

## Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado<sup>1</sup>

### *Comparison of indirect ELISA in brucellosis diagnosis in vaccinated and non-vaccinated bovine herd*

Gustavo Coelho Jardim<sup>2</sup>, Pedro Paulo Pires<sup>3</sup>, Luis Antonio Mathias<sup>4</sup>,  
Márcio Rubens Graf Kuchembuck<sup>5</sup>

---

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Botucatu.

<sup>2</sup> Curso de Medicina Veterinária, Universidade Anhanguera – Uniderp, Rua Alexandre Herculano, 1400, CEP 79037-280, Campo Grande, MS.

E-mail: gustavocjdim@hotmail.com

<sup>3</sup> Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Corte).

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Campus de Jaboticabal.

<sup>5</sup> Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu.

---

Recebido: 26/10/2009

Aceito: 18/02/2010

**Resumo.** Com o objetivo de avaliar a eficiência de um ELISA indireto, este foi comparado às técnicas de diagnóstico sorológico da brucelose: fixação de complemento (FC), antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta em tubos (2-ME), preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, em rebanhos de bovinos adultos. Foram divididos dois grupos: 207 fêmeas não vacinadas (G1) e 96 vacinadas com a dose padrão da vacina produzida com a amostra B19 de *Brucella abortus* (G2). O ELISA alcançou especificidade relativa (ER) de 81% no G1 e de 16,8% no G2 e sensibilidade relativa (SR) de 100% no G1 e no G2. Foi considerada como padrão a prova de FC. Resultados das outras técnicas: AAT (ER de 95,5% em G1 e de 98,9% em G2; SE de 100% em G1 e em G2); 2-ME (ER de 94% em G1 e de 94,7% em G2; SE de 100% em G1 e em G2). O ELISA indireto pode ser usado na triagem de rebanhos, mas não apresenta vantagens sobre o AAT para tal finalidade. Seu uso como técnica de diagnóstico confirmatório requer mais estudos.

**Palavras-chave:** imunodiagnóstico, vacinação, amostra B19

**Abstract.** An indirect ELISA was evaluated in adult bovine herds, in comparison with Animal Brucellosis Control and Eradication Brazilian Program serological diagnosis techniques: complement fixation (CF), rose bengal (RB) and mercaptoethanol with standard agglutination test (ME). Two groups were used in: 207 non-vaccinated (NV), and 96 vaccinated with standard dose of the *Brucella abortus* strain 19 vaccine females

(G2). ELISA reached 81% as relative specificity (SP) in G1 and 16.8% in G2, and 100% as relative sensitivity (SE) in G1 and in G2. CF was taken as standard technique in this research. Other results: RB (95.5% SP in G1 and 98.9% in G2; 100% SE in G1 and in G2); ME (94% SP in G1 and 94.7% in G2; 100% SE in G1 and in G2). Indirect ELISA's use as screening test can be done, wherever, RB is better for this purpose. Its use as a final diagnostic technique needs better evaluation.

**Key-words:** immunodiagnosis, vaccination, strain B19

## Introdução

Brucelose, doença de distribuição mundial, exceto nos países que a erradicaram por meio de trabalho sistemático (MOLNÁR et al., 1997), apresenta grande importância devido à diminuição na produção animal e à repercussão da infecção sobre a saúde humana, constituindo-se, desta forma, em barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal. O aborto representa grande prejuízo em rebanhos de corte com média de prevalência da doença entre 5% e 10%, porque o bezerro é a única renda (KUCHEMUCK, 1997). É estimada uma prevalência de 4 a 5% no Território Nacional (BRASIL, 2009).

O controle da brucelose depende, fundamentalmente, da identificação e separação dos animais positivos e suspeitos, daqueles não infectados, baseando-se na disponibilidade dos métodos de diagnóstico (MOLNÁR et al., 2000). Os métodos sorológicos convencionais têm o inconveniente apresentarem baixa especificidade e não diferenciar animais vacinados com cepa B19 daqueles infectados com cepa de campo. Nos últimos anos, novas técnicas sorológicas têm sido desenvolvidas buscando superar os inconvenientes das provas convencionais (SAMARTINO et al., 2000).

Por meio da Instrução Normativa Nº2 de 10 de janeiro de 2001, o Secretário de Defesa Agropecuária do MAPA (Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil) aprovou o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). As propostas técnicas do programa preconizam a vacinação obrigatória das fêmeas da espécie bovina e bubalina, entre três a oito meses de idade, com vacina produzida com a amostra 19 de *Brucella abortus* (B19), e as utilizações de técnicas de diagnóstico que permitam identificar os animais infectados (BRASIL, 2001; BRASIL, 2009).

O PNCEBT preconiza a utilização de testes em série para o diagnóstico indireto da brucelose, estando reconhecidos como oficiais: a) Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), que é muito sensível e de fácil execução; b) Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) associado ao de soroaglutinação lenta em tubos (SAL), como confirmatório para os animais que reagirem ao teste anterior, por ser mais específico; c) Teste de fixação de complemento (FC), como teste conclusivo; e d) Teste do anel em leite que deverá ser utilizado para

monitoramento da condição sanitária de propriedades certificadas. Testes de acordo com as normatizações do Código Zoosanitário Internacional.

O MAPA pretende aperfeiçoar o padrão de diagnóstico, à medida que novos e melhores testes forem surgindo, serão integrados a gama de exames de acordo com a viabilidade técnica e custo-benefício ao produtor (BRASIL, 2003). Neste contexto, as técnicas de ensaio de imunoadsorção enzimática, a exemplo do ELISA indireto (ELISA ID), favorecem o reconhecimento dos anticorpos reacionais ao agente etiológico, quando bem padronizadas (MOLNÁR et al., 2002). O custo e a sensibilidade do teste favorecem sua aplicação em rebanhos.

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de comparar, usando como referência o FC, a eficiência dos testes imunológicos ELISA ID, AAT e 2-ME com SAL no diagnóstico da brucelose bovina, em rebanhos adultos com diferentes condições vacinais: a) não vacinados; e b) vacinados com dose padrão da vacina B19.

## Material e Métodos

O rebanho foi composto de 303 fêmeas cruzadas de Nelore, clinicamente sadias, com idade igual ou superior a 24 meses, divididas em 2 grupos. Os animais foram mantidos em piquetes de *Brachiaria brizantha*, recebendo água e sal mineral à vontade. Algumas fêmeas eram gestantes, não estando no último mês de gestação nem no primeiro mês pós-parto. O Grupo 1 (G1) foi composto de 207 animais não vacinados. O Grupo 2 (G2) foi composto de 96 animais vacinados, quando aos 3 a 8 meses de idade, com a vacina B19, conforme o Regulamento do PNCEBT (BRASIL, 2009).

Foram coletadas amostras de sangue dos animais através de punção da veia jugular externa com agulhas estéreis (40/20). Após a centrifugação a 1.500g durante 15 minutos, as amostras de soro foram submetidas às provas imunológicas.

As provas de SAL, 2-ME e AAT foram executadas segundo Madruga et al. (2001), respeitando as recomendações do PNCEBT, onde os resultados da 2-ME e da SAL são avaliados juntos (BRASIL, 2001; BRASIL, 2006).

Na reação de FC foi usada uma técnica de microfixação, com 50% de hemólise, segundo Alton et al. (1988) e Jardim et al. (2006). Na interpretação dos resultados foram considerados positivos os títulos iguais ou superiores a 1:4.

A técnica de ELISA ID foi realizada seguindo a metodologia descrita no kit ELISA brucelose<sup>1</sup>, com densidade ótica (DO) de 450 nanômetros. As médias das DOs dos controles positivo e negativo e as DOs de cada soro testado foram calculadas. O critério de validação da técnica utilizou um valor mínimo de 0,350 para a DO do controle positivo e a média entre a DO do controle positivo

<sup>1</sup> Kit ELISA brucelose, Institut Pourquier, Lote de partida 041.

e a DO do controle negativo com valor igual ou maior a 3. O percentual de positividade (S/P%) foi calculado pela fórmula:  $S/P\% = (DO \text{ da amostra teste} / DO \text{ do soro controle positivo}) \times 100$ . Considerou-se negativa a amostra com S/P% menor ou igual a 90%, suspeita a amostra com S/P% entre 90% e 100% e positiva a amostra com S/P% maior ou igual a 100%.

Para as provas de SAL e 2-ME foi usado antígeno padrão comercial<sup>2</sup>, na FC foi usado antígeno padrão produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo, e na AAT antígeno padrão comercial importado<sup>3</sup>.

A sensibilidade (S) e a especificidade (E) relativas das provas de AAT, SAL com 2-ME e ELISA ID foram calculadas em relação aos resultados obtidos na prova de FC, tida como referência por ser considerada prova confirmatória pelo PNCEBT. A FC é considerada prova de referência recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais (Brasil, 2003) e foi selecionada como referência para a comparação com as outras técnicas, pois, é bastante acurada e de alta especificidade. E, apresenta melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, e permite definir títulos sorológicos controversos pelas técnicas convencionais (NICOLETTI et al., 1978a; SAMARTINO et al., 2000; BRASIL, 2001; MOLNÁR et al., 2002). Os cálculos de sensibilidade e de especificidade relativas correspondem às fórmulas descritas por Sánches-Vizcaíno & Alvarez (1987) e por Madruga et al. (2001).

O teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ) foi utilizado para verificar se houve diferença estatística entre os resultados de sensibilidade e especificidade relativas das provas imunológicas utilizadas nos rebanhos do estudo, tomando como referência o FC (CENTENO, 2001).

## Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra a relação do número de indivíduos reagentes positivos e negativos diagnosticados pelas provas AAT, 2-ME com SAL, ELISA ID e FC do rebanho não vacinado e a tabela 2 do rebanho vacinado.

---

<sup>2</sup> Antígeno para diagnóstico da brucelose, prova lenta em tubo, TECPAR, Lote de partida 002/01.

<sup>3</sup> Antigène brucellique-Rose Bengale, Institut Pourquier, Lote de partida 278.

**Tabela 1.** Números de animais reagentes positivos (+) e negativos (-) nas provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL) e de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), associadas aos resultados na prova de fixação de complemento (FC), no rebanho não vacinado.

FC	AAT		2-ME com SAL		ELISA ID	
	+	-	+	-	+	-
+	7	9	7	12	7	38
-	0	191	0	188	0	162

**Tabela 2.** Números de animais reagentes positivos (+) e negativos (-) nas provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), de 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL) e de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), associadas aos resultados na prova de fixação de complemento (FC), no rebanho vacinado.

FC	AAT		2-ME com SAL		ELISA ID	
	+	-	+	-	+	-
+	1	0	1	0	1	0
-	1	94	5	90	79	16

A tabela 3 mostra o resultado dos cálculos das relações da E e da S das provas de AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID para a FC. Os métodos de diagnóstico do AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID apresentaram a mesma S em relação aos resultados obtidos pela reação de FC. As diferenças estatísticas das especificidades relativas estão demonstradas na tabela 4.

**Tabela 3.** Sensibilidade (S) e especificidade (E) relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL) e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho: não vacinado (NV) e vacinado (VC).

Método	NV		VC	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
AAT	100	95,5	100	98,9
2-ME com SAL	100	94	100	94,7
ELISA ID	100	81	100	16,8

**Tabela 4.** Análise estatística dos resultados das especificidades relativas dos métodos de diagnóstico de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) com soroaglutinação lenta (SAL), e ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA ID), calculados com base nos resultados do método de reação de fixação de complemento (FC), em rebanho não vacinado.

Método	Especificidade relativa (%) <sup>a</sup>
AAT	95,5 A
2-ME com SAL	94 A
ELISA ID	81 B

<sup>a</sup> Especificidades seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste  $X^2$  no nível de 5%.

No rebanho não vacinado contra a brucelose a prevalência da doença foi de 3,38%, estando abaixo da média nacional, que é de 4% a 5%, obtida de dados de notificações oficiais do período de 1988 a 1998 (BRASIL, 2009). As provas de AAT, SAL com 2-ME e ELISA ID, todas apresentaram sensibilidade de 100% em relação ao FC, porém, as especificidades relativas foram de 95,5% para o AAT, de 94% para o 2-ME com SAL, e de 81% para o ELISA ID.

Alguns trabalhos citam que o ELISA ID pode apresentar alta sensibilidade associada a uma especificidade de 100% no diagnóstico sorológico de enfermidades animais (BALDANI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Tais resultados não foram alcançados no presente trabalho. A especificidade das provas pelo teste  $X^2$  sugere que a técnica de ELISA ID estudada não deva ser utilizada como prova de diagnóstico confirmatório definitivo de brucelose em rebanho não vacinado, não controlado para a doença, pois a alta sensibilidade e a baixa especificidade relativas apresentadas favorecem o diagnóstico falso-positivo. Tal sugestão também pode ser lida no trabalho de Kerby et al. (1997) quanto a rebanho com status vacinal desconhecido.

As provas de AAT e SAL com 2-ME apresentaram resultados semelhantes, sendo que o AAT foi a que melhor se aproximou ao FC. Estes achados demonstram ser o AAT, dentre as técnicas estudadas, a prova mais equilibrada, levando em consideração os parâmetros de sensibilidade e especificidade relativas ao FC, e também a prova de eleição para triagem de rebanhos nestas condições, por se tratar de uma técnica barata, de fácil execução e de resultados rápidos. Resultados bastante semelhantes foram alcançados por Costa et al. (1999) que observaram concordância absoluta do AAT com o FC.

O teste ELISA ID estudado pode ser utilizado como prova de triagem em rebanho não vacinado, sobretudo em situação de futura fase de erradicação da doença, que requeira o uso de teste altamente sensível em rebanhos suspeitos de estarem infectados. Contudo, apresenta menor equilíbrio que AAT, é mais

complexa, não pode ser realizada em campo, e como sua aquisição fica sujeita a variações de câmbio de moedas estrangeiras, sua importação torna o processo mais oneroso para o programa e para os produtores. Sua baixa especificidade não o classifica como técnica para uso no diagnóstico confirmatório.

Em animais, com idade superior aos 24 meses, vacinados com a dose padrão da vacina B19 entre os três e oito meses de vida, as provas de AAT, 2-ME com SAL e ELISA ID apresentaram sensibilidade de 100% em relação ao FC, porém as especificidades relativas foram de 98,9% para o AAT, de 94,7 % para o SAL com 2-ME e de 16,8% para o ELISA ID. Neste rebanho, a prevalência da brucelose foi de 1,04%, também menor à média nacional de 4% a 5% (BRASIL, 2009).

Em situações reais, o verdadeiro estado sanitário do animal (infectado ou não) não é conhecido, mas sim o resultado do teste. A proporção de falsos-positivos é muito influenciada pela especificidade da prova usada, qualquer que seja a prevalência da doença. Em programa de erradicação, baseado em teste e sacrifício de animais, a proporção de indivíduos com reações falso-positivas que são sacrificados aumenta à medida que a campanha avança e a prevalência da enfermidade diminui. Para valores de prevalência muito baixos, mesmo um teste de boa especificidade (99%) resulta em alta proporção de resultados falso-positivos. Assim sendo, quando o diagnóstico é realizado em populações de baixa prevalência, deve ser usado um teste de especificidade próxima a 100%. Se não houver uma única técnica com essa característica, poderão ser usadas duas provas em sequência: a primeira de triagem, com boa sensibilidade, para detectar animais reagentes, os quais são submetidos a novo teste para diagnóstico confirmatório, que deve ter alta especificidade. A realização de técnicas em sequência, para o diagnóstico confirmatório dos indivíduos positivos em teste de triagem, aumenta a especificidade do procedimento diagnóstico e diminui o número de falsos-positivos (BRASIL, 2003; BRASIL, 2006).

A proporção de animais com resultado positivo que realmente estão infectados (valor preditivo positivo – VPP) e a proporção de animais com resultado negativo que não estão infectados (valor preditivo negativo – VPN) são determinados pelos valores de sensibilidade e especificidade de teste utilizado e pela prevalência da doença na população submetida ao diagnóstico, ou seja, variam em função da condição epidemiológica. Quando a prevalência da enfermidade é inferior a 10%, o VPN de um teste de sensibilidade apenas moderada (80%) é muito alto, e tende a aumentar na medida em que a prevalência da doença diminui. O VPP segue trajetória inversa, sendo muito baixo quando a prevalência é inferior a 10%, diminuindo na medida em que a prevalência da doença também diminui. Em consequência, em programa de erradicação, baseado em teste e sacrifício de animais, a proporção de indivíduos com reações falso-positivas que são sacrificados aumenta à medida que a campanha avança e a prevalência da enfermidade diminui. Portanto, na medida em que a prevalência

da doença diminui, cresce a necessidade de reduzir a proporção de reações falso-positivas, o que é conseguido por ganhos em especificidade dos métodos diagnósticos (BRASIL, 2003).

Na atual fase de controle da brucelose no Brasil, o uso do ELISA ID de rebanho vacinado com prevalência de aproximadamente 1%, aumentaria muito a necessidade de uso de provas confirmatórias para os resultados positivos do ELISA na triagem e aumentaria o sacrifício de animais falso-positivos como prova confirmatória. Pela alta sensibilidade, a técnica poderia favorecer a detecção de imunoglobulinas residuais da vacina B19.

Os resultados confirmam ser o AAT a prova sorológica mais equilibrada, dentre as preconizadas pelo PNCEBT, em relação ao FC, entretanto, o SAL com 2-ME também alcançaram resultados similares. Contudo, o AAT, além de seu baixo custo e fácil execução, apresenta menor risco à saúde do executor em comparação ao 2-ME, sendo preferível por estes motivos.

Sutherland (1985) já sugeriu que o ELISA ID fosse de pequena valia na detecção de animais infectados nos primeiros estágios de um programa de erradicação da doença, quando os bovinos geralmente são vacinados com o intuito de prevenir o aborto. Contudo, devido à alta sensibilidade demonstrada pelo ELISA em diversos estudos, quando comparado a métodos sorológicos convencionais, parece certo sugerir que seja utilizado em estágios avançados de um programa de erradicação, quando a vacinação cessar, sendo a técnica útil como teste de triagem ou suplementar para a identificação de animais suspeitos que falham em responder ao FC.

A presença de qualquer animal vacinado na população positiva reduz a especificidade do ELISA e resulta em reações falso-positivas. Esta situação se reforça quando os animais são vacinados em idade superior aos oito meses (KERBY et al., 1997). Neste trabalho a especificidade do ELISA foi menor no rebanho vacinado.

Em todos os rebanhos estudados, o SAL e o 2-ME não apresentaram vantagens no diagnóstico sobre os outros testes usados, preconizados pelo PNCEBT. Resultados semelhantes foram encontrados por Nicoletti et al. (1978b). Com base nos dados apresentados, é questionável o uso do 2-ME e SAL como prova confirmatória, frente às características apresentadas pelo AAT.

Um resultado negativo revelado pela FC, em um soro com títulos elevados nas provas imunoenzimáticas, poderia estar associado a um aumento na proporção de IgG2 em relação a IgG1, fato este que pode ocorrer por ocasião do parto, quando há diminuição na concentração de IgG1 no soro sanguíneo, pois estes anticorpos são transferidos para a secreção mamária, ou então devido a ciclicidade resultante dos mecanismos de controle da produção de anticorpos (MATHIAS et al., 1995). As vacas utilizadas no presente experimento, ou estavam vazias, com suas crias recém desmamadas, ou estavam prenhes com idade de gestação não superior a sete meses, em geral quatro meses. Portanto, a

idade gestacional e o período pós-parto não justificariam a ocorrência de resultados positivos no ELISA com resultados negativos na FC; o fenômeno pró-zona poderia justificar.

No presente trabalho não ocorreram resultados inconclusivos, o que é comum quando se avalia um diagnóstico baseado nos resultados de mais de uma prova em conjunto, como é o caso do 2-ME com SAL.

É muito difícil comparar a sensibilidade e especificidade de testes entre trabalhos realizados devido às diferenças dos procedimentos, reagentes e critérios de classificação (NICOLETTI & TANYA, 1993). O ‘complexo brucelose’ não é de fácil entendimento e, especialmente, de resolver. No Brasil pouco se conhece sobre a real situação desta zoonose, seus problemas e possibilidades de diagnóstico (MOLNÁR et al., 1997), pois da data em que o PNCEBT foi instituído até o momento, a prevalência e a distribuição regional ainda não foram bem caracterizadas; encontra-se em fase final estudo epidemiológico nacional da doença, com metodologia padronizada (BRASIL, 2009).

Para se avaliar melhor o uso da técnica de ELISA ID no PNCEBT, assim como de qualquer nova prova de diagnóstico sorológico para a brucelose, nesse estágio inicial do programa, mais estudos deveriam ser feitos em diferentes rebanhos e regiões, pois se sabe que diferentes regiões brasileiras adotam explorações da bovinocultura distintas (leite / carne; extensiva / intensiva), e consequentemente apresentam diferentes condições sanitárias e prevalências.

Samartino et al. (2000) citam que nas décadas de 1980/90 diversos países começaram a investigar e aplicar diferentes tipos de ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da brucelose animal, chegando a um kit de ELISA competitivo (C) que se diferenciou em cada país pelo valor de corte, adotado de acordo com a condição epidemiológica de cada um. Posteriormente, foi desenvolvida uma técnica de fluorescência polarizada, com sensibilidade e especificidade similares ao ELISA C, sendo que também foi adotado diferente valor de corte em cada país, de acordo com a situação epidemiológica.

Uma melhor padronização da técnica de ELISA ID usada, alterando o ponto de corte, poderia reverter os problemas encontrados no presente estudo quanto à falta de especificidade da técnica, o que poderia mudar o enfoque de sua utilização na atual situação sanitária em que o Brasil se encontra. O kit ELISA do presente estudo foi produzido na França; este país já se encontra em fase de erradicação da brucelose, diferente do Brasil que está no início do processo. Uma padronização do ELISA ID, visando um aumento da especificidade, poderia viabilizar seu uso como prova confirmatória. Sua produção no Brasil pode reduzir custos de importação, além de que uma mecanização pode reduzir o tempo de leitura e possíveis erros de origem humana na execução. O ELISA não apresenta os inconvenientes da 2-ME, de ser demorada e trabalhosa, e também não utiliza produto tóxico para a saúde humana, não apresenta os problemas da FC, que é muito complexa, onerosa, e passível a erros de execução.

## Conclusões

A prova de ELISA ID mostrou ser um teste passível de ser usado apenas na triagem de rebanho não vacinado, porém não apresentou condições adequadas para uso na triagem e no diagnóstico confirmatório da brucelose bovina em rebanho vacinado com a amostra B19. A técnica do antígeno acidificado tamponado demonstrou melhores condições para ser usada como prova de triagem, e maior e melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, relativas à Fixação de Complemento, em rebanho não vacinado e vacinado com a amostra B19.

## Agradecimentos

A Embrapa Gado de Corte pela Bolsa e pelo suporte laboratorial. A Fazenda Canaã (Campo Grande-MS) por disponibilizar animais, instalações e mão-de-obra para o projeto. As pesquisadoras da Iagro/MS MSc. Letícia Almeida Retumba Carneiro Monteiro e Dra. Rita de Cássia da Silva Paes e ao pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Dr. Cleber Oliveira Soares, pelo treinamento em técnicas de imunodiagnóstico. Aos co-autores deste por todo o apoio e suporte.

## Referências

- 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.
- BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; RASO, T.F.; PINTO, A.A. Serodiagnosis of *Babesia equi* in horses submitted to exercise stress. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.179-183, 2007.
- BRASIL 2001. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Depto Defesa Animal, Secr. Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília.
- BRASIL 2003. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT): versão preliminar**. Depto Defesa Animal, Secr. Defesa Agropecuária, Mininistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- BRASIL 2006. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Depto Defesa Animal, Secr. Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- BRASIL 2009. Programa Nacional de Controle da Brucelose e da Tuberculose Animal. Depto Defesa Animal, Secr. Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 fev. 2009.

- CENTENO, A.J. **Curso de estatística aplicado à Biologia**. 2. ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001. 234p.
- COSTA, G.M.; ABREU, V.L.V.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, J.A.; MARTINS, N.E. Avaliação do teste de imunodifusão mediante emprego do polissacarídeo "O" no diagnóstico da brucelose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.4, p.317-322, 1999.
- 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.26, n.3, p.177-182, 2006.
- KERBY, P.J.; QUIROGA, J.L.; MCGRANE, J.J.; STAGG, D.A. Field evaluation of an indirect ELISA for detection of brucellosis in lowland Bolivia. **Tropical Animal Health Production**, v.29, p.65-72, 1997.
- KUCHEMUCK, M.R.G. Brucelose. **Biológico**, v.59, n.1, p.33-35, 1997.
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- MATHIAS, L.A.; MACMILLAN, A.P.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, E.V. Comparação entre a reação de fixação de complemento, teste imunoenzimático indireto e teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos procedentes de rebanhos com histórico da enfermidade. **ARS Veterinária**, v.11, n.1, p.47-55, 1995.
- MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TÚRY, E.; SOUZA, J.S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, n.4, p.157-162, 1997.
- MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H.L.T.; SOUZA, J.S.; VALE, W.G. Ocorrência de brucelose bovina no Estado do Pará confirmada por métodos sorológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, n.3, p.117-121, 2000.
- MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.2, p.41-44, 2002.
- NICOLETTI, P.; JONES, L.M.; BERMAN, D.T. Adult vaccination with standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in a dairy herd infected with brucellosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.173, n.2, p.1445-1449, 1978a.
- NICOLETTI, P.; JONES, L.M.; BERMAN, D.T. Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.173, n.11, p.1450-1456, 1978b.
- NICOLETTI, P.; TANYA, V. Comparison of enzyme-labeled immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standard serologic methods and bacteriologic culture for detection of *Brucella* sp.-infected cows in herds with

brucellosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.202, n.12, p.1975-1977, 1993.

OLIVEIRA, D.D.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; FLATSCHART, R.B.; RESENDE, J.S.; ABREU, J.T.; MARTINS, N.R.S. ELISA indireto para detecção de IgG antivírus da doença de Newcastle em soro de codorna. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1344-1347, 2007.

SAMARTINO, L.; BUFFONI, L.; CONDE, S.; GREGORET, R. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. **Revista de Medicina Veterinária**, v.82, n.2, p.90-94, 2000.

SÁNCHEZ-VIZACAÍNO, J.M.; ALVAREZ, M.C. **Enzyme Immunoassay Techniques, ELISA, in Animal and Plant Diseases**. 2. ed. Technical Series 7, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madri. OIE - Office International des Epizooties, 1987. 54p.

SUTHERLAND, S.S. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for the detection of the specific antibody in cattle vaccinated and challenged with *Brucella abortus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.1, p.44-47, 1985.