.
15
- 16 ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
17 Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–874,
18 1971. DOI: 10.1016 / 0019-2791 (71) 90454-x.
19
- 20 FERNANDEZ-PRADA, C. M.; NIKOLICH, M.; VEMULAPALLI, R.;
21 SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S. M.; SCHURIG, G.; HADFIELD, T. L.; HOOVER,
22 D. L. Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in
23 *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4407-
24 4416, 2001. DOI: 10.1128 / IAI.69.7.4407-4416.2001.
25
- 26 FERRAZ, I.B.F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina.
27 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 4, p. 504-508, 1999.
28
- 29 GREVE, I. C. Z. J.; LEAL, R. F.; AMORIM, L. M. P. V.; DA SILVA, D. L.; OLIVEIRA,
30 E. M. O.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B. Estudo comparativo da sensibilidade
31 e especificidade dos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-
32 Mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Revista Acadêmica: Ciência**
33 **Animal**, v. 5, n. 3, 2017.
34
- 35 HECK, F. C.; DEYOE, B.L.; WILLIAMS, J.D. Antibodies to *Brucella abortus* in sera
36 from Strain 19 vaccinated and non-vaccinated cows as determined by enzyme linked
37 immunosorbent assay and conventional serologic methods. **Veterinary Immunology**
38 **Immunopathology**, v. 3, n. 6, p. 629-634, 1982. DOI:10.1016/0165-2427(82)90045-
39 9.
40
- 41 HERR, S.; BRUGGE, L.A. Profiles of Serological Reactions Following Adult Cow
42 Inoculation With Standard Dose *Brucella abortus* strain 19 Vaccine. **Journal of**
43 **South African Veterinary Association**, v. 56, n. 2, p. 93-96, 1985.
44
- 45 LAMB, V.L.; JONES, L.M.; SCHURING, G.; BERMAN, D.T. 1979. Enzyme-linked
46 immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response
47 to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. **Infection and Immunity**, v. 26, p. 240–247,
48 1979.
49

1 LEAL FILHO, J.M.; BOTTENE, I.F.N.; MONTEIRO, L.A.R. C.; PELLEGRIN, A.O.;
2 GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E.O.;
3 GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B. Control of bovine brucellosis from 1998 to
4 2009 in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37,
5 n. 5, p. 3467-3478, 2016.

6
7 MACMILLAN, A. Conventional serological tests. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R.
8 (Eds). Animal brucellosis. **CRC Press**, p. 153-197, 1990.

9
10 MATHIAS, L. A.; MEIRELLES, R. B.; BUCHALA, F. G. Estabilidade do antígeno de
11 célula total de *Brucella abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose
12 bovina pela reação de fixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.
13 27, n. 1, p. 18-22, 2007.

14
15 MATHIAS, L.A.; CHAVES, L.F.; CHEN, A.A.; GIRIO, R.J.S.; NETO, W.V. Evolução
16 de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado
17 tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses
18 de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21,
19 n. 4, p. 139-142, 2001.

20
21 MATURINO, M.P. de M. Levantamento soropidemiológico de brucelose em
22 amostras de bovinos abatidos em matadouros inspecionados no estado da Bahia.
23 Orientador: Robson Bahia Cerqueira. 2014. 91f. **Dissertação (Mestrado**
24 **profissional em Defesa Agropecuária)** - Programa de Pós-Graduação em Defesa
25 Agropecuária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2014.

26
27 MCGIVEN, J.A. New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock
28 and wildlife. **Revue Scientifique Et Technique-Office International Des**
29 **Epizooties**, v. 32, p. 163–176, 2013.

30
31 MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; AGOTTANI, J.V.B.; MARCOS, G. JR. Imunodifusão em
32 gel de ágar com polissacarídeos de membrana de *Brucella abortus* B19-3 no
33 diagnóstico da brucelose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
34 **Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 433-437, 1999.

35
36 MIOT, H. A. Agreement analysis in clinical and experimental trials. **Jornal Vascular**
37 **Brasileiro**, v. 15, n. 2, p. 89-92, 2016. DOI: 10.1590/1677-5449.004216.

38
39 MOLINARO, E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em
40 laboratórios de saúde: volume 1. **Rio de Janeiro**: EPSJV; IOC, 290p., 2009.

41
42 MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E. S. C.; DIAS, H. L. T. Avaliação de seis testes
43 sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,
44 v. 22, n. 2, p. 41-44, 2002. DOI: 10.1590/S0100-736X2002000200002.

45
46 MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TÚRY, E.; SOUZA, J.S. Concepções modernas para o
47 diagnóstico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 4,
48 p.157-162, 1997.

49

- 1 MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis
2 **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 213, 2014. DOI: 10.3389 / fmicb.2014.00213.
3
- 4 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto
5 Alegre: Artmed, 2011. 1273 p.
6
- 7 NICOLETTI, P. Vaccination against *Brucella*. **Advances in Biotechnological**
8 **Processes**, v. 13, p. 147–168, 1990.
9
- 10 NIELSEN, D.G. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test
11 performance and cost comparison. **Revue Scientifique Et Technique-Office**
12 **International Des Epizooties**, v. 23, n. 3, p. 989-1002, 2004.
13
- 14 NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. Antibody Isotype Response in Adult Cattle Vaccinated
15 with *Brucella abortus* S 19. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 19,
16 p. 205-214, 1988. DOI: 10.1016/0165-2427(88)90108-0.
17
- 18 NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HEHEGHAN,
19 T.; McNAMRA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROL, J.; ROJAS,
20 X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET,
21 R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNAMARTÍNEZ, E. Fluorescence polarization
22 assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary**
23 **Microbiology**, v. 80, p. 163-170, 2001. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00386-2.
24
- 25 NIELSEN, K.H. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v.
26 90, p. 447–459, 2002. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00229-8.
27
- 28 NIELSEN, K.H.; SMITH, P.; YU, W.; NICOLETTI, P.; ELZER, P.H.; ROBLES, C.;
29 BERMUDEZ, R.; RENTERIA, T.; MORENO, F.S.; RUIZ, A.; MASSENGILL, C.;
30 MUENKS, Q.; JURGERSEN, G.; TOLLERSRUD, T.; SAMARTINO, L.E.; CONDE, S.;
31 FORBES, L.; GALL, D.; PEREZ, B.; ROJAS, X.; MINAS, A. Towards single screening
32 tests for brucellosis. **Revue Scientifique Et Technique-Office International Des**
33 **Epizooties**, v. 24, p. 1027–1037, 2005.
34
- 35 PAULIN, L. M. S.; ANDRADE-PACHECO, W. A.; CASTRO, V.; FEDERSONI, I. S. P.
36 Avaliação entre quatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones
37 causadas por *Brucella abortus* en bovinos. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n.
38 1, p. 9-15, jan./mar, 2009.
39
- 40 PERRY, M. B.; BUNDLE, D. R. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of
41 *Brucella*. G.L. Adams (Ed.). **Advances in Brucellosis Research**, Texas, p. 76-88
42 1990.
43
- 44 RIBEIRO, M.G.; SPAGO, N.; FAVA, N.; RATTI, J.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-
45 *Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arquivo Brasileiro de**
46 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, n.2, p. 137-150, 1997.
47
- 48 ROCHA, K. P. C.; CERQUEIRA, R. B.; 2; ANDREA, M. V.; 3; BRANDÃO, P. V. D.; 4;
49 VIEIRA, V. P. JÚNIOR, L. S. S.; 6; SILVA, B. P. Utilização de um Teste Elisa indireto

1 para o diagnostico da brucelose em amostras de soro de búfalas. **Revista Científica**
2 **de Medicina Veterinária**, v. X, n. 30, p. 1679-7353, 2018.

3
4
5 SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence
6 polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina.
7 **Journal of Immunoassay**, v. 20, n. 3, p. 115-126, 1999. DOI:
8 10.1080/01971529909349347.

9
10 SANGARI, F. J.; AGÜERO, J.; GARCÍA-LOBO, J. M. The genes for erythritol
11 catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. **Microbiology**,
12 v. 146, n. 2, p. 487–495, 2000. DOI:10.1099/00221287-146-2-487.

13
14 SAS. Statistical Analysis Software. SAS® Studio 3.1: User's Guide. Cary, NC: SAS
15 Institute Inc, 2014.

16
17 SAUNDERS, G.C.; CLINARD, E.H.; BARTLETT, M.L.; SANDERS, W.M. Application
18 of the indirect enzyme-labeled antibody microtest to the detection and surveillance
19 of animal diseases. **Journal Of Infectious Diseases**. 136 (Suppl), p. 258–266,
20 1977. DOI: 10.1093/infdis/136.supplement_2.s258

21
22 SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines:
23 past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 479–496, 2002.
24 DOI:10.1016/s0378-1135(02)00255-9.

25
26 SIMPSON, G. J. G.; MARCOTTY, T.; ROUILLE, E.; CHILUNDO, A.; LETTESON, J.
27 J.; GODFROID J. Immunological response to *Brucella abortus* strain 19 vaccination
28 of cattle in a communal area in South Africa. **Journal of the South African**
29 **Veterinay Association**, v. 89, p. 1–7. 2018. DOI:10.4102/jsava.v89i0.1527.

30
31 SUTHERLAND, S. S.; LE CRAS, D. V.; EVANS, R.J. Comparison of the complement
32 fixation test and the indirect hemolysis test for cattle vaccinated and infected with
33 *Brucella abortus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 599–603, 1984.
34 DOI: 0095-1137/82/100599-05\$02.00/0.

35
36 THOEN, C. O.; PIETZ, D. E.; ARMBRUST, A. L.; HARRINGTON, R. JR. Enzyme
37 immunoassay for detecting Brucella antibodies in cow's milk. **Journal of clinical**
38 **microbiology**, v. 10, n. 2, p. 222–225, 1979. DOI: 0095-1137/79/08-
39 0222/04\$02.00/0.

40
41 VIANA, F.C.; VILLELA, L.G.; SILVA, J.A.; MENDES, J.E.; MOREIRA, E.C.; DIAS,
42 T.D. Vacinação contra brucelose bovina com dose reduzida da vacina (amostra 19)
43 por via conjuntival. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal**
44 **de Minas Gerais**, v. 34, p. 279-87, 1982.

45
46 WALLACH, J. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; BALDI, P. C.; FOSSATI, C. A. Human
47 infection with M- strain of *Brucella canis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1,
48 p. 146–148, 2004. DOI:10.3201/eid1001.020622.

49

- 1 WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Terrestrial Manual 2018:**
2 Chapter 3.1.4. – Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection
3 with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). Disponível em:
4 <[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELL
6 OSIS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELL
5 OSIS.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2019, 09:05.
- 7 ZACCHEUS, M.V.; ALI, A; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; WEINTRAUB, A.;
8 IRIARTE, M.; I. MORIYÓN, G.O.R. WidmalmThe epitopic and structural
9 characterization of *Brucella suis* biovar 2 O-polysaccharide demonstrates the
10 existence of a new M-negative C-negative smooth *Brucella serovar*. **PloS One**, v. 8,
11 p. 1-7, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0053941.