
PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDO COMO ANTÍGENO A CEPA DE *B. abortus* INATIVADA

Standardization and evaluation of sensitivity and specificity of an indirect ELISA test for the diagnostic of bovine brucellosis using as antigen a strain of inactivated B. abortus

**Vitor Borges Putini^a, Rodrigo Bonfim Cruz^a, Gabriela dos Santos Santana^a,
Jaqueline Santos Jorge^a, Diógenis Lima da Silva^b, Margareth Moura^c,
Renato Carminati^d, Robson Bahia Cerqueira^e**

^a Discente do Curso de Medicina Veterinária da Unime, Lauro de Freitas, BA - Brasil, e-mail: robsonba@gmail.com

^b Auxiliar de Saúde do Laboratório de Doenças Infecciosas (INIME/LADI), Salvador, BA - Brasil, e-mail: diogenisl@hotmail.com

^c Médica Veterinária do Centro de Desenvolvimento da Pecuária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA - Brasil, e-mail: robsonba@gmail.com

^d Médico Veterinário, Professor orientador e responsável pelo Laboratório de Doenças Infecciosas, Mestre e Doutorando em Imunologia da Unime, Lauro de Freitas, BA - Brasil, e-mail: rcarminat@gmail.com

^e Médico Veterinário, Professor de Microbiologia da Unime, Lauro de Freitas, BA - Brasil, e-mail: robsonba@gmail.com

Resumo

A brucelose é uma enfermidade infecciosa de caráter crônico que acomete os animais domésticos gerando grandes prejuízos à pecuária, além de ser uma grave zoonose ocupacional e de origem alimentar. Isso fez com que alguns países adotassem medidas para sua erradicação ou diminuição da sua ocorrência através de métodos de diagnóstico confiáveis, de fácil execução além de recursos para sua realização. O presente trabalho teve como objetivo padronizar um Ensaio Imunoenzimático Indireto para o diagnóstico da brucelose bovina, utilizando como antígeno a linhagem *Brucella abortus* inativada, na concentração de 4,5% produzido para prova lenta em tubo. Desse modo, foram selecionadas 91 amostras de soro de vacas procedentes de fazendas produtoras de leite, submetidas ao Ensaio Imunoenzimático Indireto, das quais 45 foram reagentes ao AAT e 46 não reagentes ao teste referido. As 45 amostras reagentes ao AAT, 35 foram também reagentes ao ELISA indireto. Todas as amostras não reagentes ao teste de triagem foram negativas ao ELISA indireto. Logo, observou-se que o Ensaio Imunoenzimático Indireto apresentou sensibilidade de 77,8% e especificidade de 100%, mostrando ainda uma concordância de 89%.

Palavras-chave: Teste Elisa; Brucelose bovina; *Brucella abortus*; Diagnóstico.

Abstract

*Brucellosis is a chronic infectious disease that affects domestic animals generating large losses to livestock besides being a serious occupational zoonosis and of nutritional origin. These problems have driven some countries to adopt measures aiming to eradicate them or to decrease its occurrence through reliable methods of diagnosis and easy addition of resources for its implementation. The present research work aimed to standardize an indirect immunoenzymatic test for the diagnosis of bovine brucellosis, as the antigen lineage *Brucella abortus* 1119-3 heat inactivated producing evidence of slowing in tube at the concentration of 4,5%. In this way, a total of 91 sera samples were selected from cows from milk production farms, all of them subjected to the indirect immunoenzymatic test. From this total, 45 samples were reagents to the AAT and 46 were not. From the 45 reagent samples, 35 were also reagent to the indirect ELISA. All the non reagent samples were also negative for the indirect ELISA. It has been then observed that the indirect immunoenzymatic test displayed a total sensitivity of 77,8% and a specificity of 100% showing also an agreement as high as 89%.*

Keywords: *Elisa test; Ovine brucellosis; *Brucella abortus*; Diagnostic.*

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma enfermidade infecciosa grave que acomete os animais domésticos, caracterizada por aborto e infertilidade, acometendo bovinos, bubalinos, suínos, ovinos, caprinos e equinos, gerando grandes prejuízos à pecuária, além de ser uma grave zoonose ocupacional e de origem alimentar (FREITAS et al., 2000). Enfermidade cosmopolita descrita na maioria dos países, principalmente os mais pobres, porém, algumas nações conseguiram reduzir a sua prevalência ou mesmo erradicá-la (MATHIAS; MEIRELLES; BUCHALA, 2007). Ortolani et al. (1987) relataram que no Brasil a brucelose é considerada como uma enfermidade endêmica, sendo encontrada em todo território nacional. O agente etiológico da brucelose bovina é a *Brucella abortus*, que durante sua evolução desenvolveu mecanismos para conviver com seus hospedeiros, particularmente os bovinos, permitindo sua sobrevivência no organismo hospedeiro por períodos prolongados, favorecendo a disseminação do patógeno na população (SILVA et al., 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente, a verdadeira frequência de casos de brucelose poderá ser cinco ou mais vezes superior do que os números oficiais em consequência do subdiagnóstico e a subdeclaração "obrigatória", mesmo nos países desenvolvidos (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003). Molnar et al. (2000) demonstraram como principais características da doença, aborto, mortalidade perinatal, nascimento de bezerras pequenos e fracos, queda na produção leiteira e infertilidade, ressaltando seu impacto na saúde pública. A maioria dos países desenvolvidos adotou medidas destinadas à sua erradicação, que iniciaram há mais de 20 anos, enquanto em outros, como a França e os EUA, mantêm-na controlada. A produtividade dos rebanhos está diretamente relacionada com a sanidade, o combate à brucelose é de extrema importância para evitar maiores prejuízos ao rebanho, e deve ser realizado de forma eficaz através do conhecimento do agente causador, seu local de atuação e sua frequência de ocorrência, o que leva a uma dependência de métodos de identificação dos animais ou rebanhos infectados (RIBEIRO et al., 2003). O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose recomenda o teste do Rosa de Bengala (antígeno acidificado tamponado [AAT]) como teste de triagem, no caso de soros positivos, podendo ser confirmados pela combinação da prova de soroaglutinação lenta com a prova do 2-mercaptoetanol ou pela prova de fixação de complemento (MATHIAS; MEIRELLES; BUCHALA, 2007). O presente trabalho teve como objetivo padronizar e avaliar a sensibilidade e especificidade de um teste Elisa indireto para o diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno cepa de *B. abortus* inativada.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

Foram utilizadas 91 amostras de soro de vacas da raça girolando procedentes de fazendas produtoras de leite. Quarenta e cinco animais foram vacinados, com inoculação realizada na idade tradicional (3-8 meses) e que no momento da coleta apresentavam-se com idade entre três e cinco anos, com reação para os testes Antígeno Acidificado Tamponado, Soro Aglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol. Quarenta e seis animais apresentavam-se com idade superior a 24 meses, também vacinados na idade tradicional, mas não reagentes para os testes AAT, SAL e 2-ME. Esses soros foram cedidos gentilmente pela Clinilab (Clínica e Laboratório de Reprodução) e Laboratório de Zoonoses da Universidade Federal da Bahia, contendo em cada alíquota aproximadamente 1,5 ml.

Ensaio imunoenzimático indireto

O antígeno utilizado foi o mesmo que se utiliza para a prova de soroaglutinação lenta, com concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, inativada pelo calor, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Partida: 001/06 e data de fabricação: Fev/06. A padronização utilizada foi na diluição de 1:50. Realizou-se uma placa com as seguintes diluições, antígeno puro, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e observou-se que o melhor resultado encontrado foi 1:50 (FREY; DI CANZIO; ZURAKOWSKI, 1998). O protocolo foi padronizado no Laboratório de Doenças Infecciosas da Unime. Primeiramente o antígeno foi diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 para sensibilização da placa; com uma micropipeta acrescentou-se 100ml do antígeno em cada poço da placa com 96 poços colocada em câmara úmida, mantida "over night" à temperatura entre 4 a 8°C. Depois de retirada da geladeira a placa foi lavada duas vezes com PBS-T e iniciou-se o bloqueio com leite desnatado a 5%, adicionado 200ml por poço da placa que foi levada dentro de uma câmara úmida para estufa a 37°C por duas horas. Depois de retirada da estufa, a placa foi lavada uma vez com PBS-T. Procedeu-se a diluição do soro na concentração de 1:10.000 seguindo o protocolo seguinte: foram colocados 45 tubos ependorf, devidamente identificados na galeria e, após diluição do leite desnatado a 1% em 50ml de PBS-T, foi transferida 1 ml dessa diluição para cada ependorf. Acrescentou-se em seguida 10ml de cada soro conforme mapa de identificação, num total de 45 amostras. Após essa operação foram retirados 50ml dessa diluição e colocados em duplicata em cada poço da placa que foi levada para a estufa a 37°C por 1 hora. Depois de retirada da estufa, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T e, em seguida, diluiu-se 10ml do conjugado anti-IgG caprino em 10ml de PBS-T em diluição 1:10.000, transferindo-se 50ml dela em cada poço da placa que foi levada para a estufa a 37°C por uma hora. Após isso, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T. Preparou-se a solução reveladora, na qual se diluiu 4ml de água oxigenada, 4mg de OPD (ortosenilenodiamino) em 10 ml de tampão citrato pH 5,1. Acrescentou-se, então, 50ml dessa diluição em cada poço da placa que foi guardada sem exposição da luz para revelação entre 15 e 20 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N e realizou-se a leitura da placa em filtro de 490 nm.

Antígeno acidificado tamponado

O antígeno utilizado foi produzido no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e adquirido pelo órgão de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB). A linhagem utilizada foi a *Brucella abortus* 1119-3, na concentração celular de 4%, inativada pelo calor e corada pela Rosa de Bengala. Partida: 002/05 e data de fabricação: Mar/05. O protocolo foi realizado conforme recomendação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina (PNCEBT) organizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os soros assim como o antígeno, foram retirados respectivamente do congelador e da geladeira, colocados à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, as amostras de soro foram organizadas em galeria,

identificadas em uma ficha de controle interno do Laboratório de Doenças Infecciosas, homogeneizado e, com uma micropipeta, retirados 30µl e colocado, com um ângulo de 45°, em placa de vidro. O antígeno foi colocado ao lado na mesma quantidade, sem que tivesse contato com o soro. Após homogeneização, foram realizadas, com a ajuda de um bastão, movimentos circulares 30 vezes/minuto aproximadamente, durante 4 minutos. A leitura foi feita com o auxílio de caixa de fundo escuro e a identificação da reação foi observada pela presença ou não de grumos.

Prova do 2-Mercaptoetanol (2-ME)

O antígeno utilizado foi o mesmo que se utiliza para a prova de soroaglutinação lenta, com concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 1119-3 de *Brucella abortus* inativada pelo calor, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Partida: 001/06 e data de fabricação: Fev/06. O protocolo foi realizado conforme recomendação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) organizado pelo Ministério da Agricultura (MAPA). Os soros reagentes, na prova do AAT, foram identificados, homogeneizados e submetidos à prova do 2-Mercaptoetanol e Soro Aglutinação Lenta. Com a pipeta de Bang, os soros foram colocados em tubos identificados com as respectivas numerações, cada amostra possuindo 4 tubos, com distribuição de 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml, 0,01ml do soro. O 2-ME foi diluído a uma concentração de 0,78% em solução salina a 0,85%, e colocado 1 ml em cada tubo contando 30 minutos de repouso e, em seguida, foi adicionado 1 ml do antígeno diluído em solução salina a 2%. Após 48 horas foi realizada a leitura, com o teste controle positivo e negativo, e analisada as precipitações com formação de grumos e classificados como reagentes de acordo com as diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200.

Prova da soroaglutinação lenta (SAL)

O antígeno utilizado apresenta concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 1119-3 de *Brucella abortus* inativada pelo calor, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Partida: 001/06 e data de fabricação: Fev/06. O protocolo foi realizado conforme recomendação do Programa de Controle da Brucelose e Tuberculose bovinas organizado pelo Ministério da Agricultura. Os soros reagentes na prova do AAT foram identificados, homogeneizados e submetidos à prova do SAL. Com a pipeta de Bang, os soros foram colocados em tubos identificados com as respectivas numerações, cada amostra possuindo 4 tubos, com distribuição de 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml, 0,01ml. O fenol foi diluído a 0,5% em solução salina a 0,85% e o antígeno diluído a 1% na solução salina fenicada. Em seguida, foi adicionado 2 ml em cada tubo. Após 48 horas foi realizada a leitura, com o teste controle positivo e negativo, e analisada as precipitações com formação de grumos e classificadas como reagentes de acordo com as diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200.

Estudo Estatístico

O “*cut-off*” calculado através da média da Densidade Ótica dos animais não reagentes + 3 desvio padrão (FREY et al., 1998). A concordância entre os dois testes foi calculada por meio da fórmula citada por MATHIAS et al. (1998).

$$\frac{\text{Positivos em ambos os testes} + \text{negativos em ambos os testes} \times 100}{\text{Total de soros testados}}$$

Determinação da sensibilidade e especificidade

A fórmula utilizada foi baseada no estudo de Mathias et al. (1998) conforme representação abaixo:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Doentes detectados pelo teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Sãos negativos ao teste}}{\text{Total de sãoos testados}} \cdot 100$$

Para determinar a sensibilidade e especificidade relativa do teste ELISA indireto, foram considerados doentes os animais positivos no teste Rosa de Bengala e no ELISA indireto, e sadios os animais negativos nessas duas provas.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{35}{45} \cdot 100 = 77,8\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{46}{46} \cdot 100 = 100\%$$

RESULTADOS

Das 91 amostras analisadas neste experimento todas foram submetidas ao teste do Antígeno Acidificado Tamponado, no qual se obteve 46 amostras não reagentes e 45 reagentes, Figura 1.

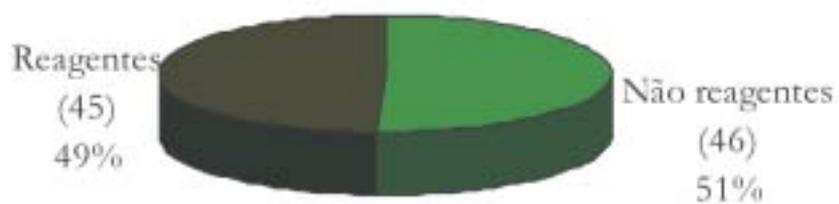


FIGURA 1 - Amostras de soro bovino submetidos ao teste do AAT
Figure 1 - Samples of bovine serum subjected to the test of the AAT

Todas as amostras foram submetidas ao teste do 2-mercaptoetanol, no qual se verificou que as 45 amostras reagentes ao AAT apresentaram titulação a partir de 1:25 e as 46 não reagentes ao referido teste também foram não reagentes ao 2-ME, obedecendo a tabela de animais com idade superior a 24 meses preconizada pelo PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose).

As 91 amostras foram submetidas ao teste ELISA indireto, observando-se que das 45 reagentes ao teste AAT, 35 apresentaram valores de Abs acima do “cut-off” (0,122) com Absorbância variando entre 0,125 a 0,314, representado na Figura 2, onde a concordância entre os testes foi de 89%, a sensibilidade de 77,8% e especificidade de 100%. Nas amostras não reagentes ao AAT foram encontrado valor de D.O. de 0,078 a 0,122, representado na Figura 3.

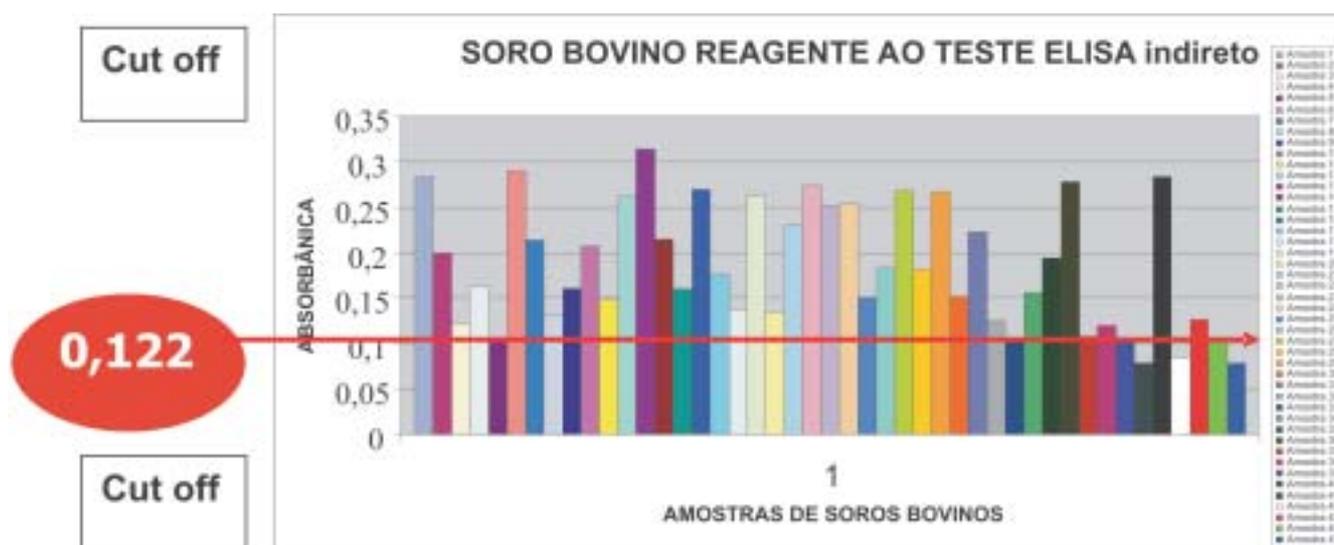


FIGURA 2 - Valores de absorbância de soro de bovinos reagentes ao Teste ELISA indireto
 Figure 2 - Values of absorbance of bovine serum reacting to the indirect ELISA test



FIGURA 3 - Valores de absorbância de soros bovinos não reagentes ao Teste ELISA indireto
 Figure 3 - Values of absorbance of bovine serum not reacting to the indirect ELISA test

Percebe-se que o teste ELISA indireto, padronizado com o antígeno da *Brucella abortus* 1119/3 para Prova Lenta, consegue discriminar animais que foram expostos ao patógeno e com sorologia reagente nos testes de triagem dos animais não expostos e com sorologia não-reagente aos referidos testes, evidenciado na Figura 4.

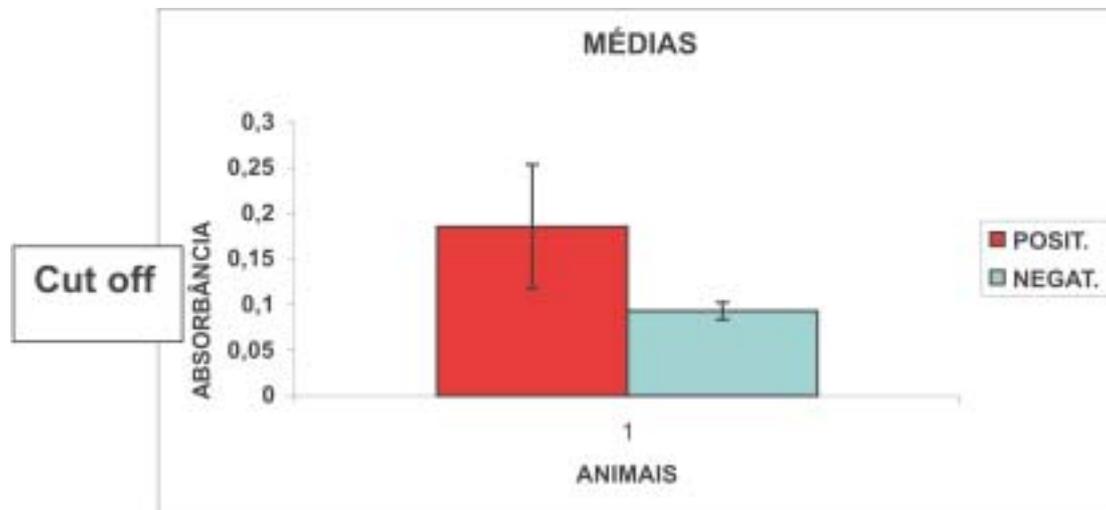


FIGURA 4 - Média das absorbâncias dos animais reagentes e não reagentes às técnicas de rotina para o diagnóstico da brucelose, submetidos ao Teste ELISA indireto

Figure 4 - Average of reagents and not reagents animals to the routine techniques for brucellosis diagnosis submitted to the indirect ELISA test

O cálculo da concordância entre os testes foi verificado através da fórmula preconizada por Mathias et al. (1998), identificando-se valores em torno de 89%. Com relação à sensibilidade e à especificidade entre os testes constatou-se os resultados, conforme apresentados na Quadro 1:

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Elisa Indireto	77,8	100
Antígeno acidificado tamponado	100	95 C/ relação 2-ME(Greve, 2007)
2- Mercaptoetanol	88	100C/ relação AAT (Greve, 2007)

QUADRO 1 - Sensibilidade e especificidade dos testes de rotina comparado com teste ELISA indireto
Chart 1 - Sensitivity and specificity of the routine tests compared with indirect ELISA test

DISCUSSÃO

Molnar et al. (2000) afirmam, após utilizar 3.338 amostras de soro, que o teste ELISA indireto apresentou superioridade em relação à fixação de complemento, pois no total de 626 soros positivos, somente o ELISA indireto confirmou a positividade em 249 amostras, e apenas 45 soros mostraram-se positivos no teste de fixação de complemento. Observa-se, no presente experimento, que o teste ELISA se comporta com a mesma superioridade, diferenciando animais infectados reagentes no teste de animais não infectados. Com o objetivo de avaliar e comparar a prova de imunodifusão em gel de agarose utilizando extrato polissacarídico POLI O, obtido da amostra *B. abortus* 1119-3 com as provas sorodiagnósticas convencionais para brucelose bovina, Megid et al. (2000) relataram que animais naturalmente infectados, com baixos títulos de anticorpos em provas como soro aglutinação lenta,

fixação de complemento e ELISA, não apresentaram reação de precipitação na prova de imunodifusão. Após avaliação de 273 soros de bovinos com histórico de brucelose, através da comparação entre o teste imunoenzimático competitivo empregando o conjunto preparado com soro policlonal com o teste de fixação de complemento, foram observados títulos de anticorpos em 32,93% dos soros detectados pelo teste enzimático e 28,51% no teste fixação de complemento, mostrando uma pequena superioridade do teste imunoenzimático (MATHIAS; MACMILLAN, 1995).

Jardim et al. (2006), com o intuito de avaliar o desempenho de dose reduzida da vacina B19 em rebanho bovino adulto, por meio de técnicas de diagnóstico sorológico, relataram resultados positivos distintos como 46,77% para a FC, 67,74% para o AAT, de 87,09% para a SAL com 2-ME e de 100% para o ELISA indireto. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, verificando-se um poder de discriminação entre os animais não reagentes dos reagentes. Mathias et al. (1994), comparando resultados do teste imunoenzimático competitivo (TIEC), empregando como conjugado anticorpos monoclonais produzidos por dois clones de hibridomas, denominados de BM-38 e BM-40, preparados a partir da imunização de camundongos com *Brucella melitensis* 16M, foi observado que o TIEC, usando conjugado preparado com os anticorpos monoclonais BM-40, apresentou maior poder de discriminação que o mesmo teste usando o conjugado BM-38, identificando a importância na padronização das fases de testes como este. Molnár et al. (2002), após fazerem um levantamento sorológico com amostras colhidas de 440 soros bubalinos compararam resultados obtidos de seis testes sorológicos e obtiveram sensibilidade e especificidade respectivamente de 100% e 99,03% no ELISA competitivo, 98,57% e 97,33% no ELISA indireto com conjugado antibovino de cadeia leve (anticorpo monoclonal), 97,14% e 95,66% no ELISA indireto com conjugado contra IgG bovino total, 91,42% e 94% no teste do antígeno acidificado tamponado e 79,28% e 86,33% na aglutinação rápida.

Os resultados do presente experimento foram semelhantes, pois a sensibilidade apresentada foi de 77,8% e a especificidade de 100%. Mathias et al. (1998), após avaliarem em bubalinos o teste de ensaio imunoenzimático competitivo (CEIA) e posterior comparação com resultados obtidos com o Teste Fixação de Complemento (CFT) e o Rosa de Bengala (RBT), os resultados mostraram concordância de 97,42% entre o CEIA e o CFT e uma concordância de 95,39% entre o CEIA e o RBT. A sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 100% e 98,55%. O ELISA indireto desenvolvido nesse experimento apresentou uma sensibilidade discordante dos resultados obtidos no referido trabalho e uma especificidade com pequena diferença, demonstrando a superioridade do ELISA competitivo comparado ao ELISA indireto como preconizado pela literatura. Vanzini et al. (2001) utilizaram 31 amostras de leite obtido de 2 rebanhos com o intuito de comparar o teste ELISA indireto com o teste do anel de leite, obtendo diferentes diagnósticos. A titulação de 1:10 foi encontrada em 4 amostras e foi considerada negativa para o teste do anel de leite, porém foi positiva ao ELISA. As amostras positivas em ambos os testes apresentaram diferentes valores, a titulação do teste do anel de leite variou de 1:10 até 1:480, enquanto no ELISA variou de 1:10 até 1:3200. Erdenebaatar et al. (2003), com o objetivo de diferenciarem animais naturalmente infectados por *Brucella spp.* de *Y. enterocolitica* 09, antígenos foram extraídos da *B. abortus* cepa 544 com n-lauroilsarcosina, sendo utilizado o teste imunoenzimático e testado a sua especificidade. O teste ELISA foi aplicado em 59 vacas, das quais 10 foram positivas para o antígeno acidificado tamponado, e 2 das 59 foram negativas para um ELISA utilizando extratos de sarcosina, sugerindo que ambas podem estar infectadas com *Y. enterocolitica* 09 e que o ELISA é uma prova capaz de diferenciar animais expostos a diferentes patógenos. Romero et al. (1995), com o objetivo de comparar PCR com ELISA utilizaram 56 amostras de leite positivas para o diagnóstico da brucelose bovina, das quais 49 amostras foram positivas para o PCR e apenas 1 amostra foi negativa para o ELISA, que apresentou sensibilidade de 98,2% e especificidade de 100%. Alonso-Urmeneta et al. (1998) investigaram se o epítipo, estrutura de lipopolissacarídeo O, é relevante para o ELISA indireto no diagnóstico da brucelose animal e se o teste precisa ser adaptado para vacas, cabras e ovelhas, além de avaliar também se o teste detecta anticorpos contra LPS. Nesse experimento verificou-se um bom desempenho com o antígeno utilizado, pois ele consegue detectar anticorpos contra LPS (lipopolissacarídeos) da linhagem de *Brucella* utilizada como antígeno. Contudo, faz-se necessário uma investigação mais apurada da interação Ag-Ac (antígeno-anticorpo), com o objetivo de se detectar

anticorpos para *Brucella abortus* utilizando-se dois testes ELISA indiretos e dois testes ELISA competitivo e comparar com outros testes. A porcentagem de animais positivos no ELISA competitivo relativo ao teste Rosa de Bengala e fixação de complemento foi de 98,32% e a porcentagem de animais negativos em vacas vacinadas com *B. abortus* 19 foi de 96,51%.

CONCLUSÃO

As provas preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina são testes de fácil padronização nos laboratórios, baixo custo e com boa dinâmica no que se refere à sensibilidade e especificidade, mas faz-se necessário provas diagnósticas menos subjetivas.

O presente trabalho demonstrou que o ELISA indireto pode ser utilizado na rotina de diagnóstico da enfermidade, uma vez que consegue diferenciar animais naturalmente infectados dos não infectados, contribuindo com formas de diagnóstico mais eficazes.

O teste ELISA indireto, apesar de ser um teste que exige uma melhor infraestrutura do laboratório executor e de mão-de-obra especializada, consegue discriminar as amostras de animais infectados das de animais não infectados, além de possibilitar um maior número de amostras executadas.

Constatou-se especificidade em torno de 100% e sensibilidade em torno de 77,8%; observou-se uma concordância entre os testes AAT e ELISA indireto de 89%. O AAT prevalece como um teste de triagem por ser rápido, de baixo custo e alta sensibilidade comparado aos testes SAL e 2-ME.

REFERÊNCIAS

ALONSO-URMENETA, B. et al. Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 6, p. 749-754, 1998.

ERDENEBAATAR, J. et al. 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. 10, n. 4, p. 710-714, 2003.

FREITAS, J. A. et al. Infecção brucélica em animais abatidos para consumo. **O Biológico**, v. 62, n. 1, p. 1-3, 2000.

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. et al. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 177-182, 2006.

MATHIAS, L. A. et al. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo na diferenciação de anticorpos induzidos pela vacina B19, no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 19-23, 1994.

_____. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus Bubalis*). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 3/4, p. 111-114, 1998.

MATHIAS, L. A.; MACMILLAN, A. P.; Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 101-105, 1995.

MATHIAS, L. A.; MEIRELLES, R. B.; BUCHALA, F. G. Estabilidade do antígeno de célula total de *Brucella abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose bovina pela reação de fixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v. 27, n. 1, p. 18-22, 2007.

MEGID, J. et al. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado, e 2-ME no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v. 37, n. 5, 2000.

MOLNÁR, E. et al. 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. et al. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v. 22, n. 2, p. 41-44, 2002.

ORTOLANI, E. L. et al. Acompanhamento sorológico de bovinos adultos vacinados com amostra B19. Teste de soroaglutinação lenta e 2-Mercaptoetanol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 377-386, 1987.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose - uma revisão Sistematizada. **Medicina Interna**, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

RIBEIRO, A. R. P. et al. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 55, n. 1, p. 120-122, 2003.

ROMERO, C. et al. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 33, n. 12, p. 3198-3200, 1995.

SILVA, F. L. et al. Brucelose bovina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 1-12, 2005.

VANZINI, V. R. et al. 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, p. 55-60, 2001.

Recebido: 14/04/2008

Received: 04/14/2008

Aprovado: 23/04/2008

Approved: 04/23/2008