

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PADRONIZAÇÃO DE TESTES E INTERFERÊNCIA
DA VACINAÇÃO CONTRA LEPTOSPIROSE NO
DIAGNÓSTICO EM BRUCELOSE BOVINA**

João Helder Frederico de Faria Naves
Médico Veterinário

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS –BRASIL
Janeiro de 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PADRONIZAÇÃO DE TESTES E INTERFERÊNCIA
DA VACINAÇÃO CONTRA LEPTOSPIROSE NO
DIAGNÓSTICO EM BRUCELOSE BOVINA**

João Helder Frederico de Faria Naves
Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária – UFU, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Veterinárias (Saúde Animal)

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS –BRASIL
Janeiro de 2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Batista Naves e Maria Isabel de Faria Naves, pela minha vida, pelo exemplo de dedicação e perseverança, por sempre me apoiar, incentivar, dar amor e carinho, possibilitando a realização de um sonho.

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."

CHICO XAVIER

AGRADECIMENTOS

Deus, pela oportunidade da vida e sabedoria que permitiu a conquista do mestrado.

Meus pais e minha irmã Renata, por todos esses anos de amor, carinho, compreensão e por estarem sempre prontos para me ajudar no que for preciso.

Saira, pelo seu amor, carinho e dedicação, sempre me incentivando e dando idéias e conselhos.

Meu cunhado Celso, ao meu sogro Augusto e minha sogra Sara, pelo apoio e amizade.

Profa. Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro, pela valorosa orientação, amizade e por me dar a oportunidade de aprender, ensinar, e principalmente contribuir para a minha formação e enriquecimento científico e pessoal, permitindo não apenas a realização de um sonho, mas a certeza do início de uma nova e árdua meta profissional a seguir.

Prof. Cesar Augusto Garcia, meu orientador da graduação, quem me deu a oportunidade de realizar pesquisas científicas me despertando para área acadêmica.

As minhas amigas Pollyanna e Tatiane, pela amizade, risadas, incentivo, almoços juntos, pelos dias e noites no laboratório, compartilhamento de idéias para novos experimentos e por serem grandes companheiras, sempre estando dispostas a ajudar.

Jacqueline, Rafael Quirino e Sandra, meus “irmãos mais velhos” no mestrado, pelos conselhos e apoio.

Laís Rezende e Gabriel Ramos, pela companhia, amizade e por serem o braço direito do experimento.

Aos membros do Centro Colaborador pela convivência diária, que permanecerá em minha memória.

Meus colegas de turma no mestrado em Ciências Veterinárias, por compartilharem esta oportunidade e estarem presentes nesta etapa de minha vida.

Aos técnicos do laboratório de doenças Infectocontagiosas da FAMEV-UFU Marília, Manoel e Altair, pela disposição e colaboração.

“Seu” Marcio e aos funcionários da fazenda experimental do Gloria, pela essencial ajuda nas vacinações e colheitas de sangue.

Helena, Fabiana, Leocídio e Célia, pela amizade, convivência e boa vontade.

Aos pesquisadores do LANAGRO-MG Dr. Paulo Martins Filho e Guilherme Canestro, pelo fornecimento e análises das amostras de soro sanguíneo.

Maurício Dasso, pesquisador do Instituto Desidério Finamor-RS, pela sua contribuição com o experimento.

A CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou minha formação acadêmica.

A todos que de certa forma contribuíram com esse trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1 Brucelose Bovina	1
1.2 Técnicas de diagnóstico da brucelose bovina	2
1.3. Leptospirose Bovina	6
1.4. Diagnóstico de Leptospirose Bovina	7
Referências	10
CAPÍTULO 2 - ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDO CEPA INATIVADA E LIPOPOLISSACARÍDEO DE <i>Brucella abortus</i>	18
Resumo	18
Abstract	19
2.1 Introdução	20
2.2 Material e Métodos	21
2.3 Resultados	22
2.4 Discussão	24
2.5 Conclusão	25
Referências	26
CAPÍTULO 3 - INTERFERÊNCIA NOS TESTES DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM BOVINOS RECÉM VACINADOS CONTRA LEPTOSPIROSE	30
Resumo	30
Abstract	30
2.1 Introdução	32
2.2 Material e Métodos	33
2.3 Resultados	34
2.4 Discussão	37
2.5 Conclusão	39
Referências	40
CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES	45
APÊNDICES	46

Apêndice A – Preparo de soluções e estatística do capítulo 2	47
Apêndice B – Estatística, resultado FC LANAGRO e aprovação do comitê de ética do capítulo 3	49

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Comparação de resultados do iELISA/B1119-3 frente ao 2ME no diagnóstico de brucelose	23
Tabela 2. Comparação de resultados do iELISA/LPS frente ao 2ME no diagnóstico de brucelose	23

Capítulo 3

Tabela 1. Número de reagentes aos exames sorológicos de brucelose entre os animais recém vacinados contra leptospirose, Uberlândia, MG, 2010.....	35
Tabela 2. Resultado do teste antígeno acidificado tamponado (AAT) de vacas recém vacinadas para Leptospirose, Uberlândia, MG, 2010	35
Tabela 3. Resultado de SAM de vacas recém vacinadas contra leptospirose, Uberlândia, MG, 2010	36

PADRONIZAÇÃO DE TESTES E INTERFERÊNCIA NO DIAGNÓSTICO EM BRUCELOSE BOVINA

RESUMO - A dissertação foi dividida em dois estudos. O primeiro teve como objetivo padronizar dois ensaios imunoenzimáticos indiretos (iELISA) para o diagnóstico da brucelose bovina. Foram utilizadas 92 amostras de soro sanguíneo, sendo 46 positivos e 46 negativos para brucelose. O iELISA/B1119-3 apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 95,6%. Entretanto, no iELISA/LPS a sensibilidade foi de 97,8% e especificidade de 91,3%. Quando comparados os testes 2ME com iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS observou-se uma concordância de 97,83%, 94,57% respectivamente. Os dois testes iELISA foram eficientes no diagnóstico da brucelose bovina. O segundo estudo objetivou-se verificar se bovinos recém vacinados contra leptospirose podem reagir nos testes de diagnóstico de brucelose. Sessenta vacas foram divididas em cinco grupos, cada um com 12 animais. Quatro grupos receberam diferentes vacinas de leptospirose e, um grupo controle, recebeu apenas soro fisiológico. Amostras de soro sanguíneo foram colhidas nos dias zero, sete, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 96 e 126. As amostras foram submetidas aos testes de brucelose e leptospirose. Vinte vacas foram reagentes no Antígeno acidificado tamponado (AAT), pelo menos uma vez, no qual dois animais reagiram por três vezes, e outros dois animais reagiram por duas vezes, totalizando 26 amostras positivas. Sete foram confirmadas, uma no 2-Mercaptoetanol (2ME), duas no teste de fixação de complemento (TPF) e seis no iELISA, no qual dois animais reagiram em dois testes confirmatórios simultaneamente. Apenas no teste de fixação de complemento (FC) não houve positivos. Apenas cinco animais foram confirmados positivos. Diante dos resultados pode-se afirmar que vacas recém vacinadas contra leptospirose podem reagir nos testes de brucelose.

Palavras-chave: *Brucella* sp., *Leptospira* spp., Padronização, Reação inespecífica, Sorologia

STANDARDIZATION OF TESTS AND INTERFERENCE IN DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS

ABSTRACT - This dissertation was divided in two studies. The first study evaluated the standardization two indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) for the diagnosis of bovine brucellosis using antigen as inactivated strain B1119-3 and lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus*. 92 serum samples, 46 positive and 46 negative were used by brucellosis tests. The iELISA/B1119-3 had a sensitivity of 100% and specificity of 95.6%. The iELISA/LPS sensitivity was 97.8% and specificity of 91.3%. When compared 2ME tests with iELISA/B1119-3 and iELISA/LPS as observed a concordance of 97.83% and 94.57% respectively. Both iELISA tests were efficient in the diagnosis of bovine brucellosis. The second study aimed to verify if cattle vaccinated against leptospirosis can react in diagnostic tests for brucellosis. Sixty cattle were divided in five groups, with 12 animals each. Four groups received different vaccines for leptospirosis, and a control group received only saline. Serum samples were collected on days zero, seven, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 96 and 126. The serum samples were tested for brucellosis and leptospirosis. Twenty cattle were reactive in the Rose Bengal Test (RBT), at least once, in which two animals responded three times, and two animals responded twice, a total of 26 positive samples. Seven were confirmed, one in 2-Mercaptoethanol (2ME), two in Fluorescence Polarization Assay (FPA) and six in the iELISA, in which two animals reacted in two confirmatory tests simultaneously. Only in Complement Fixation (CF) test there was none positive animal. Only five animals were confirmed positive. Thus, these results confirm that cattle vaccinated against leptospirosis can react in tests for brucellosis.

Key words: *Brucella* sp., *Leptospira* spp., Standardization, nonspecific reaction, Serology

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Brucelose Bovina

A brucelose bovina é causada pela bactéria *Brucella abortus* causando principalmente problemas reprodutivos como abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade além de transmitida dos animais para o homem (POESTER et al., 2009).

A doença é adquirida com maior frequência por ingestão, podendo também ocorrer infecção por contato venéreo, penetrações através de lesões na pele, inalação ou via transplacentária. Em rebanhos afetados, a brucelose pode resultar em diminuição da fertilidade, redução na produção de leite, abortos em animais de reposição susceptíveis e degeneração testicular em touros (QUINN et al., 2005).

As perdas econômicas vão desde a geração de barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal (queda de preço da carne, leite e derivados) e perdas na indústria (condenação do leite e da carne), altos custos dos programas de controle e erradicação e ainda prejuízos causados com abortos e a baixa fertilidade dos animais (JARDIM; PIRES, 2006).

Visando controlar e erradicar a brucelose e a tuberculose bovina, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). As principais medidas foram implantar a vacinação obrigatória contra brucelose em fêmeas de três a oito meses de idade e definir como oficiais os testes de diagnósticos: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Teste do Anel em Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC), os dois primeiros como testes de triagem, e os dois últimos como testes confirmatórios (BRASIL, 2006). Recentemente, o teste de Polarização Fluorescente (TPF) foi oficializado como teste confirmatório no Brasil (BRASIL, 2010).

Alguns países adotaram programas de controle contra a brucelose bovina, sendo que os programas bem estruturados atingem bons índices de controle, com redução significativa da prevalência, e que trazem como resultado, não só a eliminação da brucelose bovina, mas também a organização, fortalecimento e

amadurecimento dos serviços de saúde animal, bem como a modernização da cadeia produtiva de carne e leite (POESTER et al., 2009).

Na União Européia são aprovados como exames oficiais os testes de AAT, TPF, FC, ensaio imunoenzimático indireto (iELISA) e ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA), sendo que os animais confirmados com a doença também devem ser sacrificados (UE, 2008).

1.2 Técnicas de diagnóstico da brucelose bovina

Diferentes métodos de diagnóstico devem ser aplicados de forma a se complementarem. O diagnóstico clínico baseia-se nos sinais e nos dados epidemiológicos do rebanho da propriedade e das propriedades vizinhas; o laboratorial pode ser feito pela identificação do agente por métodos diretos, ou pela detecção de anticorpos contra *Brucella abortus* por métodos indiretos (MONTEIRO et al., 2006).

A prova do AAT consiste em uma soroaglutinação em placa, em que o antígeno, na concentração de 8% de volume celular, é tamponado em pH baixo (3,65) e corado com rosa de Bengala. Essa acidificação do antígeno reduz a atividade da imunoglobulina da classe M (IgM), tornando a prova seletiva para a identificação da imunoglobulina da classe G (IgG) (ALTON et al., 1988). Entretanto o teste possui grande sensibilidade em animais imunizados com a vacina B19, podendo assim ocorrer reações falso-positivas (MEGID et al., 2000, FOSGATE et al., 2002).

O teste do anel em leite é um método eficaz e barato para a vigilância de brucelose em bovinos de leite (BLOOD et al., 1991). Revela imunoglobulinas da classe A (IgA), presentes no leite e aderidos às moléculas de gordura. São utilizados antígenos corados com hematoxilina que ao se testar o leite dos bovinos, se houver presença de anticorpos os mesmos reagirão com o antígeno, formando uma coloração azulada característica da reação positiva, ocorrendo pela interação antígeno-anticorpo que arrastada pelos glóbulos de gordura, gera a ocorrência de um anel azulado na camada de creme do leite (PAULIN; FERREIRA NETO, 2002; NIELSEN, 1995a). Tal prova tem limitações, pois pode apresentar resultados falso-

positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de animais portadores de mamites ou, ainda, de animais em início de lactação (colostro) (BRASIL, 2006).

O teste de 2-Mercaptoetanol, é uma prova que detecta somente IgG no soro sanguíneo, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica nos bovinos infectados. O reagente 2-mercaptoetanol degrada a IgM em cinco subunidades monoméricas, por redução das pontes dissulfídicas que estabilizam o polímero (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003), determinando assim a perda de sua atividade aglutinante, tornando o teste sujeito apenas às aglutinações estabelecidas pela classe IgG, que não sofre alteração na sua atividade, na presença desse reagente, aumentando a especificidade do teste (BERCOVICH, 1998). A interpretação dos resultados é feita pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), em relação ao soro tratado com 2-mercaptoetanol (BRASIL, 2006).

O Teste de Polarização Fluorescente (TPF) baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel preparado com polissacarídeo “O” de *Brucella abortus* (marcado com isotiocianato de fluoresceína) e essa mesma molécula ligada ao anticorpo que pode ser testado através de amostra de soro sanguíneo e leite (NIELSEN et al., 1996; MATHIAS et al., 2010). Uma molécula menor gira aleatoriamente a uma velocidade maior, resultando em rápida despolarização da luz, ao passo que um complexo maior gira mais lentamente, e a despolarização da luz ocorre a uma taxa mais reduzida. Essa mudança na despolarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente (NIELSEN; GALL, 2001).

O TPF é fácil, rápido e bastante confiável, quando realizado por pessoa devidamente treinada, não tem influência de anticorpos vacinais, apresentando melhor especificidade que os testes convencionais para o diagnóstico em animais vacinados e requer volumes menores de soro que os demais métodos sorológicos e é menos afetado pela hemólise (NIELSEN et al., 1996; MATHIAS et al., 2010).

A Reação de Fixação de Complemento (FC) baseia-se na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento e com isso detectar precocemente IgG₁ no soro sanguíneo em torno do 14º dia, sendo que as provas de aglutinação o fazem ao redor do 30º dia. A variação da técnica a quente é mais prática, pois diminui as reações anticomplementares e elimina a IgM, aumentando a especificidade do teste (CHAPPEL, 1989; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Porém a FC é uma prova mais trabalhosa e mais cara que as de aglutinação exigindo pessoal treinado e laboratório bem equipado (BRASIL, 2006). É o teste de referência recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal para o trânsito internacional de animais (WHO, 2009).

O teste de ELISA indireto (iELISA) é um teste que apresenta alta sensibilidade na detecção de anticorpos contra a *Brucella sp.*, mas muito cuidado deve-se ter quando aplicado em animais imunizados com a vacina B19 (CARGILL et al., 1985; NIELSEN, 2002). Emprega-se como antígeno o lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella abortus* imobilizado em placas de 96 poços. Como conjugado, utiliza-se um anticorpo monoclonal anti-IgG₁ bovina conjugado com a peroxidase. O iELISA favorece o reconhecimento dos anticorpos reacionais ao agente etiológico, quando bem padronizadas (MOLNÁR et al., 2002). O teste é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal como teste confirmatório para o diagnóstico de brucelose (WHO, 2009).

O teste de Elisa Competitivo (cELISA) utiliza-se como antígeno imobilizado na fase sólida o LPS de *Brucella abortus*. No momento da prova, o soro a testar é misturado com um anticorpo monoclonal seletivo (Mab) que compete com um anticorpo de baixa afinidade (NIELSEN et al., 1995b).

Um conjugado peroxidase-anti-IgG é utilizado para detectar o anticorpo monoclonal ligado ao antígeno imobilizado na fase sólida do teste. Quanto maior a quantidade de anticorpos anticadeia “O” de *Brucella sp.* no soro testado, maior a competição com o anticorpo monoclonal específico e menor a quantidade de cor desenvolvida. Comparado a um controle, é possível determinar a quantidade relativa de anticorpos anti-*Brucella*. É um teste muito sensível e específico, e é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal como teste confirmatório para o diagnóstico de brucelose (BRASIL, 2006; WHO, 2009).

O Teste de Fluxo Lateral para *Brucella abortus* é um teste imunocromatográfico composto por uma tira de nitrocelulose com um reagente de detecção feito de um dispositivo de plástico com anticorpo IgG anti-bovino marcado com ouro coloidal seco de um lado, e uma tira de absorção no outro. A zona de detecção contém duas linhas distintas, uma linha de teste e uma linha controle (ABDOEL et al., 2008).

A linha de teste é obtida por pulverização do antígeno de *Brucella abortus* sobre a tira de nitrocelulose. O anticorpo IgG bovino, encontrado no soro sanguíneo, é colocado na linha controle, que fica em paralelo à linha do antígeno. O teste de fluxo lateral é um exame simples, rápido e de fácil execução, e apresenta alta especificidade e sensibilidade para a detecção da brucelose bovina (ABDOEL et al., 2008).

O isolamento e a identificação da *Brucella abortus* a partir de material de aborto (feto, conteúdo estomacal de feto, placenta) ou de secreções, é acompanhado pelo cultivo no meio base como o ágar triptose ou ágar Albimi com a adição de soro e antimicrobianos. O cultivo é incubado à 37°C em uma atmosfera de 10 % de CO₂, durante dois a três dias. O isolamento apresenta resultados muito bons se a coleta e o transporte das amostras forem bem realizadas e se for processada em laboratórios capacitados e com experiência. Entretanto, devido ao risco de contaminação humana durante o processamento da amostra, poucos são os laboratórios que realizam o exame (BEER, 1999; WHO, 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica baseada no processo de replicação de DNA, que permite a identificação da *Brucella abortus* em material de aborto e nas secreções da vaca após o parto ou aborto, sendo uma prova de diagnóstico direto considerada de alta confiabilidade (RODRIGUEZ, 1997; JARDIM; PIRES, 2006).

Numerosos ensaios, utilizando o PCR foram desenvolvidos na identificação de espécies do gênero *Brucella sp.* (DA COSTA et al. 1996). A técnica de PCR AMOS (com base nas iniciais das espécies que se identifica), pode distinguir *Brucella abortus* (biovars 1, 2 e 4), *Brucella melitensis* (biovars 1, 2 e 3), *Brucella ovis* e *Brucella suis* (Biovar 1). Esta técnica permite diferenciar cepa vacinal de cepa de campo (EWALT ; BRICKER, 2000).

1.3. Leptospirose Bovina

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica que afeta a maioria dos mamíferos domésticos e silvestres. É causada por bactérias do gênero *Leptospira spp.* e caracterizada por diversas manifestações clínicas como, febre,

icterícia, mamites com presença de sangue no leite, hemoglobinúria, pneumonia, enterite (SALLES; LILENBAUM, 2000; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Existem 12 espécies de *leptospira* patogênicas, apresentando mais de 250 sorovares, e quatro espécies de *leptospira* saprófitas (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Os principais sorovares encontrados em bovinos são Hardjo, Wolffi, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa (FAINE et al., 1999).

O diagnóstico da doença compreende na pesquisa de anticorpos específicos através de testes sorológicos e a pesquisa direta do microorganismo, a partir do sangue, urina, liquor e outros materiais biológicos. No entanto, considerando as dificuldades para o isolamento do agente, os métodos indiretos são os mais empregados (BRASIL, 1995).

Em bovinos, uma síndrome hemolítica de leptospirose pode ser diferenciada de babesiose, anaplasmosse, assim como de outras causas de anemia hemolítica, através de exames laboratoriais. Abortos, natimortos e/ou infertilidade também são sintomas de doenças como brucelose, campilobacteriose, clamidioses, tricomonioses, devendo ser realizados testes de diagnóstico diferenciais clínicos e laboratoriais (HUNTER, 2005).

A erradicação da leptospirose bovina é praticamente impossível, contudo pode-se fazer o controle através de vacinações que devem ser realizadas a cada seis meses em todos os animais do rebanho com idade acima de três meses. É importante que as vacinas contenham os sorovares de *Leptospira spp.* mais prevalentes na região. A vacinação e a realização de testes sorológicos regulares para a verificação de novas infecções, geralmente são medidas profiláticas eficazes no controle de novos surtos da doença (RIET-CORREA et al., 2001).

1.4. Diagnóstico de Leptospirose Bovina

A soroaglutinação microscópica de campo escuro (SAM) é o teste que utiliza como antígenos *leptospira spp.* vivas, sendo amplamente utilizado e considerado o teste sorológico padrão ouro, devido a sua alta especificidade, porém requer treinamento para ser realizado (BRASIL, 1995). O teste SAM é específico para o provável sorovar infectante ou sorovares antigenicamente relacionados. Antígenos

selecionados para o uso no teste devem incluir estirpes representativas dos sorogrupos conhecidos na região onde se encontram os animais a serem testados, além daqueles mantidos por espécies hospedeiras em outras localidades. Esta estratégia aumenta as chances de detectar anticorpos anti-*leptospira* (FAINE et al. 1999).

Ao utilizar os sorovares mais comumente encontrados na região aumenta-se a sensibilidade do teste. Muitos laboratórios utilizam um mínimo de seis a 15 sorovares representativos dos sorovares comuns a região. A presença do sorovar é indicada pela frequência em triagem sorológica ou isolamento do sorovar de animais clinicamente afetados (WHO, 2008). Quando o teste de SAM é realizado em amostras representativas de rebanhos ou populações, os resultados são inicialmente trabalhados de forma a possibilitar a determinação da proporção de animais reagentes, ou seja, o número de animais reagentes dentre os examinados com título maior que 100 para pelo menos um dos antígenos empregados no teste (FAINE et al., 1999).

Apesar de não existir obrigatoriamente uma relação entre título sorológico e infecção, tradicionalmente considera-se suspeito quando o título for igual ou superior a 1:200, embora diluições com títulos positivos de 1:100 já suscitem suspeitas (LILENBAUM, 1996), apesar de muitos autores contestarem esta idéia, aceitando diferentes valores de título; como 1:200, 1:400 e 1:800 (WHO, 2008). De acordo com Seyffert et al., (2003), fatores como temperatura, tempo de incubação, densidade do antígeno e idade da cultura poderem interferir na interpretação do resultado da SAM. As reações múltiplas obtidas em uma mesma amostra de soro com diferentes sorovares são interpretadas como coaglutinação. Este fato é relativamente frequentes entre sorovares do mesmo sorogrupo (COSTA et al., 1998).

A especificidade do SAM é boa, já que anticorpos contra outras bactérias geralmente não apresentam reação cruzada com a *leptospira spp*. Entretanto, existe uma significativa reação cruzada entre os sorovares de *leptospira spp*. Os animais vacinados para leptospirose podem ter anticorpos contra os sorovares presentes na vacina, portanto é importante considerar o histórico de vacinação dos animais testados, para que não haja erro no diagnóstico (WHO, 2008).

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm sido desenvolvidos como métodos alternativos de triagem soroepidemiológica para a leptospirose bovina. Podem-se destacar como vantagens do teste de ELISA em relação à SAM, a segurança (não utiliza bactérias vivas), a alta sensibilidade do teste, a facilidade de execução da análise, rapidez, menor custo e a objetividade da interpretação dos resultados (BOMFIM et al., 2005).

O teste de ELISA baseia-se na formação de um complexo antígeno-anticorpo, com atividade imunológica e enzimática. São utilizados como antígenos, principalmente lipopolissacarídeo (LPS), uma vez que este é o antígeno imunodominante da membrana externa das *Leptospira spp.* (Faine et al., 1999). Já foram utilizadas as lipoproteínas LipL32 (BOMFIM et al., 2005), LipL41 (MARIYA et al., 2006) e LipL21 (LUO et al., 2010) como antígenos em ELISA. As proteínas LipL41, LipL21 e LipL32, são expressas tanto *in vivo* com *in vitro*, e também somente são detectadas em sorovares patogênicos (CULLEN et al., 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica baseada no processo de replicação de DNA, construção de oligonucleotídeos iniciadores, também denominados *primers*, complementares as extremidades que delimitam a região alvo, que permite a detecção rápida e sensível de determinados microrganismos (RODRIGUEZ, 1997).

Essa técnica de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas de DNA do microorganismo, através de soro sanguíneo, liquor, urina, sêmen, fezes e tecidos tem sido referida como uma das mais promissoras para diagnóstico precoce da leptospirose. A facilidade de obtenção do DNA leptospiral em quaisquer fluidos biológicos, não necessitando da presença de anticorpos, torna o diagnóstico possível em estágios iniciais da doença (BAL et al., 1994; HEINEMANN et al., 2000; WILSON et al., 2002).

Porém, o PCR requer *primers* específicos, que permita a amplificação, se não de todas, mas da maioria das cepas patogênicas ou potencialmente patogênicas. Muitos pares de primers utilizados na PCR para detectar *Leptospira spp.* têm sido descritos, alguns baseados em alvos específicos, freqüentemente genes que codificam para o rRNA 16S ou 23S (HOOKEY et al., 1993; WAGENAAR et al., 1994; WOO et al., 1997).

A imunofluorescência pode ser utilizada para identificar *Leptospira spp.* em tecidos (fetal, fígado, pulmões, rins ou placenta) ou sedimentos urinários. É um teste rápido, podendo ser utilizado em amostras congeladas. Sua interpretação requer um técnico treinado, e o conjugado de anticorpos fluorescentes atualmente em uso não é sorovar-específico, tornando necessária a realização do exame sorológico para identificar a sorovariedade infectante (BRASIL, 1995; BOLIN, 2003).

O isolamento da *Leptospira spp.* permite o diagnóstico definitivo da infecção. A partir do sucesso no isolamento de uma estirpe de *leptospira spp.* torna-se necessária a tipificação da amostra isolada que envolve o preparo de soro hiperimune seguido do encaminhamento da amostra e do respectivo anti-soro para laboratório de referência aonde será efetuada a tipagem por meio do teste de absorção cruzada de aglutininas ou do emprego de uma coleção de anticorpos monoclonais.

A identificação primária em nível do sorogrupo pode ser efetuada em laboratórios de rotina, desde que os laboratórios de referência forneçam anti-soros policlonais oficialmente controlados (FAINE et al. 1999). Em bovinos naturalmente infectados, o isolamento de *leptospira spp.* tem sido realizados a partir de amostras de urina, rim, fígado, ovário e útero. Tais amostras são semeadas em meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) modificado (FREITAS et al., 2004, SILVA et al., 2005).

Apesar de existir várias pesquisas sobre a brucelose e leptospirose bovina, muito ainda deve ser pesquisado, com o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico mais eficazes, e a investigação da interferência entre essas doenças, nos testes já existentes. Por essa razão foi proposto dois estudos descritos nos capítulos 2 e 3 dessa dissertação.

REFERÊNCIAS

ABDOEL, T., DIAS, I. T., CARDOSO, R., SMITS, H. L. Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock. **Veterinary Microbiology**. v. 130, n. 3-4, p. 312–319, 2008.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Review: Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut Nacional de la Recherche Agronomique, 1988. 190p.

BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.

BEER, J. **Doenças infecciosas em Animais Domésticos**, Editora Roca: São Paulo, 1999. Cap. 16, p.163-178.

BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus* free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. **Veterinary Quarterly**, v. 20, n. 3, p. 81-88, 1998.

BLOOD, D. C.; RODOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 570-579.

BOLIN, C. A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. In: **Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference**, Reno, 2003. p. 155-160.

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis, **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 89-94, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Leptospirose**. Brasília. p. 98, 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: legislação**. Brasília:p. 36-42, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Agropecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 27, de 20 de outubro de 2010. Dispõe sobre aprovação do Teste de Polarização Fluorescente para utilização pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, no diagnóstico da brucelose bovina e Bubalina. **Diário Oficial da União**, n. 41, 22 de outubro de 2010, Seção 1, p. 9. 2010.

CARGILL, C.; LEE, K.; CLARKE, I. Use of an enzyme-linked immunoabsorbent assay in a bovine brucellosis eradication programme. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 2, p. 49-52, 1985.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, v. 16, n. 2, p. 3-5, 1989.

COSTA, M. C. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; MARTINS, N. R. S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *Leptospira wolffi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 1, p. 11-18, 1998.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2414 – 2421, 2003.

DA COSTA, M.; GUILLOU, JP.; GARIN-BASTUJI, B.; THIEBAUD, M., DUBRAY, G. Specificity of six genes sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 3, p. 267-275, 1996.

EWALT, D. R.; BRICKER, B. J. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3085-3086, 2000.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira* and leptospirosis**. 3.ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

FOSGATE, G. T.; ADESIYUN, A. A.; HIRD, D. W.; JOHNSON, W. O.; HIETALA, S. K.; SCHURIG, G. G.; RYAN, J. Comparison of serologic test for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 11, p. 1598 - 1605, 2002.

FREITAS, J. C.; SILVA, F.; OLIVEIRA, R. C. Isolamento de *Leptospira* spp. de cães, bovinos e suínos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HOOKEY, J. V.; BRYDEN, J.; GATEHOUSE, L. The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of Leptospiraceae and related spirochaetes. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n.1, p. 2585-2590, 1993.

HUNTER, P. Leptospirosis. In: Cortzer J. A. W.; Tustin R. C. **Infectious diseases of livestock**. Oxford, 2^a. Ed, 2005. v. 1, p. 1445-1456.

JARDIM, G. C; PIRES, P, P. 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. 1-11, 2006.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 202-212, 2008.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.18, n.1, p.9-13, 1996.

LUO, D.; XUE, F.; OJCIUS, D. M.; ZHAO, J.; MAO, Y.; LI, L.; LIN, X.; YAN, J. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from chinese pathogenic *Leptospira spp.* and characterization of their immunogenicity. **Vaccine**, v. 28, n.1, p. 243-255, 2010.

MARIYA, R.; CHAUDHARY, P.; KUMAR, A. A.; THANGAPANDIAN, E.; AMUTHA, R.; SRIVASTAVA, S. K. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 5-6, p. 269-277, 2006.

MATHIAS, L. A. CORBELLINI, L. G.; NASCIMENTO, L. M. 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**, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A.J. Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2- mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 395-99, 2000.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E. S. 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.

MONTEIRO, L. A. R. C.; PELLEGRIN, A. O.; ISHIKAWA, M. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2006.

NIELSEN, K.A. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 27, p. 9-17, 1995a.

NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved competitive enzymeimmunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 3-4, p. 285-291, 1995b.

NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICIUS, 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, n. 1-2, p.161-168, 1996.

NIELSEN, K.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 22, n. 3, p. 183-201, 2001.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 447-459, 2002.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 105-112, 2002.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J.S. **O Combate à brucelose bovina: situação brasileira**. Ed. Funep, 2003. 154p.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 1-5, 2009.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Edit. Artmed. 1ª ed. 2005. P. 150-186.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Edit. Varela; 2ª ed. 2001. p. 574.

RODRIGUEZ, J. M. Review: Detection of animal pathogens by using the polymerase chain reaction (PCR). **The Veterinay Journal**, v. 153, n. 3, p. 287-305, 1997.

SALLES, R. S., LILENBAUM, W. Leptospirose bovina no Brasil. Suplemento Técnico. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 42-46, 2000.

SAMBASIVA, R. R.; NAVEEN, G.; BHALLA, P.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in India and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

SEYFFERT, N.; SILVA, E. F.; BERMUDEZ, V. L.; BROD, C. S. Influence of temperature, incubation time, antigen density and age of the culture in agglutinability of leptospires. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.17-20, 2003.

SILVA, F. G.; FREITAS, J. C.; ANZAI, E. K.; HASHIMOTO, V. Y.; GIRALDI, N.; DELBEM, A. C. B.; BRACARENCE, A. P. F. R. L.; REIS, A. C. F., VASCONCELOS, S. A. Leptospire detection in kidney, liver and uterus of cows slaughtered in Paraná State, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 38-42, 2005.

UNIÃO EUROPEIA (UE). Decisão da comissão de 10 de Dezembro de 2008 que altera o Anexo C da Directiva 64/432/CEE do Conselho e a Decisão 2004/226/CE no que se refere aos testes para diagnóstico da brucelose bovina. **Jornal Oficial da União Européia**, p. 38-45, 2008.

WAGENAAR, J. A.; SEGERS, R. P.; VAN DER ZEIJST, B. A. Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplification of ribosomal sequences. **Molecular Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-14. 1994.

WILSON T.; CARSON J.; BOWMAN J. Optimisation of one-tube PCRELISA to detect femtogram amounts of genomic DNA. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, n. 2, p. 163-170, 2002.

WOO, T. H.; SMYTHE, L. D.; SYMONDS, M. L.; NORRIS, M. A.; DOHNT M. F.; PATEL B. K. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, n.1, p. 9-18, 1997.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WHO). Leptospirosis. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)**, 2008. Cap. 2.1.9, p. 251-264.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WHO). Bovine Brucellosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)**, 2009. v. 2. Cap. 2.4.3, p. 15.

CAPÍTULO 2 - ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDO CEPA INATIVADA E LIPOPOLISSACARÍDEO DE *Brucella abortus*

RESUMO - Objetivou-se padronizar dois ensaios imunoenzimáticos indiretos (iELISA) para o diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno cepa inativada B1119-3 e Lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella abortus*. Foram utilizadas 92 amostras de soro sanguíneo bovino previamente testadas pelo Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2ME), sendo 46 positivos e 46 negativos. Para comparação entre os resultados dos testes foi usado o coeficiente *kappa*. Calculou-se a sensibilidade e a especificidade em relação ao 2ME. O iELISA com a cepa inativada B1119-3 utilizada como antígeno (iELISA/B1119-3) apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 95,6%. O iELISA com o LPS (iELISA/LPS), a sensibilidade foi de 97,8% e especificidade de 91,3%. Quando comparados os testes 2ME com iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS observou-se uma concordância de 97,83%, 94,57% respectivamente. Constatou-se que tanto o iELISA/B1119-3 quanto o iELISA/LPS, foram eficientes no diagnóstico da brucelose bovina.

Palavras-chave: *Brucella* sp, Imunodiagnóstico, Padronização

CHAPTER 2 - INDIRECT ELISA FOR DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS USING INACTIVATED STAIN AND LIPOPOLYSACCHARIDE OF *Brucella abortus*

ABSTRACT - The research evaluated the standardization of two indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) for diagnosis of bovine brucellosis using antigen with inactivated strain B1119-3 and lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus*. 92 bovine serum samples were used previously tested by the Rose Bengal Test (RBT) and 2-Mercaptoethanol (2ME), being 46 positive and 46 negative. *kappa* coefficient was used to compare the results of tests. It was calculated the sensitivity and specificity in relation to 2ME. The iELISA with inactivated strain B1119-3 used as antigen (iELISA/B1119-3) showed 100% of sensitivity and 95.6% of specificity. iELISA with LPS (iELISA/LPS), the sensitivity was 97.8% and specificity was 91.3%. When compared 2ME with tests iELISA/B1119-3 and iELISA/LPS were found a concordance of 97.83% and 94.57% respectively. Was observed that both tests iELISA/B1119-3 and iELISA / LPS were effective in the diagnosis of bovine brucellosis.

Key words: *Brucella sp*, Immunodiagnosis, Standartization

2.1 Introdução

A brucelose bovina é uma doença infecciosa crônica que se manifesta principalmente por abortos no terço final da gestação e nascimento de bezerros fracos além de ser uma zoonose, principalmente em países em desenvolvimento, provocando perda na produção animal e prejuízos sobre a saúde humana (RADOSTITS et al., 2002; PALHANO et al., 2003, LAGE et al., 2008).

As graves perdas econômicas provocadas pela brucelose devem-se a custos diretos e indiretos para as propriedades rurais e para indústria animal, tais como redução no preço da carne, do leite e derivados; diminuição dos índices reprodutivos; desvalorização dos produtos para o mercado externo; altos custos com pesquisas e programas de controle e erradicação (PAULIN, 2006).

O controle e erradicação da brucelose bovina devem ser fundamentados em um programa que envolva a identificação, separação e a eliminação dos animais infectados, baseando-se em métodos de diagnóstico com alta especificidade e sensibilidade (MOLNÁR et al., 2000). O diagnóstico da brucelose está fundamentado principalmente pela demonstração de anticorpos específicos com uso de técnicas sorológicas diversas (RUIZ-MEZA et al., 2005).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) do Brasil recomenda o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como teste de triagem. No caso de animais reagentes ao AAT a confirmação pode ser feita pela soroaglutinação lenta em tubos (SAT) em associação com a prova do 2-Mercaptoetanol (2ME), pela prova de fixação de complemento e pelo teste de Polarização Fluorescente (TPF) que foi oficializado como teste confirmatório no Brasil (BRASIL, 2006, 2010).

Novos métodos de diagnóstico vêm sendo utilizados, dentre eles o ensaio imunoenzimático indireto é usado para o diagnóstico de brucelose em diferentes espécies animais, sendo citado pelo PNCEBT (BRASIL, 2006). O ELISA indireto é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal para o diagnóstico da brucelose em bovinos (WHO, 2009).

A padronização de testes com alta sensibilidade e especificidade são importantes para detectar a brucelose em bovinos, já que animais positivos devem

ser sacrificados. O presente trabalho teve como objetivo padronizar dois testes iELISA para o diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno cepa inativada B1119-3 e Lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella abortus* respectivamente.

2.2 Material e Métodos

Foram utilizadas 92 amostras de soro sanguíneo de bovinos acima de 24 meses de idade, cedidas pelo Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-UFU), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG/MAPA) e Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF-RS), sendo 46 amostras positivas e 46 negativas nos testes oficiais (AAT e 2ME) (BRASIL, 2006).

Os antígenos utilizados para os testes de iELISA foram a cepa inativada B1119-3 e o LPS de *Brucella abortus*. A cepa inativada foi a mesma usada para prova do AAT, linhagem *B. abortus* 1119-3, com concentração celular de 4%, inativada pelo calor e corada pelo Rosa de Bengala, pH 3,65. O AAT utilizado foi produzido no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), Partida: 002/10 e data de fabricação: Abr/10.

O LPS de *B. abortus* cepa B19 usado como antígeno foi extraído no LADOC-UFU, utilizando o método aquecido fenol-água (WHO, 2008), porém a fração final de LPS de *Brucella abortus* foi obtida através de um sistema Amicon® (Sigma) com uma membrana de 10 kDa, para concentrar e dialisar as frações.

Para sensibilização de cada placa de iELISA adicionou-se 100µL do antígeno (B1119 e LPS) previamente diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 a 1:50 (50 µg/µL), em cada poço da placa. Em seguida as placas foram incubadas por 14 horas em câmara úmida, mantida entre 4 a 8°C. No dia seguinte, as placas foram então retiradas e lavadas duas vezes com Tampão de lavagem fosfato de sódio com tween 20 (PBS-T 0,01%). Após lavagem iniciou-se o bloqueio adicionando 200µL de leite desnatado a 5% por poço da placa e incubando a mesma por duas horas a 37°C. Depois, a placa foi lavada uma vez com tampão PBS-T 0,01% e adicionou-se 50µL do soro previamente diluído a 1: 100 em leite

desnatado a 1%, sendo as amostras de soro sanguíneo colocados em duplicata na placa e levados a uma estufa a 37°C por 1 hora.

A placa foi lavada cinco vezes com tampão PBS-T 0,01% e, em seguida, adicionou-se 50µL do conjugado anti-IgG bovino (Sigma), diluído 1:5000, em cada poço da placa que foi incubada em estufa a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada cinco vezes com tampão PBS-T 0,01%. Para revelação da reação diluiu-se 5 mg de ortofenilenodiamino (OPD) em 12,5 mL de tampão citrato em pH 5,1 e 5µL de peróxido de hidrogênio. Adicionou-se 50 µL dessa diluição em cada poço da placa que foi mantida sem a exposição da luz durante 15 e 20 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N (25 µL) e efetuando-se em seguida a leitura a 490 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

O ponto de corte foi calculado pela média da densidade óptica dos controles negativos previamente testados em triplicata somados a três vezes o desvio padrão desses valores (FREY et al., 1998). Para comparação entre os resultados dos testes foi usado o coeficiente *kappa*, o qual foi interpretado de acordo com os critérios adotados por Pereira (2000).

Os resultados das 92 amostras testadas pelos métodos iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS, foram distribuídos em uma tabela de contingência 2x2 para o cálculo da sensibilidade e da especificidade relativas (THRUSFIELD, 2004).

2.3 Resultados

Todas as 46 amostras reagentes no 2ME também foram positivas no iELISA/B1119-3 apresentando valores de absorbância acima do ponto de corte (0,612) variando entre 0,893 a 1,759, enquanto nas amostras não reagentes no 2ME foram encontrados valores de 0,140 a 0,571. Duas (4,34%) das amostras negativas foram positivas no iELISA/B1119-3.

Os resultados obtidos no iELISA/B1119-3, comparados ao 2ME podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação de resultados do iELISA/B1119-3 frente ao 2ME no diagnóstico de brucelose.

iELISA/B1119-3	2ME		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	46	02	48
Negativo	0	44	44
Total	46	46	92

Sensibilidade = 100%; Especificidade = 95,6%; Concordância = 97,83%;

kappa = 0,95

O teste de iELISA/B1119-3 apresentou uma sensibilidade relativa de 100% e especificidade relativa de 95,6%. Quando comparado os testes 2ME e iELISA/B1119-3 obteve-se um índice *kappa* de 0,95 e concordância de 97,83% apresentando uma replicabilidade excelente.

No iELISA/LPS 45 amostras das 46 positivas no 2ME foram reagentes, apenas uma não reagindo, com ponto de corte de 0,417. As amostras reagentes apresentaram valores 0,715 a 1,892, enquanto as não reagentes apresentaram valores de absorbância entre 0,120 a 0,393. Quatro (8,69%) amostras que foram negativas no 2ME, apresentaram resultado positivo no iELISA/LPS. Os resultados obtidos no iELISA/LPS, comparados ao 2ME podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação de resultados do iELISA/LPS frente ao 2ME no diagnóstico de brucelose.

iELISA/LPS	2ME		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	45	04	49
Negativo	01	42	43
Total	46	46	92

Sensibilidade = 97,8%; Especificidade = 91,3%; Concordância = 94,57%;

kappa = 0,89

Quando realizado o iELISA/LPS, o mesmo apresentou uma sensibilidade relativa de 97,8% e especificidade relativa de 91,3%. Quando comparado os testes 2ME e iELISA/LPS obteve-se um índice *kappa* de 0,89 e concordância de 94, 57%, apresentando uma replicabilidade excelente.

2.4 Discussão

A sensibilidade relativa obtida para o iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS foi de 100% e 97,8%, respectivamente. Resultado semelhante ao encontrado por Vanzini et al. (1998) que obtiveram uma sensibilidade relativa de 99,6% para amostras de soro bovino utilizando como antígeno o LPS e Jardim et al. (2010), que em teste de iELISA realizado com kit comercial Brucelose (Institut Pourquier) observaram uma sensibilidade de 100%.

Samartino et al. (1999) desenvolveram um iELISA com sensibilidade relativa de 98,2% em 3500 amostras de soro bovino. Molnár et al. (2002) utilizando 440 amostras de soro sanguíneo bubalino obtiveram sensibilidade de 98,57% no iELISA com conjugado anti-bovino de cadeia leve (anticorpo monoclonal), 97,14% no iELISA com conjugado contra IgG bovino total. Paulin et al. (2009) observaram uma sensibilidade relativa de 98,11% no teste de iELISA.

No entanto, diferem dos resultados encontrados por Putini et al. (2008) que trabalhando com 91 amostras de soro sanguíneo de vacas girolando, e utilizando um iELISA usando como antígeno a cepa de *B. abortus* inativada, obtiveram uma sensibilidade de 77,8%.

A especificidade relativa foi de 95,6% e 91,3% para o iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS, respectivamente. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Vanzini et al. (1998), que analisaram em um iELISA uma especificidade de 98,6% testando soro sanguíneo.

Samartino et al. (1999) padronizaram um iELISA com especificidade relativa de 98,6%. Posteriormente o iELISA padronizado por Molnár et al. (2002) apresentaram uma especificidade de 97,33% com conjugado anti-bovino de cadeia leve (anticorpo monoclonal) e 95,6% no iELISA com conjugado contra IgG bovino no total.

Vanzini et al. (2001), Paulin et al. (2009) e Jardim et al. (2010) obtiveram em iELISA uma especificidade relativa de 90,1%, 88,1% e 81% respectivamente, valores abaixo do encontrado por este estudo.

Quando comparados o 2ME com iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS, o *kappa* encontrado foi 0,95 e 0,89 para uma proporção de 97,83% e 94,57%, respectivamente. Resultados que se assemelham aos encontrados por Paulin et al. (2009) que ao comparar os resultados de AAT com o iELISA resultou em um valor *kappa* de 0,91.

As respostas positivas no iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS em amostras que não reagiram no AAT e 2ME podem ser justificadas por duas hipóteses, sendo a primeira associada a alta sensibilidade desse teste, que consegue detectar anticorpos em baixa concentração. A segunda seria efeito prozona, no qual ocorrem resultados falso-negativos devido ao excesso de anticorpos, resultando em complexos muito pequenos que não se aglomeram para produzir aglutinação visível (MATHIAS et al., 2010).

Os testes de iELISA padronizados com os antígenos da cepa B1119-3 e LPS apresentaram alta sensibilidade e especificidade, tendo uma excelente concordância com os outros testes de diagnóstico, conseguindo detectar anticorpos contra *Brucella abortus*.

Vale salientar que os testes padronizados neste estudo podem facilitar o exame de um número grande de amostras, haja vista que o 2ME demora 48 horas para ser feita a leitura dos resultados e, o iELISA, após a sensibilização das placas, apenas 4 horas.

2.5 Conclusão

Na padronização de dois testes iELISA, tanto a cepa inativada (B1119-3) quanto o lipopolissacarídeo de *Brucella abortus* foram eficientes como antígenos no diagnóstico da brucelose bovina. Houve concordância entre os resultados do iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS com os resultados dos testes oficiais.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura Agropecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 27, de 20 de outubro de 2010. Dispõe sobre aprovação do Teste de Polarização Fluorescente para utilização pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, no diagnóstico da brucelose bovina e bubalina. **Diário Oficial da União**, n. 41, 22 de outubro de 2010, Seção 1, p. 9. 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: legislação**. Brasília:188p., 2006.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A. Statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunology Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.

JARDIM G. C.; PIRES, P. P.; MATHIAS, L. A.; KUCHEMBUCK, M. R. G. Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado. **Agrarian**, v. 2, n. 5, p. 131-142, 2009.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 202-212, 2008.

MATHIAS, L. A. CORBELLINI, L. G.; NASCIMENTO, L. M. 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**, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. L. T.; SOUSA, 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. S. 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.

PALHANO, J.; INÊS, F.; MOREIRA, A. **Reprodução em bovinos e Fisiopatologia Terapêutica, Manejo e Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 66-67.

PAULIN, L. M. S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecção por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2006. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

PAULIN, L. M. S.; ANDRADE-PACHECO, W. A.; CASTRO, V.; FEDERSONI, I. S. P. Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella abortus* en bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 9-15, 2009.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia teórica e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 596 p.

PUTINI, V. B. CRUZ, R. B.; SANTANA, G. S.; JORGE, J. S.; SILVA, D. L.; MOURA, M.; CARMINATI, R.; ROBSON BAHIA CERQUEIRA, R. B. Padronização e avaliação

da sensibilidade e especificidade de um teste ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno a cepa de *Brucella abortus* inativada. **Revista Acadêmica Ciência Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 3, p. 361-370, jul./set. 2008.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9. ed: Guanabara Koogan. 2002. 1737p.

RUIZ-MESA, J. D.; SÁNCHEZ-GONZALEZ, J.; REGUERA, J. M.; MARTÍN, L.; LOPEZ-PALMERO, S.; COLMENERO, J. D. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 3, p. 221-225, 2005.

SAMARTINO, L. E.; GALL, D.; GREGORET, R. J.; NIELSEN, K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine. **Veterinary Microbiology**, v. 70, v. 3-4, p. 193-200, 1999.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. 2.ed: Roca, 2004. p. 138-141.

VANZINI, V. R.; AGUIRRE, N.; LUGARESI, C. I.; DE ECHAIDE, S. T.; DE CANAVESIO, V. G.; GUGLIEMONE, A. A.; MARCHESINO, M. D.; NIELSEN, K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, n. 3, p. 211-217, 1998.

VANZINI, V. R.; AGUIRRE, N. P.; VALENTINI, B. S.; TORIONI, D. E.; ECHAIDE, S.; LUGARESI, C. I.; MARCHESINO, M. D.; NIELSEN, K. Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 55-60, 2001.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (WHO). Bovine Brucellosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)**, 2008. v. 2. Cap. 2.4.3, p. 639.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (WHO). Bovine Brucellosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)**, 2009. v. 2. Cap. 2.4.3, p. 15.

CAPÍTULO 3 - INTERFERÊNCIA NOS TESTES DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM BOVINOS RECÉM VACINADOS CONTRA LEPTOSPIROSE

RESUMO - Foi proposto como objetivo verificar se bovinos recém vacinados para leptospirose podem reagir nos testes de brucelose. Sessenta vacas foram divididas em cinco grupos, cada um com 12 animais. Quatro grupos receberam diferentes vacinas contra leptospirose e, um grupo controle, recebeu apenas soro fisiológico. Foram aplicadas duas doses da vacina, conforme recomendação de cada fabricante. Amostras de soro sanguíneo foram colhidas antes da aplicação da primeira dose denominado dia 0, e nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 96 e 126 pós-vacinação. Todas as amostras de soro sanguíneo foram submetidas aos testes de brucelose e leptospirose. Vinte vacas foram reagentes no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), pelo menos uma vez, no qual dois animais reagiram por três vezes e outros dois animais reagiram por duas vezes. Cinco animais foram confirmados como positivos, sendo uma no teste de 2ME, duas no TPF e seis no iELISA, no qual dois animais reagiram em dois testes confirmatórios simultaneamente. No grupo controle não houve vacas reagentes. Verificou-se que houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos submetidos à vacinação contra leptospirose, de acordo com o teste exato de Fisher. Verificou-se que estes reagiram independentemente da marca comercial da vacina. Apenas no dia 96 não houve mais reações positivas no AAT. Diante dos resultados pode-se afirmar que vacas recém vacinadas para leptospirose podem reagir nos testes para brucelose.

Palavras chave: *Brucella abortus.*, *Leptospira spp.*, Reação inespecífica, Sorologia

CHAPTER 3 - INTERFERENCE IN DIAGNOSIS TESTS FOR BRUCELLOSIS IN VACCINATED CATTLE AGAINST LEPTOSPIROSIS

ABSTRACT - The aim was to verify if vaccinated cattle for leptospirosis can react in diagnosis tests for brucellosis. Sixty cattle were divided in five groups, each with 12 animals. Four groups received different vaccines against leptospirosis, and a control group received only saline. Were applied two doses of vaccine, as recommended by each manufacturer. Serum samples were collected on day of the first immunization (zero day) and on days 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 96 and 126 post-vaccination. All serum samples were tested for brucellosis and leptospirosis. Twenty animals were reactive in the Rose Bengal Test (RBT), at least once, and on day 96 there was no more reactions in the RBT. Twenty six samples were reacted in the RBT, only seven responded to confirmatory tests: one in 2ME, two in the fluorescence polarization assay (FPA), six in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) and none in the reaction of complement fixation (CF). In the control group there were no cattle reagents. There was a significant difference between control group and groups subjected to vaccination against leptospirosis, according to Fisher's exact test. However, it was observed that they responded independently of the vaccine trademark. Thus, these results shows that cattle vaccinated for leptospirosis can react in the tests for brucellosis.

Key words: *Brucella abortus*, *Leptospira* spp, Serology, nonspecific reaction

3.1 Introdução

A brucelose e a leptospirose bovina são causadas pela infecção das bactérias Gram-negativas *Brucella abortus* e *Leptospira spp.* respectivamente. São doenças que provocam problemas reprodutivos, principalmente o aborto, causando diversas perdas econômicas e trazendo riscos a saúde dos animais e dos seres humanos (RICHTZENHAIN et al., 2002).

Visando controlar e erradicar a brucelose e a tuberculose bovina, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) implantou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). As principais medidas implantadas foram a vacinação obrigatória contra brucelose em fêmeas de três a oito meses de idade e a adoção de testes oficiais de diagnóstico (BRASIL, 2006).

Os exames adotados pelo PNCEBT são o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Teste do Anel em Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2ME), Fixação de Complemento (FC) e Teste de Polarização Fluorescente, os dois primeiros como testes de triagem, e os três últimos como testes confirmatórios. Os animais positivos nos testes oficiais devem ser sacrificados para se evitar contaminação de outros animais e de seres humanos (BRASIL, 2006, 2010). O ELISA indireto (iELISA) é um dos testes recomendados para comércio internacional pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009).

A leptospirose bovina no Brasil não é considerada doença de notificação compulsória para o MAPA, não sendo por isso, submetida ao controle por órgãos e entidades públicas federais ou estaduais que tratam da sanidade animal, podendo os animais serem tratados com sucesso (VIANA; ZANINI; MOREIRA, 2010).

O médico veterinário frente a um rebanho com manifestações de aborto ao encontrar positividade para brucelose, na maioria das vezes, não investiga a ocorrência de outras doenças com a mesma sintomatologia, como a leptospirose, pois são doenças endêmicas no Brasil podendo causar prejuízos para agropecuária brasileira.

Para leptospirose existem vacinas e tratamento adequado para bovinos, desde que também sejam acompanhados por exames de soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM) (TONIN, et al., 2009).

O diagnóstico da brucelose bovina pode ser influenciado pela presença de reações cruzadas que geram resultados sorológicos falsos positivos, devido a outras bactérias Gram-negativas partilharem determinantes antigênicos semelhantes como a cadeia de polissacarídeo O da *Brucella abortus*. Alguns pesquisadores confirmaram a possibilidade de reação cruzada para outras doenças em testes sorológicos (WEYNANTS et al., 1996; NIELSEN et al., 2006, AL DAHOUK et al., 2006).

As evidências de reações imunológicas cruzadas entre as cepas lisas das *Brucella sp.* com outros microorganismos são diversas. Já foi descrito que as bactérias *Yersinia enterocolitica* “O:9”, *Escherichia coli* “O157:H7”, *Salmonella sp.*, *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae* podem reagir nos testes sorológicos na detecção da brucelose bovina (MOLNÁR et al., 1997; KITTELBERGER et al., 1998; GODFROID et al., 2002; NIELSEN et al., 2004; AL DAHOUK et al. 2006).

Nos calendários sanitários para bovinos, a leptospirose é uma doença que dependendo do desafio, é recomendada a vacinação no mínimo duas vezes ao ano. A vacina de leptospirose por ser constituída por bactéria Gram-negativa (*Leptospira spp.*), pode induzir a formação de anticorpos que reagiriam em testes de diagnóstico sorológico para brucelose, levando os bovinos a ser sacrificados desnecessariamente.

Diante disso, foi proposto como objetivo verificar se bovinos recém vacinados para leptospirose podem reagir nos testes oficiais e alternativos de brucelose e o período que ocorre esta interferência.

3.2 Material e Métodos

O estudo foi realizado na Fazenda Experimental do Glória da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizado no Município de Uberlândia, MG. Foram selecionadas 60 vacas de raças mestiças e puras voltadas para a produção de leite, com idade entre 25 e 30 meses,

consideradas negativas para leptospirose e brucelose nos testes de SAM e AAT respectivamente.

Para pesquisa, as vacas foram distribuídas em cinco grupos escolhidos aleatoriamente (A, B, C, D, E), sendo cada grupo com 12 animais. O grupo A foi o grupo controle, em que os animais foram imunizados com 2 mL de soro fisiológico.

Os grupos B e C foram imunizados com duas vacinas comerciais polivalentes distintas de *Leptospira spp.* distintas constituídas por seis culturas inativadas de sorotipos de *Leptospira interrogans*: Hardjo, Wolffi, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Canicola. O Grupo D foi imunizado com vacina que apresentava os sorovares Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Canicola e, o grupo E, com vacina composta pelos sorovares Hardjo, Wolffi, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Tarassovi e Bratislava. Os animais foram imunizados de acordo com as instruções de cada laboratório fabricante.

O protocolo vacinal foi composto por duas imunizações, a primeira no dia zero e a segunda no dia 28. Dez coletas de sangue de cada animal foram efetuadas, nos dias sete, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 96 e 126, sendo 120 amostras do grupo A e 480 amostras dos grupos B, C, D e E, totalizando 600 amostras.

Todas as amostras foram analisadas no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas (FAMEV-UFU), pelo teste do AAT, sendo que as amostras de soro sanguíneo reagentes foram submetidas a testes confirmatórios de 2ME, TPF, FC (BRASIL, 2006, 2010), e iELISA (WHO, 2009).

O teste de FC foi realizado no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG/MAPA). Todas as amostras foram submetidas ao teste de soroaglutinação microscópica de campo escuro (SAM) na FAMEV-UFU para verificar a evolução dos títulos vacinais (1:100) contra *Leptospira spp.* (BRASIL, 1995).

Ao fim do experimento (dia 126), os animais foram submetidos aos testes de AAT e 2ME para verificar a presença ou ausência de reação. A análise estatística para comparação dos grupos A, B, C, D, E foi o teste exato de Fisher, pelo do programa Bioestat 5.0 considerando um nível de significância de 5% (AYRES, 2008).

3.3 Resultados

O grupo A não apresentou vacas reagentes ao AAT. Nos grupos B, C, D e E 20 animais (41,66%) reagiram pelo menos uma vez no exame de AAT, no qual dois animais reagiram por três vezes e outros dois animais reagiram por duas vezes.

As Tabelas 1 e 2 mostram o número de reagentes a todos os exames sorológicos realizados nos animais recém vacinados contra leptospirose, e o número de vacas reagentes no teste do AAT durante as 10 semanas avaliadas respectivamente.

Tabela 1. Número de reagentes aos exames sorológicos de brucelose entre os animais recém vacinados contra leptospirose, Uberlândia, MG, 2010.

Grupos	n	AAT	2ME	FC	TPF	iELISA
A	12	0	0	0	0	0
B	12	5	0	0	0	0
C	12	6	0	0	0	2
D	12	10	1	0	0	3
E	12	5	0	0	2	1
Total	60	26	1	0	2	6

A-Grupo controle; B, C, D, E- Grupos vacinados; n- Número de animais em cada grupo

Tabela 2. Resultado do teste antígeno acidificado tamponado (AAT) de vacas recém vacinadas para Leptospirose, Uberlândia, MG, 2010.

Grupos	Nº de vacas reagentes no AAT (dias)										Total
	7	14	21	28	35	42	49	56	96	126	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	2	0	1	0	1	1	0	0	0	5
C	0	0	0	2	0	1	2	1	0	0	6
D	1	0	1	2	1	3	1	1	0	0	10
E	0	0	1	3	0	1	0	0	0	0	5
Total	1	2	2	8	1	6	4	2	0	0	26

A-Grupo controle; B, C, D, E- Grupos vacinados

Das amostras positivas no AAT, sete foram confirmadas, sendo uma no teste de 2ME, duas no TPF e seis no iELISA, no qual dois animais reagiram em dois testes confirmatórios simultaneamente. Apenas no teste de FC não houve reatividade. No total cinco animais foram confirmados como positivos.

O teste estatístico exato de Fisher, quando comparado os resultados do grupo A com os grupos B, C, D, e E, verifica-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$), já que os animais que receberam vacinas comerciais reagiram positivamente AAT, enquanto os animais imunizados com soro fisiológico não induziram resposta.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) comparando-se os grupos B, C, D, e E entre si, pois as reações no teste do AAT foram independentes quanto as diferentes marcas comerciais que produzem as vacinas contra leptospirose.

Todas as amostras positivas no AAT apresentavam títulos vacinais (1:100) anti-*Leptospira spp.* A Tabela 3 mostra os resultados dos exames de SAM, verificados durante as 10 semanas, observando se existia a presença de anticorpos aglutinantes induzidos pelas vacinas.

Tabela 3. Resultado de SAM (1:100) de vacas recém vacinadas contra leptospirose, Uberlândia, MG, 2010.

Grupos	Nº de vacas reagentes no SAM (dias)										Total
	7	14	21	28	35	42	49	56	96	126	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	3	2	6	7	5	6	8	4	3	0	44
C	6	7	8	8	9	7	8	7	5	2	67
D	10	8	10	10	12	12	10	11	7	2	92
E	7	7	9	9	9	6	8	5	3	3	66
Total	26	24	33	34	35	31	34	27	18	7	269

A-Grupo controle não vacinado; B;C;D;E- Grupos vacinados

Na última avaliação, realizada no dia 126 todos os animais se apresentaram negativos aos testes de brucelose e, apenas cinco animais apresentaram título vacinal no exame de SAM.

3.4 Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram haver reação cruzada nos testes de brucelose, pois vacas confirmadas sem a presença da doença no início do experimento reagiram depois da vacinação contra leptospirose. Isto ocorreu possivelmente pela interferência dos anticorpos produzidos pela imunização dos animais contra leptospirose.

Segundo análise estatística após comparar-se o grupo controle com os grupos imunizados com quatro vacinas comerciais, pode-se afirmar que houve diferença significativa nos resultados encontrados, o que ratifica a hipótese de reatividade cruzada, já que os animais que receberam vacinas comerciais contra *Leptospira spp.* reagiram positivamente no AAT, enquanto os animais imunizados com soro fisiológico não induziram respostas.

Os resultados falso-positivos podem ser devido à reatividade cruzada de epítomos imunodominantes na cadeia de polissacarídeo O do LPS da *Brucella abortus* que estão presentes em várias bactérias Gram-negativas (AL DAHOUK et al., 2006). Quando o animal é exposto a uma bactéria Gram-negativa com LPS similar ao da *Brucella abortus*, pode haver a formação de anticorpos detectáveis em exames sorológicos (MUÑOZ et al., 2005). A reação cruzada observada neste estudo apresentada no AAT, sugere que possivelmente as bactérias *Brucella abortus* e *Leptospira spp.* possam ter o LPS similar, fazendo com que o antígeno reconheça o anticorpo.

O lipopolissacarídeo (LPS) da *Leptospira spp.* tem estrutura química e efeitos biológicos semelhantes aos do LPS das bactérias Gram-negativas, embora tenha toxicidade 12 a 20 vezes menor (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). Acredita-se que pelo fato do LPS da *Leptospira spp.* apresentar baixa toxicidade, não houve uma quantidade maior de reações positivas no AAT.

O antígeno utilizado no teste de triagem para o diagnóstico de brucelose, o AAT, constitui-se de bactérias mortas coradas com rosa bengala e estão suspensas em um tampão ácido (pH 3,6). Em meios ácidos a aglutinação inespecífica dos anticorpos IgM é inibida, tornando a prova seletiva para a identificação de IgG (TIZARD, 2009).

As vacinas contra leptospirose são baseadas na proteção dirigida ao antígeno LPS da *Leptospira spp.*, produzindo altos títulos de anticorpos com imunoglobulinas das classe M (IgM), aparecendo logo em seguida a resposta de anticorpos com imunoglobulinas das classe G (IgG), que persistem por períodos prolongados (DE NARDI, 2005; MINEIRO et al., 2007; RODRIGUES, 2008).

Como a vacina de leptospirose é dirigida para produzir anticorpos contra LPS da *Leptospira spp.* e, o teste do AAT baseia-se na detecção de anticorpo anti-LPS de *Brucella abortus*, é possível afirmar que a justificativa para a interferência no teste seja devido a semelhança com o LPS da *Leptospira spp.*, que também é uma bactéria Gram-negativa.

A ocorrência de uma maior quantidade de animais positivos no AAT em relação aos testes confirmatórios é devido a baixa especificidade do exame (BRASIL, 2006), pois testes que apresentem baixa especificidade resultam em maior número de resultados falso-positivos (THRUSFIELD, 2004).

Os testes 2ME, TPF e o teste de iELISA confirmaram que cinco animais recém vacinados para leptospirose foram positivos nos testes. No FC não houve animais reagentes para brucelose.

A reação cruzada nos testes sorológicos de iELISA para brucelose com bactérias Gram-negativas já foi relatada por Kittelberger et al. (1998), Godfroid et al., (2002), Erdenebaatar et al., (2003) e Nielsen et al., (2006), em que bovinos infectados experimentalmente com a bactéria *Yersinia enterocolitica* O:9 foram detectados como positivos no teste. Nielsen et al. (2004) também observaram a reação cruzada com a bactéria *Escherichia coli* O157:H7 para o iELISA e no teste de TPF para brucelose com bovinos experimentalmente infectados com *Yersinia enterocolitica* O:9.

Kadlec (1978) analisando vacas confirmados positivos nos testes de brucelose, observou que 15,1% dos soros apresentaram reação positiva (superior a 1:800) no exame de SAM, principalmente aqueles contra os sorovares Grippotyphosa e Sejroe, sendo detectada uma possível reatividade cruzada no teste. Os bovinos inconclusivos para brucelose foram testados no SAM para leptospirose e foram reativos em 36,9% dos testes e apresentaram título maior ou igual a 1:400, também observando uma possível interferência de diagnóstico.

É aconselhável realizar os exames confirmatórios por serem testes mais específicos, visto que os animais considerados positivos no AAT já podem ser indicados para o sacrifício, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2004), pois 20 animais deste estudo oficialmente poderiam ser encaminhados ao sacrifício, já que reagiram no AAT e, cinco animais obrigatoriamente deveriam ser sacrificados, pois reagiram aos testes de 2ME, TPF que são testes oficiais no Brasil (BRASIL, 2004) e iELISA que é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009).

Como nesta pesquisa nos dias 96 e 126 pós vacinação não havia nenhuma vaca reagente no AAT, confirma-se que estas não estavam doentes para brucelose, pois se estivessem deveriam apresentar títulos persistentes nas provas sorológicas, visto que a presença de anticorpos IgG indicam a presença de infecção crônica (BRASIL, 2006).

Sugere-se que bovinos recém vacinados para leptospirose, positivos nos testes sorológicos de brucelose, sejam isolados do rebanho por um período médio de 100 dias, após a aplicação da vacina contra leptospirose, para que seja feito o reteste e elimine-se a possibilidade de interferência no diagnóstico de brucelose.

3.5 Conclusão

Bovinos recém vacinados para leptospirose podem reagir positivamente nos testes sorológicos oficiais e alternativos de brucelose, por um período de até 96 dias pós-vacinação.

REFERÊNCIAS

AL DAHOUK, S.; NÖCKLER, K.; SCHOLZ, H.C.; TOMASO, H.; BOGUMIL, R.; NEUBAUER, H. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. **Journal of Immunological Methods**, v. 309, n. 1-2, p. 34-47, 2006.

AYRES, M., AYRES Jr., M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. BioEstat 5.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. **Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq**, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Leptospirose**. Brasília. p. 98, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa n.6, de 08 de janeiro de 2004. **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, 2004.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: legislação**. Brasília:p. 36-42, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Agropecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 27, de 20 de outubro de 2010. Dispõe sobre aprovação do Teste de Polarização Fluorescente para utilização pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, no diagnóstico da brucelose bovina e Bubalina. **Diário Oficial da União**, n. 41, 22 de outubro de 2010, Seção 1, p. 9. 2010.

DE NARDI, G. **Perfil sorológico de anticorpos anti- *Leptospira spp.* em búfalas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose (Bacterina e Membrana externa).** 2005. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ERDENEBAATAR, J.; BAYARSAIKHAN, B.; WATARAI, M.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with *Brucella* species from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O9. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.4, p. 710–714, 2003.

FREUDENSTEIN, H.; HEIN, B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. **Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.229-234, 1991.

GODFROID, J.; SAEGERMAN, C.; WELLEMANS, V.; WALRAVENS, K.; LETESSON, J. J.; TIBOR, A.; MC MILLAN, A.; STEVE SPENCER, S.; SANNA, M.; BAKKER, D.; POUILLOT, R.; GARIN-BASTUJI, B. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when a specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 461-477, 2002.

KADLEK, V. Observation on the antigenic affinity of *Leptospira* and *Brucella* in the serological examination of cattle. **Veterinary Medicine (Praha)**, v. 23, n. 4, p. 213-218, 1978.

KITTELBERGER, R.; G. BUNDESEN P. G.; CLOECKAERT, A.; GREISER-WILKE, I.; LETESSON, J. J. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 60, n.1, p.45–57, 1998.

MATHIAS, L. A. CORBELLINI, L. G.; NASCIMENTO, L. M. 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**, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

MINEIRO, A. L. B. B.; BEZERRA, E. E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; COSTA, F. A. L.; MACEDO, N. A. Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1103-1109, 2007.

MOLNAR, L.; MOLNAR, E.; TURY, E.; SOUSA, J. S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 4, p.157-162, 1997.

MUNOZ, P. M.; MARIN, C. M.; MONREAL, D.; GONZALEZ, D.; GARIN-BASTUJI, B.; DIAZ, R.; MAINAR-JAIME, R. C.; MORIYON, I.; BLASCO, J. M. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 1, p. 141 – 151, 2005.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 447-459, 2002.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 25–30, 2004.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; YUA, W.; NICOLETTI, P.; JUNGENSEN G.; STACK, J.; GODFROID, J. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and

pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 1-2, p. 69–78, 2006.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B. et al. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v.87, n. 2, p.139 - 147, 2002.

RODRIGUES, R. O. **Imunogenicidade de bacterinas anti-leptospiras para bovinos produzidas no Brasil, 2006/7**. 2008. Dissertação (Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. 2.ed: Roca, 2004. 556p.

TIZARD I. R. **Imunologia Veterinária - Uma introdução**. 8 ed: Roca, 2009. 303p.

TONIN, A. A.; AZEVEDO, M. I.; SANTOS, L. G.; SILVA, A. S.; BADKE, M. R. T.; MARTINS, J. R. L.; OSS, M.; FÁBIO ALEXANDRE MARSON, F. A. Sulfato de Estreptomicina como auxiliar no tratamento de leptospirose melhorando índices reprodutivos em bovinocultura de leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.3, p.166-170, 2009.

VIANA, K. F.; ZANINI, M. S., MOREIRA, E. C. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Caparaó, estado do Espírito Santo. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 100-106, 2010.

WEYNANTS, V.; TIBOR, A.; DENOEL, P. A.; SAEGERMAN, C.; GODFROID, J.; THIANGE, P.; LETESSON, J. J. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9, a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. **Veterinary Microbiology**, v. 48, n. 1-2, p. 101-112, 1996.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (WHO). Bovine Brucellosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)**, 2009. v. 2. Cap. 2.4.3, p. 15.

CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES

Médicos veterinários devem sempre fazer uma investigação precisa no diagnóstico da brucelose bovina que é uma zoonose a qual pode causar diversos prejuízos econômicos. O Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) implantou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), e entre suas metas está o controle da doença através de métodos diagnósticos mais confiáveis.

O PNCEBT prevê a utilização de métodos de diagnósticos cada vez mais precisos, com melhor especificidade e sensibilidade, como foi demonstrado neste trabalho. Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, tanto o iELISA/B1119-3 e iELISA/LPS são alternativas eficazes, que, com apoio de laboratórios farmacêuticos, em breve poderá estar disponível no mercado.

A interferência nos testes de diagnóstico de brucelose em bovinos recém vacinados contra leptospirose registrados neste estudo é preocupante, pois de acordo com a legislação brasileira, os animais considerados positivos nos testes oficiais de brucelose devem ser sacrificados. Então, para evitar que bovinos sejam sacrificados desnecessariamente, recomenda-se que animais recém vacinados contra leptospirose sejam isolados do rebanho, por um período médio de 100 dias até que seja realizado um novo exame.

Os órgãos oficiais de defesa agropecuária do Brasil devem ser informados desta interferência no diagnóstico de brucelose bovina, para implementar a necessidade da criação de uma portaria complementar ao PNCEBT, visando minimizar a interferência nos testes de diagnóstico oficiais para brucelose.

Os médicos veterinários deverão ser atualizados para oferecer suporte técnico adequado aos produtores rurais. Estes por sua vez, devem buscar orientações com um médico veterinário habilitado para que não haja má interpretação e generalização dos resultados de diagnóstico.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Preparo de soluções e estatística do capítulo 2

Soluções para iELISA

PBS (Fosfato de sódio) pH 7,4

Na₂HPO₄ 1 M 68,4 mL

NaH₂PO₄ 1 M 31,6 mL

NaCl 2,5 M 58 mL

para 1000 mL de H₂O destilada

PBST pH 7,4

PBS adicionado de detergente tween 20 a 0,01% (v/v).

Calculo de sensibilidade e especificidade

iELISA/B1119-3	2ME		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	46	2	46
Negativo	0	44	46
Total	46	46	92

Sensibilidade (S) = $46/46+0 - S = 1.0 - 100\%$

Especificidade (E) = $44/2+44 - E = 0.956 - 95,6\%$

iELISA/LPS	2ME		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	45	04	46
Negativo	01	42	46
Total	46	46	92

Sensibilidade (S) = $45/45+1 - S = 0.978 - 97,8\%$

Especificidade (E) = $42/4+42 - E = 0.913 - 91,3\%$

Cálculo da comparação entre testes

- Teste de Kappa – iELISA/B1119-3 - 2ME

Dados Fornecidos

A = 45 B = 1
C = 4 D = 42

RESULTADO

Concordância observada: 0.9457
Concordância esperada.: 0.5000
Kappa.....: 0.8913
Z (Kappa).....: 8.5673
(p-valor).....: < 0.0001

- Teste de Kappa - iELISA/LPS - 2ME

Dados Fornecidos

A = 46 B = 0
C = 2 D = 44

RESULTADO

Concordância observada: 0.9783
Concordância esperada.: 0.5000
Kappa.....: 0.9565
Z (Kappa).....: 9.1833
(p-valor).....: < 0.0001

APÊNDICE B - Estatística e resultado de FC LANAGRO capítulo 3

Comparação entre grupo A e grupo B

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	120	0
Linha 2...:	115	5
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.0300$		
Bilateral...: $p = 0.0599$		

Comparação entre grupo A e grupo C

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	120	0
Linha 2...:	114	6
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.0147$		
Bilateral...: $p = 0.0293$		

Comparação entre grupo A e grupo D

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	120	0
Linha 2...:	110	10

RESULTADO

Unilateral.: $p = 0.0008$

Bilateral..: $p = 0.0016$

Comparação entre grupo A e grupo C

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	120	0
Linha 2...:	115	5

RESULTADO

Unilateral.: $p = 0.0300$

Bilateral..: $p = 0.0599$

Comparação entre grupo B e grupo C

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	115	5
Linha 2...:	114	6
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.5000$		
Bilateral...: $p = 0.7696$		

Comparação entre grupo B e grupo D

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	115	5
Linha 2...:	110	10
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.1430$		
Bilateral...: $p = 0.1965$		

Comparação entre grupo B e grupo E

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	115	5
Linha 2...:	115	5
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.6257$		
Bilateral..: $p = 1.0000$		

Comparação entre grupo C e grupo D

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	114	6
Linha 2...:	110	10
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.2193$		
Bilateral..: $p = 0.3165$		

Comparação entre grupo C e grupo E

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	114	6
Linha 2...:	115	5
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.5000$		
Bilateral..: $p = 1.0000$		

Comparação entre grupo D e grupo E

- Teste Exato de Fisher -

Dados Fornecidos		
	Col 1	Col 2
Linha 1...:	110	10
Linha 2...:	115	5
RESULTADO		
Unilateral.: $p = 0.1430$		
Bilateral..: $p = 0.2860$		

Formulário - FOR

FOR/DOB/PL/008 - V.5 - Resultado Final do Diagnóstico de Brucelose

Página: 1 de 2

Doc. DOB/BRU Nº: 012 / 11		Registro no DOB: DB /071/10	
Registro na REC: BI / 2301 / 10		Nº de Amostras: 26	
Proprietário: Não informado		Espécie animal: Bovina	
Propriedade: Não Informado		Material(is) enviado(s): Soro sanguíneo	
Município: Uberlândia		UF: MG	Exame(s) requisitado(s): FC
Requisitante (Órgão de Defesa Oficial):		Endereço: Av. Pará, 1720. Campus Umuarama, Bloco 2T	
João Helder Frederico de Faria Naves		Município: Uberlândia	Fone: (34)3218-2228
(Faculdade de Medicina Veterinária/UFU)		UF: MG	CEP: 38.400-902 Fax: (34)3219-0005

Identificação da Amostra	Testes						Observações
	TAL	AAT	SAL	2-ME	FC	DBac	
1	---	---	---	---	NR	---	---
2	---	---	---	---	NR	---	---
3	---	---	---	---	NR	---	---
4	---	---	---	---	NR	---	---
5	---	---	---	---	NR	---	---
6	---	---	---	---	NR	---	---
7	---	---	---	---	NR	---	---
8	---	---	---	---	NR	---	---
9	---	---	---	---	NR	---	---
10	---	---	---	---	NR	---	---
11	---	---	---	---	NR	---	---
12	---	---	---	---	NR	---	---
13	---	---	---	---	NR	---	---
14	---	---	---	---	NR	---	---
15	---	---	---	---	NR	---	---
16	---	---	---	---	1:2	---	---
17	---	---	---	---	NR	---	---
18	---	---	---	---	NR	---	---
19	---	---	---	---	1:2	---	Apresentou reação anticomplementar
20	---	---	---	---	NR	---	---
21	---	---	---	---	NR	---	---
22	---	---	---	---	NR	---	---
23	---	---	---	---	NR	---	---

TAL: Teste do Anel do Leite (MET/DOB/PL/010-v.1); AAT: Antígeno Acidificado Tamponado (MET/DOB/PL/009-v.1); SAL: Seroglutinação Leite; 2-ME: 2-Mercaptoetanol (MET/DOB/PL/004-v.2); FC: Fixação de Complemento (MET/DOB/PL/005-v.2); DBac: Diagnóstico Bacteriológico (MET/DOB/PL/003-v.2); R: Reagente; NR: Não Reagente

Observações: ---

Este formulário tem validade apenas se reproduzido completo.

Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados nas condições do recebimento no laboratório.

A interpretação dos resultados é de responsabilidade do solicitante com base no histórico do animal e/ou rebanho e legislação vigente.

Responsável

Marina de Azevedo Issa
Fiscal Federal Agropecuária
CRMV-MG 9771

07 / 01 / 2011
Data de entrega do resultado



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 009/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 109/10

Projeto Pesquisa: “Reatividade cruzada nos testes de diagnóstico de brucelose em bovinos leiteiros recém vacinados para leptospirose”.

Pesquisador Responsável: Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 16 de fevereiro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU

