

RESPOSTA SOROLÓGICA DE BEZERRAS TABAPUÃS VACINADAS COM CEPA B19 de *Brucella abortus*

SEROLOGICAL RESPONSE OF TABAPUÃ HEIFERS VACCINATED WITH *Brucella abortus* STRAIN 19

T. M. BLANKENHEIM^{1*}, G. C. P. SILVA², R. F. SANTOS², R. MASSA²,
R. B. M. BARTOLI³, L. A. MATHIAS⁴

RESUMO

Foi avaliada a resposta sorológica induzida pela vacinação com a dose padrão de $60-120 \times 10^9$ organismos da cepa B19 de *Brucella abortus* em bezerras Tabapuãs, entre 3 e 8 meses de idade, pelos testes sorológicos preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) para diagnóstico da brucelose bovina. Foram examinadas amostras de soro sanguíneo de 72 animais em quatro provas sorológicas: antígeno acidificado tamponado (AAT), teste de soroaglutinação lenta juntamente com o teste de 2-mercaptoetanol (2-ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF), o qual foi interpretado de duas formas: ponto de corte variável e ponto de corte fixo. As amostras de soro sanguíneo foram colhidas imediatamente antes da vacinação, e após 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 dias. Foi calculada a especificidade dos testes e os resultados foram comparados pelo indicador kappa. O TPF apresentou especificidade mais elevada do que os outros testes nas amostras colhidas entre 30 e 90 dias após a vacinação. Aos 270 dias de vacinação, observou-se especificidade de 93,74% no AAT, no 2-ME e na RFC. No TPF com ponto de corte variável a especificidade foi 87,5% e com ponto de corte fixo foi 100,0%. O TPF apresentou maior capacidade de discriminação dos títulos de anticorpos vacinais logo após a vacinação, quando comparado com os outros testes preconizados pelo PNCEBT, mostrando-se um teste útil para o diagnóstico da brucelose bovina.

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose, Polarização Fluorescente, Sorologia, Vacinação.

SUMMARY

The study aimed to analyze the antibody response induced by vaccination with the standard dose of $60-120 \times 10^9$ organisms of *Brucella abortus* strain 19 in Tabapuã heifers, aged between 3 and 8 months, by serological tests recommended by the National Program for Brucellosis and Tuberculosis Control and Eradication (PNCEBT) for the diagnosis of bovine brucellosis. Serum samples of 72 animals were examined by four serological tests: rose Bengal test (RBT), standard agglutination test with the 2-mercaptoetanol (2-ME) test, complement fixation test (CFT) and fluorescence polarization assay (FPA), which was interpreted in two ways: variable cutoff and fixed cutoff. Heifers were bled immediately prior to vaccination, and after 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 and 360 days. Specificity of the tests was calculated, and the results were compared using the kappa statistic. FPA had a higher specificity than the other tests on the samples collected from 30 to 90 days after vaccination, but over time this difference decreased. At 270 days of vaccination, the specificity of RBT, 2-ME and RFC was 93.74%. The specificity of the FPA with variable cutoff was 87.5%, and with fixed cutoff was 100.0%. It was concluded that FPA had a higher discrimination ability for vaccination antibody titers shortly after vaccination, when compared with other tests recommended by the PNCEBT, and is a useful tool for the diagnosis of bovine brucellosis, besides being easy and quick to perform.

KEY-WORDS: Brucellosis, Fluorescence polarization, Serology, Vaccination.

¹ Médica veterinária, aluna de pós-graduação, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – *Câmpus* de Jaboticabal – E-mail: tmbvet@gmail.com

² Médica (o) veterinária (o), aluna (o) de pós-graduação, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – *Câmpus* de Jaboticabal.

³ Médica Veterinária, Profa. Dra. Universidade Federal de Goiás, *Câmpus* Avançado de Jataí - Unidade Jatobá.

⁴ Médico Veterinário, Prof. Dr. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – *Câmpus* de Jaboticabal.

INTRODUÇÃO

Os programas de controle da brucelose bovina baseiam-se em duas medidas principais: vacinação das bezerras com *B. abortus* B19 e identificação rotineira dos animais infectados, por testes sorológicos. No entanto, a combinação dessas duas medidas apresenta como limitação o fato de a amostra vacinal induzir a formação de anticorpos que podem levar à ocorrência de reações falso-positivas nos testes de diagnóstico. Para contornar esse inconveniente, algumas estratégias podem ser adotadas, como a vacinação apenas de fêmeas jovens e o desenvolvimento de testes mais específicos que permitam melhor diferenciação dos anticorpos de animais infectados dos de origem vacinal. Nesse contexto, vários testes sorológicos já foram desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose bovina (NIELSEN, 2002; POESTER et al., 2010), assim como muitos estudos foram conduzidos para avaliar a resposta sorológica à vacina.

No Brasil, a legislação vigente prevê que o diagnóstico seja firmado pelo uso em série de um teste de triagem, o antígeno acidificado tamponado (AAT), e um teste confirmatório, a reação de fixação de complemento (RFC) ou a combinação do teste do mercaptoetanol com o teste de soroaglutinação lenta em tubos (2-ME) (BRASIL, 2004). Embora essa combinação confira boa especificidade ao diagnóstico, não está isenta da influência das reações vacinais. Posteriormente, foi incluído no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, o teste de polarização fluorescente (TPF), que pode ser usado como teste confirmatório ou como teste único (BRASIL, 2010). O TPF tem demonstrado especificidade superior a dos testes convencionais, inclusive em animais vacinados com a cepa B19 (NIELSEN et al., 1996; SAMARTINO et al., 1999).

O teste de polarização fluorescente já foi avaliado no Brasil (MATHIAS et al., 2010), porém seu uso é pouco difundido. Ainda, número restrito de estudos foram realizados (FARIA, 2010) avaliando o perfil sorológico do TPF em-bezerras vacinadas com a dose de vacina prevista no PNCEBT. Dessa forma, o presente estudo investigou o comportamento dos títulos vacinais induzidos pela cepa B19 em bezerras da raça Tabapuã recém-vacinadas, detectados pelos testes oficialmente permitidos para o diagnóstico da brucelose no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 72 fêmeas bovinas da raça Tabapuã, clinicamente saudáveis, com idade de quatro meses. Devido ao manejo na fazenda no qual as colheitas foram realizadas, os animais foram divididos por lotes de acordo com a data de nascimento e agrupados para a comercialização em leilões. Dessa maneira, o número de animais em cada colheita foi decrescente, conforme os animais foram comercializados. Com isso, foram obtidas amostras de sangue de 72 bezerras no dia da vacinação, 70 aos 30 dias de vacinação, 65 aos 60 dias, 54 aos 90 dias, 54

aos 120 dias, 45 aos 150 dias, 31 aos 180 dias, 21 aos 210 dias, 17 aos 240 dias, 16 aos 270 dias, 4 aos 300 dias e 5 aos 330 dias após a vacinação.

A vacinação foi realizada por via subcutânea, com dose de 2 mL, conforme recomendações do fabricante da vacina. Os animais foram vacinados sempre com a mesma marca de vacina, utilizando a dose-padrão utilizada no Brasil.

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção da jugular utilizando agulhas descartáveis e individuais para cada animal. Após a colheita, o sangue foi mantido em repouso, em temperatura ambiente, *over-night*, até a retração do coágulo. Em seguida, o soro sanguíneo foi separado, estocado em alíquotas, a -20°C.

Todas as amostras de soro sanguíneo foram submetidas aos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), soroaglutinação lenta acompanhada de mercaptoetanol (2-ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF).

Os testes AAT e 2-ME foram realizados e interpretados conforme recomendado no Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Para a RFC foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988), utilizando antígeno produzido e comercializado pelo Instituto Biológico de São Paulo com *Brucella abortus* amostra 1119/3, para a prova de soroaglutinação lenta em tubos. Como complemento foi utilizado soro de cobaia, titulado conforme a técnica descrita por ALTON et al. (1988). Foi empregado sistema hemolítico formado por hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo de coelho contra hemácia de ovino) titulada conforme a recomendação de ALTON et al. (1988). Para a interpretação dos resultados, foram considerados positivos os soros com pelo menos 25% de fixação de complemento na diluição 1:4.

O TPF foi realizado de acordo com a metodologia descrita por NIELSEN et al. (1996), utilizando o “*Brucella abortus* Antibody Test Kit” produzido por Diachemix, USA. Para a interpretação dos resultados com ponto de corte variável, o valor em mP (unidade de milipolarização) obtido no soro de controle negativo foi subtraído do resultado obtido no soro em análise. Foram consideradas negativas as amostras com até 9,9 mP acima do valor observado para o controle negativo testado no mesmo lote da amostra em questão, suspeitos aqueles com 10,0 a 19,9 mP acima, e positivos os soros com 20 mP acima do valor do controle negativo, conforme recomenda o fabricante. Para a dicotomização dos resultados do teste, foram analisados os resultados excluindo os suspeitos e também considerando os suspeitos como positivos e considerando os suspeitos como negativos. Foi feita também a interpretação usando um ponto de corte fixo. Para isso, foi adotado o valor de 87,3 mP (MATHIAS et al., 2010).

De todos os testes, foram analisados os dados dicotômicos, ou seja, após interpretação e classificação do resultado em positivo e negativo. A especificidade

dos testes foi calculada pela relação entre o número de resultados negativos e o total de animais examinados, uma vez que todos os animais eram livres da infecção (THRUSFIELD, 2005).

Para a observação da concordância entre os resultados dos testes foi calculado o indicador Kappa (LANDIS e KOCK, 1977).

RESULTADOS

Todos os 72 animais testados acusaram ausência de reação nas quatro provas sorológicas no dia da vacinação (dia zero), indicando ausência de contato com o microrganismo.

Aos 30 dias após a vacinação, todos os animais reagiram no AAT, o que significa ausência total de especificidade desse teste nesse momento. Em contraste, aos 30 dias o teste de polarização fluorescente (TPF) apresentou especificidade variando de 15,71% a 44,29%, conforme o critério de interpretação. A maior especificidade (44,29%), foi apresentada pelo TPF com ponto de corte variável e considerando negativos os animais com resultado suspeito e, em seguida, o TPF com ponto de corte fixo (37,14%). Observou-se também que a RFC e 2-ME apresentaram especificidade mais baixa se comparados ao TPF nas diferentes formas de interpretação (dicotomização dos suspeitos) analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de especificidade (em porcentagem) para cada teste de diagnóstico de brucelose, de acordo com os dias após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com *Brucella abortus* B19.

Dias após a vacinação	Testes sorológicos							
	AAT	2-ME Inc+	2-ME Inc Ex	RFC	TPFvar Sus +	TPFvar Susp Ex	TPFvar Sus -	TPFfixo
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
30	0,00	4,29	4,76	8,57	15,71	22,00	44,29	37,14
60	6,15	13,85	16,67	12,31	13,85	20,93	47,69	33,85
90	12,96	18,52	19,23	25,93	9,26	14,29	44,44	42,59
120	24,07	31,48	32,08	46,30	22,22	33,33	55,55	53,70
150	46,67	57,78	60,47	55,56	24,44	40,74	64,44	62,22
180	58,06	64,52	68,97	64,52	35,48	57,89	74,19	74,19
210	76,19	80,95	80,95	80,95	76,19	80,00	80,95	80,95
240	70,59	94,12	94,12	94,12	88,24	100,00	100,00	94,12
270	93,75	93,75	93,75	93,75	87,50	100,00	100,00	100,00
300	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Susp-: animais suspeitos considerados negativos; Susp+: animais suspeitos considerados positivos; Inc+: animais inconclusivos considerados positivos; Inc-: animais inconclusivos considerados negativos; SuspEx: animais suspeitos excluídos da contagem; IncEx: animais inconclusivos excluídos da contagem.

Ao longo do estudo, a proporção de animais com resultado negativo apresentou valores crescentes, com eventuais oscilações, indicando aumento da especificidade de todos os testes sorológicos avaliados. Também se observou que a diferença entre as especificidades dos diversos testes foi diminuindo ao longo do tempo. O TPF foi o primeiro a proporcionar resultado negativo em todas as amostras, fato observado a partir dos 240 dias de vacinação. Aos 300 dias de vacinação, também foi observado resultado negativo nos outros testes, perfazendo 100% de especificidade (Tabela 1).

A concordância entre os testes ao longo do estudo, baseada no indicador Kappa, encontra-se na tabela 2. De modo geral, quanto maior o tempo decorrido da vacinação, maior também foi à concordância entre os resultados dos testes, exceto por eventuais oscilações relacionadas com a redução do número de animais, que foi decrescente ao longo do

estudo. O teste de AAT (utilizado como triagem), somente apresentou concordância ótima com os testes confirmatórios (2-ME e RFC) aos 210 dias de vacinação. Comparando os resultados desses dois testes confirmatórios, observou-se concordância ótima aos 60 e aos 180 dias. Aos 210 dias, esses dois testes apresentaram concordância perfeita ($\kappa = 1$).

Aos 30 dias após a vacinação, a concordância entre os resultados do TPF e os dos demais testes variou de fraca a regular, na grande maioria das comparações. Os menores valores desse coeficiente foram observados nas seguintes comparações: (a) AAT x TPFvar quando os animais suspeitos foram considerados negativos na colheita aos 60 dias após a vacinação, (b) 2-ME x TPFvar quando os animais inconclusivos foram considerados positivos na colheita do dia 30 e (c) RFC x TPFvar quando os animais suspeitos foram considerados negativos na colheita do dia 30 (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de kappa entre os testes para diagnóstico de brucelose conforme o tempo após a vacinação de bezerras da raça Tabapuã com *Brucella abortus* B19.

Testes comparados	Dias após a vacinação							
	0	30	60	90	120	150	180	210
AAT x 2-ME (Inc+)	*	0,0	0,58	0,79	0,63	0,78	0,73	0,86
AAT x 2-ME (IncEx)	*	0,0	0,58	0,79	0,63	0,77	0,78	0,86
AAT x RFC	*	0,0	0,64	0,62	0,54	0,82	0,86	0,86
AAT x TPF fixo	*	0,0	0,23	0,33	0,37	0,69	0,18	0,86
AAT x TPFvar (Susp-)	*	0,0	0,13	0,31	0,4	0,65	0,65	0,82
AAT x TPFvar (Susp+)	*	0,0	0,58	0,44	0,53	0,45	0,44	1
AAT x TPFvar (SuspEx)	*	0,0	0,57	0,72	0,72	0,92	0,89	1
2-ME (Inc+) x RFC	*	0,41	0,86	0,79	0,62	0,86	0,72	1
2-ME (IncEx) x RFC	*	0,47	0,8	0,78	0,61	0,85	0,76	1
2-ME (Inc+) x TPF fixo	*	0,14	0,4	0,47	0,49	0,72	0,77	1
2-ME (IncEx) x TPF fixo	*	0,15	0,39	0,52	0,52	0,7	0,92	1
2-ME (Inc+) x TPF (Susp+)	*	0,23	0,48	0,31	0,58	0,38	0,51	0,86
2-ME (Inc+) x TPF (Susp-)	*	0,04	0,31	0,44	0,57	0,86	0,77	1
2-ME (Inc+) x TPF (SuspEx)	*	0,21	0,66	0,53	0,87	1	1	1
2-ME (IncEx) x TPF (Susp+)	*	0,28	0,52	0,31	0,58	0,37	0,43	0,86
2-ME (IncEx) x TPF (Susp-)	*	0,04	0,31	0,52	0,56	0,80	0,91	1
2-ME (IncEx) x TPF (SuspEx)	*	0,25	0,72	0,62	0,87	1	1	1
RFC x TPF fixo	*	0,27	0,35	0,7	0,7	0,68	0,62	1
RFC x TPF (Susp+)	*	0,66	0,4	0,33	0,5	0,41	0,34	0,86
RFC x TPF (Susp-)	*	0,23	0,56	0,61	0,67	0,82	0,62	1
RFC x TPF (SuspEx)	*	0,65	0,66	0,88	0,88	1	0,78	1
TPFfixo x TPF (Susp+)	*	0,48	0,39	0,2	0,39	0,32	0,32	0,86
TPF fixo x TPF (Susp-)	*	0,73	0,69	0,96	0,89	0,86	1	1
TPFfixo x TPF (SuspEx)	*	0,89	0,93	1	0,94	0,92	1	1

AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol; RFC: reação de fixação de complemento; TPFvar: teste de polarização fluorescente com ponto de corte variável; TPFfixo: teste de polarização fluorescente com ponto de corte fixo; Susp-: animais suspeitos considerados negativos; Susp+: animais suspeitos considerados positivos; Inc+: animais inconclusivos considerados positivos; Inc-: animais inconclusivos considerados negativos; SuspEx: animais suspeitos excluídos da contagem; IncEx: animais inconclusivos excluídos da contagem.

*Não calculável.

DISCUSSÃO

A indução de anticorpos pela vacina com cepa B19 de *Brucella abortus* em bezerras tem sido objeto de estudo há várias décadas, em razão das reações falso-positivas que esses anticorpos podem acarretar, resultando em redução na especificidade do diagnóstico sorológico. Em geral, as investigações realizadas mostram forte resposta sorológica, que se mantém ao longo de alguns meses. Porém, na maioria dos animais, com o transcorrer dos meses após a vacinação, ocorreu redução significativa do número de animais reagentes (e títulos), fato também observado no presente estudo.

Mesmo após um período curto de tempo, nem todos os animais apresentaram reação significativa em todos os testes. Após 30 dias da vacinação, o único teste que apontou resultado positivo em todos os animais foi o AAT, justamente o teste de triagem e do qual se espera

menor especificidade. Já nos testes que podem ser usados como confirmatórios foi observado proporção variável de resultados negativos. Nesse particular, o TPF apresentou a maior proporção de resultados negativos aos 30 dias de vacinação (Tabela 1).

Embora a grande maioria dos animais apresente título vacinal significativamente reduzido meses após a vacinação, há animais que mantêm títulos persistentes. Tal fato é justificado pela persistência da infecção pela cepa vacinal (CHAPPEL, 1989). Como a B19 é uma cepa de baixa virulência de *B. abortus*, induz resposta imunológica semelhante aos isolados da mesma bactéria de campo. Quando os bovinos são vacinados, entre três e oito meses de idade, todos os animais têm o título de anticorpos diminuído dentro de poucos meses, declinando gradativamente, em geral, até 12 meses da vacinação. Porém, a vacina pode causar títulos sorológicos vacinais persistentes e infecção permanente pela cepa B19 numa pequena porcentagem

de animais (PAHO/WHO, 1999). ALTON (1981) referiu que cerca de uma em cada 200 bezerras vacinadas mantém reação sorológica por um período de tempo prolongado.

Em geral, as vacinas atenuadas de *B. abortus* induzem imunidade mais duradoura do que as inativadas, uma vez que a bactéria se multiplica no hospedeiro, usualmente por períodos limitados e a resistência conferida é do tipo celular. No entanto, a imunidade humoral (produção de anticorpos) tem menor influência na proteção contra infecções naturais por *B. abortus*. Estudos em bovinos têm mostrado baixa relação entre anticorpos pós-vacinais circulantes e o desenvolvimento de imunidade duradoura (NICOLETTI, 1990).

Os dados do presente estudo não permitem obter conclusões seguras sobre a persistência dos anticorpos vacinais, pois não foi possível acompanhar todas as bezerras ao longo do estudo, uma vez que muitos animais foram comercializados no período em que ainda apresentavam reação positiva em vários dos testes sorológicos.

Baixa especificidade dos testes convencionais em bezerras bovinas vacinadas tem sido relatada (MATHIAS et al., 2001; JARDIM et al., 2006). Como esperado, o AAT foi o teste com menor especificidade aos 30 dias de vacinação, uma vez que nenhum animal apresentou resultado negativo. Em contraste, a maior especificidade foi observada no TPF, o que também está de acordo com os dados encontrados na literatura. Na primeira descrição deste teste no diagnóstico sorológico da brucelose bovina, NIELSEN et al. (1996) relataram elevada especificidade ao examinar soro de animais adultos que haviam sido vacinados com *B. abortus* B19. Em animais recém-vacinados, SAMARTINO et al. (1999) observaram especificidade de 64,9% 26 dias após a vacinação. No presente estudo foram observados valores variando de 15,71% a 44,29%, dependendo do critério de interpretação adotado para as reações suspeitas (Tabela 1).

A especificidade observada nos testes confirmatórios nos animais amostrados aos 30 dias de vacinação é similar aos achados obtidos por SAMARTINO et al. (1999). No presente estudo, observou-se especificidade de 4,29% e 8,57%, respectivamente, nos testes 2-ME e RFC, ao passo que SAMARTINO et al. (1999) constatou 3,2% e 7,0% de especificidade para esses testes que o PNCEBT recomenda para a confirmação de animais reagentes na AAT.

A especificidade observada aos 90 dias de vacinação, observou-se para os animais 12,96% no AAT, ao passo que FARIA (2010) constatou valor superior (41,94%) de animais com resultado negativo.

Nos testes confirmatórios do programa brasileiro, os valores observados no presente estudo também foram inferiores aos observados por outros autores aos 90 dias de vacinação. Aos 89 dias de vacinação, SAMARTINO et al. (1999) obtiveram 61,3% e 75,1% de especificidade, respectivamente, nos testes 2-ME e RFC. FARIA (2010) observou valores de 62,37% e 69,89%, aos 90 dias, enquanto no presente

estudo os valores foram bem inferiores, 18,52% e 25,93%, respectivamente.

No TPF, aos 90 dias, a especificidade encontrada no presente estudo também foi inferior à observada por aqueles autores. FARIA (2010) que analisou também dois critérios de interpretação do TPF. Adotando o ponto de corte variável, obteve especificidade de 70,97% se os resultados suspeitos forem considerados positivos. No TPF, aos 90 dias, a especificidade encontrada neste trabalho também foi inferior à observada por aqueles autores. FARIA (2010) analisou também dois critérios de interpretação do TPF. Adotando ponto de corte variável, obteve especificidade de 70,97% se os resultados suspeitos forem considerados positivos, enquanto no presente estudo se observou apenas 9,26%. Adotando ponto de corte fixo, FARIA (2010) obteve 87,1% de especificidade, ao passo que no presente estudo o valor obtido foi 42,59%. Já no estudo de SAMARTINO et al. (1999), aos 89 dias, foi de 92,1%. No presente estudo, nesta ocasião, obteve-se uma grande proporção de resultados suspeitos, reduzindo a especificidade do teste.

No estudo de SAMARTINO et al. (1999) a dose vacinal, adotada na Argentina, foi de $3-5 \times 10^9$ organismos vivos. Já no Brasil, a vacina B19 de *B. abortus* utiliza $60-120 \times 10^9$ organismos, a mesma dose adotada no presente estudo e no conduzido por FARIA (2010).

Aos 180 dias de vacinação, se observou nas bezerras Tabapuás vacinadas especificidade de 58,06%, 64,52% e 64,52%, respectivamente, nos testes AAT, 2-ME e RFC, enquanto FARIA (2010) reportou 87,1%, 88,17% e 91,4%, respectivamente. No TPF, FARIA (2010) encontrou especificidade de 83,7% e 87,1% com ponto de corte variável e fixo, respectivamente. Na mesma situação, constatou-se especificidade de 35,48% e 74,19%, respectivamente, na presente pesquisa.

Embora, de modo geral, os valores de especificidade observados tenham sido inferiores aos constatados nas duas pesquisas citadas acima, os três estudos mostram que logo após a vacinação a especificidade do TPF é bastante superior à dos outros testes avaliados, mas, com o passar do tempo, essa diferença vai diminuindo, ao ponto de FARIA (2010) ter observado praticamente a mesma especificidade entre o AAT e o TPF após 12 meses de vacinação. Os dados do presente estudo não permitem tirar conclusões seguras a respeito do comportamento dos testes após 12 meses, devido à grande redução no número de animais observados.

No presente estudo, observou-se que aos 270 dias após a vacinação a especificidade dos testes avaliados foi relativamente alta, variando de 87,5% para o TPF com ponto de corte móvel, e considerando positivos os suspeitos, até 100,0% no TPF com ponto de corte fixo. Achado similar foi obtido por FARIA (2010), que constataram especificidade variando de 92,47% (AAT e TPF com ponto móvel e sem descartar os suspeitos) a 94,62% (2-ME e RFC). Note-se que esses valores não estão distantes daqueles constatados em estudos realizados com animais adultos. DAJER et al. (1999), em um estudo realizado no México,

verificaram especificidade de apenas 68,8% no teste rosa de Bengala (que é similar ao AAT) e de 96,9% no TPF, e MATHIAS et al. (2010) relataram especificidade variando de 82,6% a 98,3% no TPF interpretado com ponto de corte fixo e realizado em quatro diferentes laboratórios no Brasil.

Mesmo os testes convencionais apresentaram especificidade elevada 300 dias após a vacinação. Resultados semelhantes foram encontrados por RIBEIRO et al. (1997), no Brasil, os quais verificaram que bezerras vacinadas de 3 a 8 meses de idade apresentaram resultados negativos após 10 meses de vacinação nas provas do 2-ME, AAT, soroaglutinação em tubos e soroaglutinação rápida, teste este que deixou de ser utilizado no Brasil. Também KOLODA (2005) assinalou que 45 bezerras bovinas (100%) tornaram-se não reagentes no AAT aos 360 dias pós-vacinais. Ainda no Brasil, em bezerras búfalas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a cepa padrão de *B. abortus* (B19), e acompanhadas sorologicamente por 720 dias pelas provas de AAT, 2-ME e RFC, foi observado que todos os animais foram negativos na RFC, AAT e 2-ME aos 270, 300 e 360 dias pós-vacinais, reforçando a possibilidade de uso dos testes sorológicos em bezerras vacinadas na idade supracitada, após 24 meses de idade, sem interferências de anticorpos de origem vacinal (NARDI JÚNIOR et al., 2012).

Comparando os resultados dos testes aos 30 dias após a vacinação, não se observou boa concordância na grande maioria dos testes. Somente se constatou kappa acima de 0,61 entre RFC e TPF. Aos 60 dias, a concordância aumentou na maioria das comparações e foi observado kappa 0,86, caracterizando concordância ótima, na comparação entre 2-ME e RFC. Noventa dias após a vacinação observou-se kappa 0,79 entre AAT e 2-ME, 0,62 entre AAT e RFC e 0,79 entre 2-ME e RFC. De maneira similar, nessas mesmas comparações e com o mesmo período de observação, FARIA (2010) verificou, respectivamente, 0,64, 0,64 e 1,0, ou seja, concordância perfeita entre 2-ME e AAT aos 90 dias de vacinação.

A comparação entre o TPF e os outros testes mostrou concordância crescente ao longo do tempo, exceto nas últimas colheitas, quando o número de animais foi pequeno, prejudicando essa tendência (Tabela 2). Esse achado concorda com os obtidos por FARIA (2010), que também encontrou aumento da concordância entre os testes conforme se distanciava a data da vacinação.

A maioria dos estudos com o TPF têm utilizado ponto de corte fixo (NIELSEN et al., 1996; NIELSEN et al., 1998; SAMARTINO et al., 1999; DAJER et al., 1999; MCGIVEN et al., 2003). Entretanto, NIELSEN e GALL (2001) afirmaram que a adoção de um ponto de corte determinado pelo valor obtido no teste de soros negativos adicionado a uma constante (ponto de corte variável), talvez seja mais vantajoso do que adotar o ponto de corte fixo, pois considera as variações do dia a dia, embora esse critério também tenha seus inconvenientes.

Na comparação entre as duas formas de interpretação do TPF (ponto de corte variável e com

ponto de corte fixo), observou-se concordância variando de ótima a perfeita quando as amostras com resultado suspeito foram excluídas da análise. Já em outras interpretações a concordância foi menor, como resultado de número considerável de amostras com resultado suspeito. Quando as amostras suspeitas foram incluídas no total examinado, o valor de kappa resultou em concordância fraca ou regular, enquanto FARIA (2010) observou concordância de boa a ótima nessa mesma comparação.

O presente estudo foi conduzido com bezerras da raça Tabapuã, enquanto AGUIRRE et al. (2002) obteve achados similares nos testes sorológicos (inclusive o TPF), avaliando a resposta sorológica de bezerras Holandesas vacinadas com a dose de 3×10^{10} organismos vivos de *B. abortus*. Ao contrário, FARIA (2010) verificou diferença significativa de resposta vacinal ao estudar animais Girolandos e mestiços (3/4 Zebu até Holandês PO), observando certa influência do componente racial dos animais ao comparar o perfil sorológico de diferentes testes em animais vacinados.

Os dados obtidos mostram que o problema da resposta induzida pela vacinação é mais acentuado logo após a aplicação da vacina, e nessa fase o TPF apresentou maior capacidade de discriminação dos títulos de anticorpos vacinais, quando comparado com os outros testes preconizados pelo PNCEBT, apresentando-se, portanto, como uma ferramenta útil para o diagnóstico da brucelose bovina, além de ser de execução fácil e rápida.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, N. P.; VANZINI, V. R.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; VALENTINI, B. S.; DE LUCCA, G.; AUFRANC, C.; CANAL, A.; VIGLIOCCO, A.; NIELSEN, K. Antibody dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.23, n.4, p.471-478, 2002.
- ALTON, G. G. The control of bovine brucellosis. Recent Developments. **World Animal Review**, v.39, p.17-24, 1981.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 190p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa SDA nº 6, de 08 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de janeiro de 2004. Seção 1, p.6-10.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 27, de 20 de outubro de 2010. Aprova o teste de polarização fluorescente para utilização no Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose, no diagnóstico da brucelose bovina e bubalina. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 22 de outubro de 2010, Seção 1.
- CHAPPEL, R. J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, v.16, n.2, p.3-5, 1989.
- 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. **Preventive Veterinary Medicine**. v.40, p.67-73, 1999.
- FARIA, G. C. **Avaliação do teste de polarização fluorescente para discriminar títulos sorológicos de bezerras vacinadas com amostra B19 de *Brucella abortus***. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 31p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, 2010.
- JARDIM, G. C.; PIRES, P. P.; MATHIAS, L. A.; RIBEIRO, O. C.; KUCHEMUCK, M. R. G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.177-182, 2006.
- KOLODA, M. **Cinética de produção de anticorpos em bezerras imunizadas com a CEPA B19 de *Brucella abortus***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 69p. Dissertação (Mestrado).
- LANDIS, J. R.; KOCK, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v.33, n.1, p.159-174, 1977.
- MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; CHEN, A. A.; GIRIO, R. J. S.; VALÉRIO NETO, W. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado, e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.21, n.4, p.139-142, 2001.
- MATHIAS, L. A.; CORBELLINI, L. G.; MAIA, L.; NASCIMENTO, K. F.; PAULIN, L. M. S.; SAMARTINO, L. E.; SERQUEIRA, M. A.; SOARES FILHO, P. M.; SOUZA, M. M. A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.10, p.2135-2140, 2010.
- 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. **Journal of Immunological Methods**, v.278, p.171 - 178, 2003.
- NARDI JÚNIOR, G.; RIBEIRO, M. G.; JORGE, A. M.; MEGID, J.; SILVA, L. M. P. Serological profile of buffalo (*Bubalus bubalis*) female calves vaccinated with standard *Brucella abortus* strain 19 vaccine using rose bengal, 2-mercaptoethanol and complement fixation tests. **Biologicals**, v.40, n.2, p.158-61, 2012.
- NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, p.283-299, 1990.
- 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*. **Journal of Immunological Methods**, v.195, p.161-168, 1996.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGIL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, 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. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.22, p.183-201, 2001.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.447-459, 2002.
- PAHO/WHO – Pan American Health Organization/World Health Organization. **Brucellosis PAHO/WHO Experts Consultation Meeting on Vaccines and Vaccination Strategies**, 1999.
- POESTER, F. P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L. E.; YU, W. L. Diagnosis of brucellosis. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.46-60, 2010.
- RIBEIRO, M. G.; SPAGO, N.; RATTI, J. R.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.137-150, 1997.
- SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Journal of Immunoassay**, v.20, p.115-126, 1999.
- THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. Oxford: Blackwell Science, 3 ed. 2005. 610 p.