

Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B 19¹

Luis A. Mathias², Lucila F. Chaves³, Anne A. Chen⁴, Raul J. S. Girio²
e Walter Valério Neto⁵

ABSTRACT.- Mathias, L.A., Chaves, L.F., Chen, A.A., Girio, R.J.S. & Valério Neto, W. 2001. [Evolution of serological antibody titres by the plate agglutination, rose Bengal and complement fixation tests in Nelore heifers (*Bos indicus*) vaccinated at 18 months of age with *Brucella abortus* strain 19] Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B 19. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 21(4):139-142. Depto Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil.

One hundred and eight Nelore heifers (*Bos indicus*) about 18 months of age were vaccinated with a standard dosage (60-120 x 10⁹ viable organisms) of *Brucella abortus* strain 19 vaccine, aiming at to study the persistence of serological antibody titres by the plate agglutination, rose Bengal and complement fixation tests. Serum samples were collected just before vaccination and after 45 days, 6, 12 and 18 months. Before the vaccination, all the heifers showed negative results by the three tests. After 45 days, all the heifers had titres higher than or equal to 1/100 by the plate agglutination test and all of them showed positive results by the rose Bengal plate test, while 2 animals had titre 1/2 and 106 animals had titres higher than or equal to 1/4 by the complement fixation test. One year after the vaccination, most of the heifers did not show significant serological antibody titres.

Considering the risk to which animals in endemic areas and infected herds are subjected, and considering the clear reduction of the serological antibody titres shown by most of the vaccinated heifers, one may assume that, in case of Nelore heifers in endemic areas and that were not vaccinated between 3 and 8 months of age, it would be more reasonable to vaccinate them at 18 months of age than to expose them to a high risk of *Brucella* infection.

INDEX TERMS: Bovine brucellosis, strain 19 vaccine, serological response.

RESUMO.- Com o objetivo de estudar a persistência da resposta sorológica, através das provas de soroaglutinação em placa, rosa Bengala e fixação de complemento, 108 bezerras, com idade ao redor de 18 meses, foram vacinadas com uma

dose padrão da vacina preparada com *Brucella abortus* amostra B 19. Foram obtidas amostras de soro sanguíneo antes da vacinação e após 45 dias, 6, 12 e 18 meses. Antes da vacinação, todas as bezerras apresentaram resultados negativos nos três testes. Após 45 dias, todas apresentaram título a partir de 1/100 na prova de soroaglutinação em placa e todas apresentaram resultado positivo no teste rosa Bengala, ao passo que dois animais apresentaram título 1/2 e os demais apresentaram título a partir de 1/4 na reação de fixação de complemento. Após um ano de vacinação, a grande maioria das bezerras já não apresentava título sorológico significativo. Considerando o risco a que estão sujeitos animais que vivem em áreas endêmicas e em propriedades onde a doença ocorre, e considerando a acentuada redução de título sorológico

¹ Aceito para publicação em 15 de fevereiro de 2001.

² Depto Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal, Rod. Prof. Paulo Donato Castelane Km 5, Jaboticabal, SP 14884-900.

³ Aluna do Curso de Medicina Veterinária da FCAV-Unesp, Jaboticabal, SP e bolsista de Iniciação Científica da FAPESP.

⁴ Aluna do Curso de Medicina Veterinária da FCAV-Unesp, Jaboticabal, SP e bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

⁵ Médico Veterinário Autônomo.

observada na grande maioria dos animais, pode-se concluir que, no caso bezerras de raças zebuínas em áreas endêmicas e que não tenham sido vacinadas na idade regulamentar, é mais vantajoso vaciná-las com a amostra B 19 aos 18 meses de idade do que deixá-las expostas a um elevado risco de infecção por *Brucella*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose bovina, vacina B 19, resposta sorológica.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma importante enfermidade infecciosa que, a despeito dos esforços voltados para o seu controle, ainda constitui um problema sanitário dos mais sérios para os rebanhos bovinos de diversos países, entre os quais o Brasil está incluído. Os programas que têm obtido sucesso no combate a essa enfermidade baseiam-se principalmente em provas sorológicas com eliminação dos animais reagentes e na vacinação. Sendo o diagnóstico um instrumento que serve de base para esses programas, é fundamental que se disponha de testes que possam fornecer um diagnóstico seguro da enfermidade. Por outro lado, a vacinação, que é outra medida dos programas de combate à doença, quando feita com a amostra B 19 de *Brucella abortus*, induz o surgimento de títulos de anticorpos que podem dificultar o diagnóstico (Redman et al. 1967, Nielsen et al. 1989, Ribeiro et al. 1997).

É importante considerar que, em áreas de prevalência elevada e com menores recursos para a eliminação dos animais reagentes, a vacinação é medida indispensável, em que pese a eventual interferência sobre os resultados dos testes de diagnóstico. O aprimoramento dos testes sorológicos visando aprofundar o conhecimento da interferência da resposta vacinal sobre eles vem sendo o objetivo de um grande número de trabalhos científicos desenvolvidos em todo o mundo (Diaz et al. 1979, Cherwonogrodzky & Nielsen 1988, Chin et al. 1989, Nielsen et al. 1989, Mathias et al. 1994, Nielsen et al. 1995, Nielsen et al. 1996). Dos testes sorológicos convencionais, a reação de fixação de complemento geralmente apresenta maior capacidade de discriminação do que os testes de aglutinação (Nicoletti et al. 1978).

Entre as estratégias estudadas para reduzir esse problema, pode-se mencionar a restrição da faixa etária dos animais a serem vacinados. Redman et al. (1967) mostraram que bezerras vacinadas aos 2 ou 3 meses de idade desenvolvem resistência similar a bezerras vacinadas entre 4 e 8 meses, mas a resposta sorológica é menor, havendo, portanto, menor interferência com o diagnóstico. A vacinação das bezerras de 3 a 8 meses, para a grande maioria dos animais, permite que a reação vacinal praticamente desapareça antes de um ano (Ribeiro et al. 1997).

Embora seja conhecida a importância de se vacinar as bezerras ainda jovens, muitas vezes, por motivos diversos, não é possível realizar esse procedimento, principalmente em situações em que o proprietário adquire as bezerras em idade acima daquela recomendada para a vacinação, ficando, nessas circunstâncias, os animais expostos a elevado risco de contrair a enfermidade.

Os objetivos deste trabalho são estudar a persistência da resposta sorológica, através da prova de soroaglutinação em placa, do antígeno acidificado tamponado e da reação de fixação de complemento, em bezerras da raça Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com dose padrão da vacina preparada com *Brucella abortus* amostra B 19 e verificar, sob o ponto de vista da interferência com o diagnóstico sorológico, a vantagem ou desvantagem de vacinar bezerras nessa faixa etária.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 108 bezerras, da raça Nelore, com idade ao redor de 18 meses, mantidas sob condições de pasto.

Vacinação

As bezerras receberam, por via subcutânea, uma dose padrão, ou seja, 2 ml, contendo $60-120 \times 10^9$ bactérias viáveis, da vacina viva preparada com *Brucella abortus* amostra B 19.

Colheita das amostras

Foram colhidas amostras de sangue de todas as bezerras, imediatamente antes da vacinação, e após 45 dias, 6, 12 e 18 meses. O sangue foi obtido por punção da jugular. Após a retração do coágulo, o soro foi separado e mantido a -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

Testes sorológicos

Todos os soros sanguíneos foram submetidos aos testes sorológicos que seguem.

Prova de soroaglutinação em placa (SAP). Essa prova foi realizada conforme a técnica rotineiramente empregada no diagnóstico sorológico da brucelose animal (Centro Panamericano de Zoonosis 1968), usando-se antígeno padrão preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná.

Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT). Foi utilizada a técnica recomendada por Alton et al. (1988), empregando-se antígeno preparado com *B. abortus* amostra 1119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná.

Reação de fixação de complemento (RFC). Foi usada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por Alton et al. (1988), com antígeno preparado com *B. abortus* amostra 1119/3 para a prova de soroaglutinação em tubos, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná.

Análise estatística

Para verificar a dependência entre as frequências reveladas pelas provas sorológicas foi utilizado o teste de qui-quadrado de McNemar (Jekel et al. 1999). Foram comparados os resultados de cada teste entre as diferentes colheitas e, em cada colheita, os resultados dos diferentes testes. Para essa análise, considerou-se como positivo na prova de soroaglutinação em placa o título igual ou superior a 100 e na reação de fixação de complemento, o título igual ou superior a 4.

RESULTADOS

Antes da vacinação, todas as bezerras apresentaram resultados negativos no três testes, embora oito animais tenham apresentado título 25. Após 45 dias da aplicação da vacina, todas as bezerras apresentaram título igual ou superior a 100 na SAP, sendo que aos 12 meses apenas 1,85% e

após 18 meses apenas 0,92% dos animais apresentavam esse título (Quadro 1). A análise estatística revelou diferença significativa entre os resultados obtidos antes da vacinação e os resultados revelados pela SAP após 45 dias ($P < 0,01$), e também entre os resultados obtidos após 45 dias e aqueles observados após 6, 12 e 18 meses de vacinação ($P < 0,01$); Após 6 meses, a frequência de animais com títulos a partir de 100 não diferiu significativamente da frequência observada antes da vacinação ($P > 0,05$).

Quadro 1. Número e porcentagem de bezerras, de acordo com o título obtido na prova de soroglutinação em placa (SAP) e o tempo após a vacinação com *Brucella abortus* amostra B 19

Título SAP	Meses após a vacinação									
	Zero		1,5		6		12		18	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
-	100	92,59	0	0,00	0	0,00	2	1,85	23	21,30
25	8	7,41	0	0,00	46	42,59	58	53,70	63	58,33
50	0	0,00	0	0,00	58	53,70	46	42,59	21	19,44
100	0	0,00	60	55,56	4	3,70	2	1,85	1	0,92
200	0	0,00	44	40,74	0	0,00	0	0,00	0	0,00
400	0	0,00	4	3,70	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Total	108	100,00	108	100,00	108	100,00	108	100,00	108	100,00

Da mesma forma, no teste AAT todas as bezerras apresentaram resultado negativo antes da vacinação e todas apresentavam resultado positivo após 45 dias. Aos 6, 12 e 18 meses após a vacinação, 19,44%, 10,19% e 8,33%, respectivamente, apresentaram resultado positivo nesse teste (Quadro 2). A diferença entre as frequências de positivos observadas nas diversas colheitas foi significativa, exceto quando foram comparados os resultados obtidos após 12 e 18 meses ($P > 0,05$).

Quadro 2. Número e porcentagem de bezerras, de acordo com o resultado obtido no teste antígeno acidificado tamponado (AAT) e o tempo após a vacinação com *Brucella abortus* amostra B 19

AAT	Meses após a vacinação									
	Zero		1,5		6		12		18	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negat.	108	100,00	0	0,00	87	80,56	97	89,81	99	91,67
Posit.	0	0,00	108	100,00	21	19,44	11	10,19	9	8,33
Total	108	100,00	108	100,00	108	100,00	108	100,00	100	100,00

Na RFC também todos os animais apresentaram resultado negativo antes da vacinação. Após 45 dias, todos os animais apresentaram algum título, embora dois animais (1,85%) tenham apresentado título insignificante (2). Após 6, 12 e 18 meses da vacinação, 25,92%, 5,56% e 2,78% respectivamente das bezerras apresentaram título igual ou superior a 4 (Quadro 3). O teste de X^2 revelou não haver diferença significativa entre os resultados observados antes da vacinação e aqueles obtidos após 18 meses ($P > 0,05$).

Comparando-se as frequências de positivos entre os três testes constata-se que não houve diferença significativa an-

Quadro 3. Número e porcentagem de bezerras, de acordo com o título obtido na reação de fixação de complemento (RFC) e o tempo após a vacinação com *Brucella abortus* amostra B 19

Título RFC	Meses após a vacinação									
	Zero		1,5		6		12		18	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
-	108	100,00	0	0,00	67	62,04	100	92,59	102	94,44
2	0	0,00	2	1,85	13	12,04	2	1,85	3	2,78
4	0	0,00	7	6,48	17	15,74	4	3,70	3	2,78
8	0	0,00	22	20,37	7	6,48	2	1,85	0	0,00
16	0	0,00	51	47,22	3	2,78	0	0,00	0	0,00
32	0	0,00	19	17,59	1	0,93	0	0,00	0	0,00
64	0	0,00	6	5,56	0	0,00	0	0,00	0	0,00
128	0	0,00	1	0,93	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Total	108	100,00	108	100,00	108	100,00	108	100,00	108	100,00

tes da vacinação, quando todos os resultados foram negativos, e após 45 dias, quando a grande maioria dos resultados dos três testes foi positiva. Seis meses após a vacinação não houve diferença significativa entre os resultados do AAT e da RFC ($P > 0,05$), enquanto que as outras comparações revelaram diferenças significativas. Após 12 meses de vacinação, a diferença entre os resultados da SAP e do AAT foi considerada significativa ($P < 0,01$), e as diferenças entre a SAP e a RFC e entre o AAT e a RFC foram consideradas não-significativas ($P > 0,05$). Aos 18 meses de vacinação, observou-se diferença significativa entre a SAP e o AAT, e entre o AAT e a RFC ($P < 0,05$), sendo que a diferença entre a SAP e a RFC foi considerada não-significativa ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

A vacinação contra a brucelose é uma medida profilática essencial, mormente em áreas onde a doença é endêmica. Para minimizar os efeitos de títulos sorológicos resultantes da vacinação, e a conseqüente interferência nos testes de diagnóstico, as fêmeas bovinas devem ser vacinadas ainda jovens (Redman et al. 1967). No Brasil, a legislação recomenda vacinação entre 3 e 8 meses de idade. Ribeiro et al. (1997) observaram que bezerras vacinadas nessa faixa etária já não apresentavam títulos sorológicos positivos na SAP após 273 dias de vacinação e todas se apresentavam negativas no teste AAT após 308 dias.

Os dados do presente trabalho mostram que bezerras da raça Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com uma dose padrão de vacina B 19 apresentaram sensível redução no título sorológico após 12 e mesmo após 6 meses de vacinação. Um aspecto interessante a ser observado é que após 6, 12 e 18 meses de vacinação a SAP comparada com outros testes apresentou menor proporção de reagentes, considerando-se como positivos os títulos iguais ou superiores a 100. Esse resultado está associado principalmente ao fato de terem sido considerados como positivos apenas os títulos a partir de 100.

A RFC, por sua vez, apresentou menor proporção de resultados positivos do que o teste AAT já a partir dos 45 dias de vacinação. Nicoletti et al. (1978), vacinando fêmeas bovi-

nas adultas com dose padrão e com dose reduzida da vacina B19, também observaram que após 6 meses a RFC apresentou menor proporção de positivos que o "card test", equivalente ao AAT.

Os resultados mostraram também que, dentre as provas estudadas, a RFC apresentou-se a mais indicada como teste confirmatório no caso de bezerras vacinadas aos 18 meses de idade, pois após 18 meses de vacinação, apenas 3 animais ainda apresentavam título, sendo que esse título era de apenas 4. Em comparação com a SAP, em que pese esse teste ter apresentado menor proporção de positivos, com título a partir de 100, deve-se considerar que os títulos 50 geralmente causam bastante preocupação na interpretação dos resultados dessa prova.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que, após um ano de vacinação, a grande maioria das bezerras vacinadas aos 18 meses de idade já não apresenta título sorológico significativo, mesmo na prova de soroaglutinação em placa. Considerando o risco que correm animais que vivem em áreas endêmicas e em propriedades onde a doença já foi observada, e considerando a redução do título sorológico observado na grande maioria dos animais, pode-se afirmar que, para rebanhos comerciais, é mais vantajoso vacinar as bezerras aos 18 meses do que deixá-las sujeitas a um elevado risco de infecção.

REFERÊNCIAS

- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 190 p.
- Centro Panamericano de Zoonosis 1968. Técnicas e interpretación de las pruebas de sero-aglutinacion para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejia. 9 p. (Nota Técnica n. 2, rev. 1).
- Cherwonogrodzky J.W. & Nielsen K.H. 1988. *Brucella abortus* 1119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19-vaccinated and field-strain-infected cattle by agar gel immunodiffusion. J. Clin. Microbiol. 26(6):1120-1123.
- Chin J., Daniels J. & Bundesen P. 1989. Bovine brucellosis: evaluation of field sera by a competitive and superimposable ELISA utilising a monoclonal antibody against *Brucella abortus* lipopolysaccharide. Vet. Immunol. Immunopathol. 20:109-118.
- Diaz R., Garatea P., Jones L. M. & Moriyo I. 1979. Radial immunodiffusion test with *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating vaccinated from infected cattle. J. Clin. Microbiol. 10:37.
- Jekel J.F., Elmore J.G. & Katz D.L. 1999. Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva. Artmed, Porto Alegre. 328 p.
- Mathias L.A., Macmillan A.P., Greiser-Wilke I. & Moennig V. 1994. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo na diferenciação de anticorpos induzidos pela vacina B 19, no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Pesq. Vet. Bras. 14(1):19-23.
- Nicoletti P., Jones L.M. & Berman D.T. 1978. Adult vaccination with standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in a dairy herd infected with brucellosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173(11):1445-1449.
- Nielsen K., Cherwonogrodzky J.W., Duncan J.R. & Bundle D.R. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. Am. J. Vet. Res. 50(1):5-9.
- Nielsen K.H., Kelly L., Gall D., Nicoletti P. & Kelly W. 1995. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 46:285-291.
- Nielsen K. H., Kelly L., Gall D., Balsevicius S., Bosse J., Nicoletti P. & Kelly W. 1996. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. Prev. Vet. Med. 26:17-32.
- Redman D.R., Deyoe B.L. & King N.B. 1967. Resistance of cattle to *Brucella abortus* following vaccination at two and three months of age. J. Am. Vet. Med. Assoc. 150: 403-407.
- Ribeiro M.G., Spago N., Fava N., Ratti Jr. J. & Megid J. 1997. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 49(2): 137-150.