

COMPARAÇÃO DE CINCO PROVAS SOROLÓGICAS NO DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA EM ANIMAIS VACINADOS COM A CEPA B₁₉*

Comparison of Five Serologic Tests to the Brucellosis Bovine Diagnosis in Animals Vaccinated with Strain B₁₉

Maristela Lovato Flores**, Pedro Rui Rodrigues**, Erni Rodrigues**, Iolanda Baptistela Rubin** e Wladimir Silveira Moreira***

RESUMO

Com o objetivo de diferenciar os problemas advindos dos títulos pós-vacinais, inespecíficos ou de doença crônica, daqueles indicadores de infecção ativa, foi estudado, em quatro situações diferentes, cinco provas sorológicas utilizadas no diagnóstico da Brucelose bovina.

Trabalhou-se com 67 novilhas e 688 vacas e como provas sorológicas foram usadas a Rápida em Placa, Lenta em Tubo, Antígeno Acidificado Modificado, Mercaptoetanol e "Card Test". As provas complementares foram as que apresentaram maior validade para o diagnóstico da Brucelose Bovina.

SUMMARY

The objective of this experiment was to differentiate post-vaccination titers due to nonspecific or chronic disease from those due to active infection.

Five serological tests were used on the diagnosis of Bovine Brucellosis under four different conditions.

Sixty-seven heifers and 688 cows were used. The serological testes compared were: plate test, tube test, acidified plate antigen, mercaptoethanol and test card. The complementary tests showed to be more suitable for diagnosing Bovine Brucellosis.

INTRODUÇÃO

A vacina Cepa B₁₉ é de custo reduzido, já que se aplica uma só vez na vida animal, e tem proporcionado grandes vantagens na luta contra a brucelose bovina.

O grande inconveniente da Cepa B₁₉ é a reação sorológica que origina e

* Trabalho realizado com Bolsa Trabalho/Pesquisa da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria. 97100 - Santa Maria, RS, Brasil.

** Acadêmicos de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

*** Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Orientador.

em animais adultos pode perdurar por um tempo indeterminado. Devido a esta prolongada persistência do título aglutinante em certa percentagem de animais vacinados, embora na idade jovem, não é estranho que muitos investigadores tenham concentrado sua atenção na elaboração de métodos com os quais se possam diferenciar as reações devidas a infecção, daquelas originárias da vacinação (15).

A vacinação da terneira com a Cepa B₁₉ vem acompanhada, ao cabo de uns cinco dias, do aparecimento das IgM, que alcançam sua máxima proporção por meados do 13º dia, ainda que as IgG aparecem quase que simultaneamente, ou algo mais tarde, e alcançam seu máximo de 28 a 42 dias depois da vacinação. A concentração sérica das IgM diminuem depois, mas sem se anular; as IgG são as primeiras a desaparecer e por completo.

Tanto no homem como nos animais, a infecção natural vem seguida do aparecimento simultâneo de IgM e IgG, sendo que esta última poderá aparecer um pouco mais tarde, mas, contrariamente do que sucede depois da vacinação, diminui unicamente a concentração das IgM; depois, sobretudo nos casos crônicos, a classe principal, e muitas vezes única, é a IgG (6).

As provas de aglutinação rápida e lenta detectam tanto as IgM como as IgG, não permitindo diferenciar aglutininas persistentes das inespecíficas, bem como, das de infecção ativa (1).

A prova do Mercaptoetanol inativa as macroglobulinas do grupo 19S (IgM) porém, as microglobulinas 7S (IgG) são resistentes (9).

Para ALTON et alii (1), convém interpretar os títulos obtidos na prova de Mercaptoetanol com relação as provas comuns de aglutinação.

A prova com o uso do antígeno corado pelo Rosa de Bengala ("Card Test") deve sua especificidade de aglutinação ao pH do meio de suspensão (7).

A prova com Antígeno Acidificado Modificado, ã semelhança do "Card Test" está baseada na sensibilidade das IgM inespecíficas ou persistentes, aos ácidos com um pH inferior a 4,0 (9).

Muitas vezes, profissionais deparam-se com problemas de animais reacionantes às provas de aglutinação rápida e lenta, vacinados com a idade de 3 a 8 meses e com idade superior a 30 meses, já sendo necessário o atestado negativo de brucelose para sua comercialização quando destinados à reprodução, dificultando a interpretação dos resultados.

Por estes motivos elaborou-se o presente estudo com o objetivo de diferenciar os problemas advindos dos títulos pós-vacinais, inespecíficos ou de doença crônica daqueles indicadores da infecção ativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Trabalhou-se com uma amostragem de bovinos fêmeas, todas vacinadas com a Cepa B₁₉, na idade de 3 a 8 meses, divididos em 4 grupos de acordo com a idade:

- 20 novilhas de 1,5 anos, denominadas lote A
- 22 novilhas de 2,5 anos, denominadas lote B

- 25 novilhas de 3,5 anos, denominadas lote C
- 688 vacas de 4 a 9 anos, denominadas lote D

Colheu-se sangue por punção de jugular, deixou-se em repouso para uma perfeita coagulação e levou-se ao laboratório. Separou-se o soro e conservou-se no congelador a -20°C até a realização final das provas.

Como provas sorológicas foram usadas as de: Rápida em Placa, Lenta em Tubo, Antígeno Acidificado Modificado, Redução por Mercaptoetanol e "Card Test", realizadas e interpretadas de acordo com o CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS (4,5), ALTON et alii (1) e BRASIL (2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos acham-se nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

TABELA 1. Interpretação das cinco provas sorológicas realizadas com 20 amostras de soro de novilhas de 1,5 anos de idade vacinadas com 3 a 8 meses com a Cepa B₁₉.

Provas	Interpretação				Total
	Negativa		(a) Significativa		
	Nº	%	Nº	%	
Placa	18	90,00	2	10,00	20
Tubos	18	90,00	2	10,00	20
Antígeno Acidificado	19	95,00	1	5,00	20
Mercaptoetanol	19	95,00	1	5,00	20
"Card Test"	19	95,00	1	5,00	20

(a) Interpretação significativa: Aglutinação em Placa e Tubos 1:100 UI ou superior; Antígeno Acidificado e Mercaptoetanol 1:25 UI ou superior; "Card Test" positivo.

Observa-se que 10% dos animais apresentaram títulos significativos às provas Rápida em Placa e Lenta em Tubo e 5% às três últimas. Pode-se atribuir a persistência das IgG nos 5% reacionantes as provas de Antígeno Acidificado, redução por Mercaptoetanol e "Card Test" pois, MOREIRA et alii (13) afirmaram que são necessários 11 meses após a vacinação para o desaparecimento destas imunoglobulinas.

TABELA 2. Interpretação das cinco provas sorológicas realizadas com 22 amostras de soro de novilhas de 2,5 anos de idade vacinadas com 3 a 8 meses com a Cepa B₁₉.

Provas	Interpretação				Total
	Negativa		(a) Significativa		
	Nº	%	Nº	%	
Placa	21	95,45	1	4,54	22
Tubos	21	95,45	1	4,54	22
Antígeno Acidificado	22	100,00	0	0,00	22
Mercaptoetanol	22	100,00	0	0,00	22
"Card Test"	22	100,00	0	0,00	22

(a) Interpretação significativa: Aglutinação em Placa e Tubos 1:100 UI ou superior; Antígeno Acidificado e Mercaptoetanol 1:25 UI ou superior; "Card Test" positivo.

Apenas 4,54% reagiram às duas primeiras provas e nenhum animal para as três últimas. Para OLASCOAGA (14) as Provas Rápidas em Placa e Lenta em Tubo indicam tanto a presença dos IgM como dos IgG e as provas complementares somente a presença das IgG e aquelas persistem por um tempo maior.

TABELA 3. Interpretação das cinco provas sorológicas realizadas com 25 amostras de soro de novilhas de 3,5 anos de idade vacinadas com 3 a 8 meses com a Cepa B₁₉.

Provas	Interpretação				Total
	Negativa		(a) Significativa		
	Nº	%	Nº	%	
Placa	23	92,00	2	8,00	25
Tubos	23	92,00	2	8,00	25
Antígeno Acidificado	24	96,00	1	4,00	25
Mercaptoetanol	23	92,00	2	8,00	25
"Card Test"	23	92,00	2	8,00	25

(a) Interpretação significativa: Aglutinação em Placas e Tubo 1:100 UI ou superior; Antígeno Acidificado e Mercaptoetanol 1:25 UI ou superior; "Card Test" positivo.

De acordo com esta Tabela, 8% aglutinaram positivamente às provas rápidas em Placa, Lenta em Tubo, Redução por Mercaptoetanol e "Card Test", porém o Antígeno Acidificado foi de 4%. SZYFRES (15) afirmou que animais vacinados podem

infectar-se e constituir-se em fonte de infecção que deixam mascarados ao abrigo de um título supostamente residual da vacina. Não houve coincidência da prova do Antígeno Acidificado Modificado com as demais. O mecanismo de ação desta prova é inibição das IgM e não por inativação ou destruição (10).

Nem sempre há uma concordância de 100% entre as diversas provas, conforme demonstrou DAVIES (8) num total de 22.162 soros examinados pelo "Card Test", Prova Lenta em Tubo e Fixação do Complemento, pois a coincidência destas com aquela foi 97,1%. Outros autores como JOSEPH & MARTIN (10), LAMBERT & AMERAULT (11) afirmaram que a prova do Antígeno Acidificado pode ser usada como prova complementar para distinguir reações específicas de não específicas.

TABELA 4. Interpretação das cinco provas sorológicas realizadas com soro em 688 bovinos fêmeas adultas vacinadas com a Cepa B₁₉.

Provas	Interpretação				Total
	Negativa		(a) Significativa		
	Nº	%	Nº	%	
Placa	672	97,68	16	2,32	688
Tubos	670	97,39	18	2,61	688
Antígeno Acidificado	669	97,24	19	2,76	688
Mercaptoetanol	669	97,24	19	2,76	688
"Card Test"	669	97,24	19	2,76	688

(a) Interpretação significativa: Aglutinação em Placa e Tubos 1:100 UI ou superior; Antígeno Acidificado e Marcaptoetanol 1:25 UI ou superior; "Card Test" positivo.

Das 688 amostras coletadas de fêmeas ocorreu uma maior porcentagem de animais reacionantes positivos às provas complementares. Para BRINLEY-MORGAN (3), as provas de rotina (Rápida e Lenta) podem ser negativas nas infecções crônicas, pelo motivo de em certos casos estar somente as IgG₁ e estas não são detectadas por tais provas.

O COMITÊ MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EM BRUCELOSE (6) recomendou que todo o animal reacionante às provas Rápidas em Placa e Lenta em Tubo, deverá submeter-se a provas complementares por serem mais específicos.

Por outro lado MEYER (12) isolou *Brucela abortus*, Cepa B₁₉ de animais vacinados contra a brucelose quando jovens, demonstrando com isso que em certos casos a vacinação pode levar a uma infecção ativa.

CONCLUSÃO

Face aos resultados obtidos, conclui-se pela validade das provas complementares para o diagnóstico da Brucelose bovina, principalmente naqueles casos

de títulos pós-vacinais, inespecíficos ou de infecção crônica.

LITERATURA CITADA

1. ALTON, G. G.; JONES, M. L. & PIETZ, D. E. *Las técnicas de laboratorio en la brucelosis*. 2 ed., Ginebra, FAO/OMS, 1976. 175 p.
2. BRASIL. Normas para a profilaxia da brucelose animal. Portaria nº 23/76 de 20 de janeiro de 1976. *Diário Oficial*, Brasil, 16/02/76 Seção 1, pt 1, p. 2266/69. Revogada as Portarias Ministeriais nºs 438 e 222 de 22 de abril de 1958 e 5 de março de 1959.
3. BRINLEY-MORGAN, W. J. The serological of bovine brucellosis. *Vet. Rec.*, 80: 612-620, 1967.
4. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. *Técnica e interpretación de soro aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina*. Ramos Mejia, 1968. 9 p. (Nota técnica nº 2, Rev. 1).
5. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. *Pruebas complementarias para el diagnóstico serológico de la brucelosis*. Ramos Mejia, 1972. 16 p. (Apostila-mi-meografada).
6. COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN BRUCELOSIS. 5ª ed., Ginebra. E. D. FAO/OMS, 1971. 100 p.
7. CORBEL, M. J. Mecanismo de la prueba con Rosa de Bengala para brucelosis bovina. *Bol. Zoonosis*, 15:294, 1973.
8. DAVIES, G. The rose bengal test. *Vet. Rec.*, 88:447-449, 1971.
9. GARCIA-CARRILLO, C. Metodos para el diagnóstico de la brucelosis. *Gac. Vet.* 246:661-667, 1970.
10. JOSEPH, E. R. & MARTIN, H. R. An acidified antigen for detection of non-specific reactions in the plate-agglutination test for bovine brucellosis. *Amer. J. Vet. Res.*, 22:550-555, 1961.
11. LAMBERT, G. & AMERAULT, T. E. An evaluation of acidified plate test antigens for detecting bovine brucellosis. *Amer. J. Vet. Res.*, 23:1031-1034, 1962.
12. MEYER, M. E. Se aislo *Brucella abortus* cepa 19 de bovinos imunizados. *Bol. Zoonosis*, 10:5-7, 1968.
13. MOREIRA, W. S.; RUBINI, M. I. B.; LOVATO, M. F.; RODRIGUES, P. R. & RODRIGUES, E. Persistência, no sangue de bezerras, das IgG (Microglobulinas) formadas após a vacinação contra a brucelose com Cepa B₁₉. *Rev. Centro de Ciências Rurais*, 10:381-386, 1980.
14. OLASCOAGA, C. R. Diagnostico de la brucelosis. *Bol. Zoonosis*, 18:107-141, 1976.
15. SZYFRES, B. Vacunas en el control de la brucelosis. *Gac. Vet.*, 26:1-32, 1964.