

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n12a716.1-9>

Avaliação de teste imunoenzimático indireto (ELISAi) para anticorpos vacinais anti *Brucella abortus* B19

Diana Maria Lima Lossano¹, Ligia Isabelle Silva Souza², Lhydyany Gonçalves Furtado de Melo², Ana Paula Madureira³, Dirlei Molinari Donatele⁴, Marcos Santos Zanini^{4*}

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo

²Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre – ES Brasil.

³Docente, Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento Engenharia Biossistemas, São João del-Rei – MG Brasil

⁴Docente, Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Medicina Veterinária. Alegre – ES Brasil

*Autor para correspondência, E-mail: marcos.zanini@ufes.br

Resumo. A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa provocada tradicionalmente pela bactéria *Brucella abortus*. O diagnóstico por métodos sorológicos e a vacinação com a cepa *B. abortus* B19 são as formas convencionais e tradicionais de controle da doença. O teste sorológico de triagem oficial padrão no Brasil é o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Entretanto, não é aceito internacionalmente sendo necessários outros testes para sua validação quando de exportação de animais. Diante do exposto, objetivou-se avaliar e validar um protocolo de ELISA indireto para soro de animais vacinados, tendo como antígeno para sensibilização da placa de poliestireno moléculas solúveis extraídas de uma vacina comercial de *B. abortus* amostra B19. Em paralelo, o teste AAT foi utilizado como controle para os resultados obtidos. Para tanto, foram coletados soros de 22 novilhas vacinadas com B19 em propriedades rurais da região do estado do Espírito Santo, Brasil, nos tempos máximos de oito, 12 e 16 meses após vacinação e submetidos aos testes ELISA indireto e AAT para verificar a presença qualitativa de anticorpos. Os resultados foram avaliados pelos testes estatísticos de qui-quadrado de duas variáveis para verificar associação entre os resultados. Calculou-se o índice de concordância Kappa e também sensibilidade e especificidade, e valores preditivos positivo e negativo. O protocolo de ELISAi utilizando antígenos solúveis de *B. abortus* deste experimento mostrou sensibilidade (0,7826) e especificidade (0,3023) atingindo o objetivo deste experimento para detecção de anticorpos anti *Brucella* em novilhas vacinadas com B19 nos tempos de oito, 12 e 16 meses pós vacinação. Entretanto, observou-se que não existiu uma associação significativa entre os resultados dos testes AAT e ELISAi realizados como mostra o teste de qui-quadrado para tabela de contingência 2x2 ($\chi^2 = 0,545$, $P = 0,46$).

Palavras chave: Brucelose, diagnóstico, sorologia

*Evaluation of indirect immunoenzymatic test (ELISAi) for vaccine antibodies against *Brucella abortus* B19*

Abstract. Bovine brucellosis is an infectious disease caused traditionally by the bacteria *Brucella abortus*. Diagnosis by serological methods and vaccination with the *B. abortus* B19 strain are the conventional and traditional forms of disease control. The standard official serological screening test in Brazil is Acidified Buffered Antigen (AAT), however, it is not accepted internationally and further tests are necessary for its validation when exporting animals. That said, the objective was to evaluate and validate an indirect ELISA protocol for serum from vaccinated animals having soluble molecules extracted from a commercial vaccine of *B. abortus* sample B19 as the antigen for sensitizing the polystyrene

plate. In parallel, the AAT test was used as a control for the results obtained. For this, sera were collected from 22 heifers vaccinated with B19 in rural properties in the municipalities of Jerônimo Monteiro, Alegre, and São José do Calçado, state of Espírito Santo, Brazil at the maximum times of 8, 12, and 16 months after vaccination and submitted indirect ELISA and AAT tests to verify the qualitative presence of antibodies. The results were evaluated using the chi-square statistical tests of two variables to verify the association between the results. The Kappa agreement index was calculated, as well as sensitivity and specificity, and positive and negative predictive values. The ELISAI protocol using soluble *B. abortus* antigens in this experiment showed sensitivity (0.7826) and specificity (0.3023), reaching the objective of this experiment for detecting anti-*Brucella* antibodies in impoverished heifers vaccinated with B19 in the ages of 8, 12, and 16 months after vaccination. However, it was observed that there is no significant association between the results of the AAT and ELISAI tests, as shown by the chi-square test for the 2x2 contingency table ($\chi^2 = 0.545$, $p = 0.46$).

Keywords: Brucellosis, diagnosis, serology

Evaluación de la prueba inmunoenzimática indirecta (ELISAI) para anticuerpos de vacuna contra *Brucella abortus* B19

Resumen. La brucelosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa causada tradicionalmente por la bacteria *Brucella abortus*. El diagnóstico por métodos serológicos y la vacunación con la cepa *B. abortus* B19 son las formas convencionales y tradicionales de control de enfermedades. La prueba de detección serológica oficial estándar en Brasil es el Antígeno Tamponado Acidificado (AAT), sin embargo, no se acepta internacionalmente y se necesitan más pruebas para su validación al exportar animales. En vista de lo anterior, el objetivo fue evaluar y validar un protocolo ELISA indirecto para suero de animales vacunados, teniendo moléculas solubles extraídas de una vacuna comercial de la muestra de *B. abortus* B19 como el antígeno para sensibilizar de la placa de poliestireno. Paralelamente, la prueba AAT se utilizó como control para los resultados obtenidos. Con este fin, se recogió suero de 22 novilla vacunadas con B19 en propiedades rurales del estado de Espírito Santo, Brasil, en los tiempos máximos de ocho, 12 y 16 meses después de la vacunación y se realizaron pruebas indirectas de ELISA y AAT para verificar la presencia cualitativa de anticuerpos. Los resultados se evaluaron utilizando las pruebas estadísticas chi-cuadrado de dos variables para verificar la asociación entre los resultados. Se calculó el índice de concordancia de Kappa, así como la sensibilidad y especificidad, y los valores predictivos positivos y negativos. El protocolo ELISAI utilizando antígenos de *B. abortus* solubles de este experimento mostró sensibilidad (0,7826) y especificidad (0,3023) alcanzando el objetivo de este experimento para detectar anticuerpos anti-*Brucella* en novillas vacunadas con B19 en los tiempos de ocho, 12 y 16 meses después de la vacunación. Sin embargo, se observó que no existe una asociación significativa entre los resultados de las pruebas AAT y ELISAI como se muestra en la prueba de chi-cuadrado para la tabla de contingencia 2x2 ($\chi^2 = 0,545$, $p = 0,46$).

Palabras clave: Brucelosis, diagnóstico, serología

Introdução

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa zoonótica provocada pela espécie *Brucella abortus*, coco bacilos gram-negativos, imóveis, parasitismo intracelular facultativo infectando animais e o homem (Brandão et al., 2011). As principais manifestações nos bovinos são abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e baixa produção de leite (Lawinsky et al., 2010; Sola et al., 2014). O diagnóstico da brucelose pode ser feito com uso de técnicas diretas ligadas à identificação do microrganismo ou técnicas indiretas com a detecção de anticorpos contra *B. abortus*. Como testes indiretos oficiais de triagem tem-se os testes de soro aglutinação como o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o Teste do Anel em Leite (TAL). Entretanto, outros testes diretos e indiretos de

diagnóstico para brucelose poderão ser utilizados para complementar ou substituir os testes especificados segundo a legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ([Brasil, 2017](#)). O teste imune enzimático indireto também chamado ELISAI (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é equivalente ao teste oficial AAT quanto a sensibilidade e especificidade ([Molnár et al., 2002](#); [Paulin et al., 2009](#); [Simpson et al., 2018](#)). Assim, como contribuição para os estudos quanto aos métodos de diagnóstico para brucelose bovina, desenvolveu-se um protocolo de ELISAI, tendo como antígeno, para sensibilização da placa de poliestireno, moléculas solúveis de uma vacina comercial de *Brucella abortus* amostra B19 lisada pelo processo de congelamento/descongelamento. Esse processo libera, além dos constituintes da membrana externa, diversos outros antígenos bacterianos que podem ser indutores de produção de anticorpos ([Berman et al., 1980](#)). Para avaliação destes anticorpos, pesquisou-se a presença de anticorpos anti *Brucella* em fêmeas impúberes vacinadas com B19 nos tempos de oito, doze e dezesseis meses pós vacinação.

Material e métodos

Este estudo está aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – Campus Alegre, UFES sob o número 014/2019. Foram selecionadas 22 novilhas que haviam sido vacinadas com Brucelina B-19 Valée® (Valée S/A, Montes Claros, MG) partida 023/2018 com idade média de sete meses vida pertencentes a propriedades rurais dos municípios de Jerônimo Monteiro, Alegre e São José do Calçado, estado do Espírito Santo, Brasil. A seguir foi coletado sangue da veia jugular nos tempos oito meses pós vacinação, 12 meses pós vacinação e 16 meses pós vacinação. Foram utilizados como controles não reagentes ao AAT o soro de três bovinos machos com idade de quatro meses e como controle positivo o soro de três fêmeas adultas reagentes para o AAT com histórico clínico e achados de necrópsia no abate sanitário condizentes com brucelose.

Obtenção do antígeno solúvel de B. abortus

A metodologia para obtenção do antígeno solúvel foi segundo [Berman et al. \(1980\)](#) e [Chand et al. \(1990\)](#) com algumas modificações, pela introdução do processo de congelamento/descongelamento em substituição a sonicção e tratamento químico para lise do microrganismo preconizado por estes autores. Foram utilizadas *B. abortus* de um frasco da vacina viva atenuada liofilizada Brucelina B-19 Vallée®, partida 023/2018, ressuspensas em 10 mL de solução salina 0,9% e centrifugadas a 4.200 g. Após centrifugação, foi realizado a ressuspensão do sedimento em 10 mL de solução salina 0,9% e a centrifugação por mais duas vezes. Em seguida, o sedimento foi homogeneizado em 1,5 mL de PBS em tubo criogênico de 2,0 mL e imerso em nitrogênio líquido por 5 minutos. Posteriormente, o tubo foi imerso em banho-maria 37° C por 5 minutos. Repetiu-se este processo de congelamento/descongelamento por quatro vezes. O tubo foi centrifugado então a 19.000 g por 1 hora e 30 minutos à 4 °C. O sobrenadante coletado foi acondicionado em saco de diálise (Inlab® referência 132) e dialisado utilizando para este processo a imersão do saco de diálise em 1000 mL de PBS, sendo submetido a trocas do PBS a cada 6 horas durante um tempo total de 36 horas. O material remanescente do saco de diálise foi avaliado quanto a concentração de proteínas pelo Método de Bradford e ajustado para concentração de 1 mg/mL. Por fim, o material foi alíquotado em micro tubos de 200 µL e congelado a -20° C. Posteriormente foi utilizado como antígeno para sensibilização das placas para o teste de ELISAI.

Protocolo da técnica de ELISAI

O protocolo de ELISAI desenvolvido baseou-se nas etapas preconizadas por [Berman et al. \(1980\)](#) e [Baldi et al. \(1996\)](#). A sensibilização das placas de poliestireno de 96 poços, de fundo plano (Corning Costar Corporation Cambridge, USA), foi realizada com antígeno solúvel, descrito anteriormente, e, em seguida, as placas foram incubadas por 12 horas/4°C. Após a incubação, elas foram lavadas com tampão PBS 0,02 M, pH 7,2. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 100 µL de solução de albumina bovina a 0,2% por cavidade e incubadas a 37° C, durante 1h.

Os soros testes (soros das novilhas oito, 12 e 16 meses pós vacinação) foram diluídos em PBS, pH 7,2 (1:2.000), distribuídos nos poços das placas (100 µL/poço) e incubados por uma hora a 37° C. Após a incubação com os soros teste (anticorpo primário), as placas foram lavadas com PBS a 0,05% de Tween 20 e submetidas à incubação com anticorpo secundário espécie específico (anti-IgG conjugado

com peroxidase, Rheabiotec[®], na diluição 1:10.000. A seguir, foram novamente lavadas e receberam 100 µL do substrato cromogênico (orthophenylene-diamine, OPD, Sigma[®]) diluído em tampão citrato-fosfato a 0,15 M, pH 5,0. Passados 15 minutos, a reação foi bloqueada com 10 µL de H₂SO₄, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas com filtro de 490 nm. Como ponto de corte para determinar os soros reagentes utilizou-se o valor de três desvios padrão resultantes da leitura de animais reagentes controle e não reagentes controle fazendo com que o teste, para definição de animais reagentes, seja mais rigoroso, e, aumentando assim a sua especificidade quando comparado a testes que utilizam como ponto de corte um ou dois desvios padrão ([Baldi et al., 1996](#); [Simpson et al., 2018](#)).

Teste do antígeno acidificado tamponado – AAT

Como controle para avaliação da presença de anticorpos anti-*Brucella* nos mesmos tempos (oito, 12 e 16 meses pós vacinação), utilizou-se o teste oficial do Antígeno Acidificado Tamponado-AAT com o antígeno comercial do Laboratório Microsules (Porto Alegre, RS) Partida 001/19 e metodologia oficial descrita no Manual do PNCEBT ([Brasil, 2006](#)).

Análise estatística

Os dados clínicos e resultados dos testes diagnósticos foram tabulados utilizando-se o programa Microsoft Excel. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa GraphPad Prism, versão 5.0, assumindo significância estatística $\alpha < 0,05$. Utilizou-se um cálculo para uma amostra aleatória simples com aproximação da distribuição normal binomial e população infinita. A estimativa foi feita considerando-se 5% de erro e uma confiança de 95%, além de uma prevalência média nacional de 1% da brucelose chegando-se a um valor de $n \approx 15$ animais. Considerando-se 30% de perda de animais durante o período do experimento, optou-se por trabalhar com uma amostra de 22 animais.

Para avaliar diferenças do mesmo teste no mesmo animal em diferentes momentos de coleta, foi realizado um teste de qui-quadrado de uma variável. As análises de qui-quadrado para uma variável tiveram como objetivo verificar se existia uma diferença significativa entre as frequências observadas e esperadas pelo acaso para número de animais reagentes nos testes de AAT e ELISAI, separadamente. Realizou-se uma análise em tabela de contingência, mediante teste de qui-quadrado de duas variáveis, com o objetivo de verificar associação entre os resultados dos diferentes testes (AAT e ELISAI) para todo o experimento e para cada momento em separado. Por fim, ainda para verificar a concordância entre os testes AAT e ELISAI foi realizado o cálculo do índice de concordância Kappa.

Foram realizados também os cálculos de sensibilidade (reagente) e de especificidade (não reagente) além dos valores preditivos positivo (reagentes) e negativo (não reagentes) segundo [Almeida Filho & Rouquayrol \(2002\)](#). Para todos os testes, utilizou-se o Teste AAT como referência de controle de positividade por ser considerada a prova de mais representativa no panorama de diagnóstico da brucelose no Brasil.

Resultados e discussão

Os resultados dos testes do AAT e ELISAI são apresentados em paralelo na [Tabela 1](#) possibilitando a avaliação de concordância ou não entre os testes. Observou-se que no tempo de oito meses, após a vacinação, metade das novilhas (50%) apresentaram resultado reagente no teste AAT; enquanto que, no mesmo tempo, no teste do ELISAI todas as novilhas (100%) foram reagentes. Aos 12 meses pós vacinação 45,5% das novilhas foram reagentes no AAT; enquanto que 72,7% foram reagentes no ELISAI. E, por fim, aos 16 meses pós vacinação, apenas 9,1% foram reagentes no AAT, e 45,5% foram reagentes no ELISAI. O resultado para 16 meses pós vacinação para o AAT com maioria dos animais sendo não reagentes está em acordo com a indicação do MAPA, em não realizar o AAT antes dos 24 meses de vida. Alguns autores registraram ausência total de anticorpos vacinais antes dos 24 meses de vida em fêmeas vacinadas até oito meses ([Aguirre et al., 2002](#); [Ribeiro et al., 1997](#); [Sutherland, 1984](#)) pelos testes AAT e 2-Mercaptoetanol. Para esses autores, foram verificados resultados negativos quanto a presença de anticorpos em todas fêmeas vacinadas entre três e 12 meses pós vacinação. Mas esta não é uma conclusão unânime visto que outros autores ([Herr & Brugge, 1985](#); [Samartino et al., 1999](#)) utilizando distintos testes verificaram a presença de anticorpos muito além de 16 meses pós vacinação ou 24 meses de vida. Enquanto que, a World Organisation For Animal Health ([OIE, 2018](#)) entende que

o Teste de Fixação de Complemento por possuir um sistema padronizado de unidades é mais específico que o AAT sendo utilizado como teste de referência internacional para comercialização. A mesma Organização ([OIE, 2018](#)) afirma que o desempenho diagnóstico de alguns ensaios imune enzimáticos (ELISA) e o ensaio de polarização de fluorescência (FPA) é comparável ou melhor que o TFC e, como são tecnicamente mais simples de executar e mais robusto, seu uso pode ser preferido.

Tabela 1. Leitura do resultado do teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Teste indireto imune enzimático (ELISAI) em amostras de soro de 22 novilhas vacinadas com vacina comercial Brucelina B-19 Vallée®

Novilhas	Coleta pós vacinação					
	8 meses		12 meses		16 meses	
	AAT	ELISAI	AAT	ELISAI	AAT	ELISAI
1	+	+	-	+	-	+
2	+	+	+	+	+	+
3	-	+	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-	+
5	+	+	+	+	-	+
6	+	+	+	+	-	-
7	-	+	-	+	-	+
8	-	+	-	+	-	+
9	-	+	-	+	-	-
10	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	+	-	+
13	-	+	-	+	-	+
14	+	+	+	-	-	-
15	-	+	-	+	-	-
16	-	+	-	+	-	-
17	-	+	-	+	-	-
18	+	+	+	-	+	-
19	-	+	-	+	-	-
20	-	+	-	-	-	-
21	+	+	+	+	-	+
22	+	+	+	+	-	+
	11+/11-	22+	10+/12-	16+/6-	02+/20-	10+/12-

+ representa os animais reagentes; - representa os animais não reagentes

Verifica-se uma diferença entre as frequências observadas e as esperadas ao acaso ($\chi^2 = 6,348$, $P = 0,042$) para o número de reagentes no teste AAT. Isso mostra, portanto, que essa frequência tende a diminuir com o passar do tempo. Os resultados observados para o ELISAI neste estudo, sendo identificado 22/22 reagentes para a primeira coleta, 16/22 reagentes para segunda coleta e 10/22 reagentes na terceira coleta, indicam um declínio significativo entre as frequências observadas e as esperadas ao acaso ($\chi^2 = 7,172$ $P = 0,028$) mostrando, portanto, que essa frequência tende a diminuir com o passar do tempo. Entretanto, não existe uma associação significativa entre os resultados dos testes AAT e ELISAI nos tempos avaliados como mostra o teste de qui-quadrado para tabela contingência 2x2 ($\chi^2=0,545$, $p=0,46$) com os dados presentes na [Tabela 2](#).

A seguir estão apresentados na [Tabela 3](#) os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do teste de ELISAI. Observa-se uma sensibilidade aceitável (0,7826) do teste de ELISAI considerando [Gall & Nielsen \(2004\)](#) que em trabalho de revisão comparou sensibilidade de testes de diversos trabalhos científicos de diagnóstico de brucelose verificando o melhor desempenho para o teste de polarização fluorescente. Entretanto, também indica uma especificidade fraca (0,3023), para detectar as novilhas não reagentes, considerando os resultados do teste AAT como referência. Além disso, mediante coeficiente Kappa (Kappa = 0,068; $P = 0,738$)

pôde-se demonstrar uma concordância pobre com o teste ATT, de acordo com a classificação de [Miot, \(2016\)](#), uma vez que o número de concordâncias observadas (n = 31; 47,0%) foi, apenas, ligeiramente superior à esperada ao acaso (n = 28,5; 43,1%).

Tabela 2. Frequência dos resultados dos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e do ELISAI realizados em novilhas vacinadas contra Brucelose com cepa B19.

		AAT		Total
		Reagente	Não Reagente	
ELISAI	Reagente	18	30	48
	Não Reagente	5	13	18
Total		23	43	66

Outros autores além de [Berman et al. \(1980\)](#) observaram resultados semelhantes aos relatados neste experimento confirmando a falta de concordância entre testes com antígenos de *Brucella* spp. íntegras (AAT), onde predomina como antígeno os lipopolissacarídeos de forma lisa da camada externa (S-LPS) e animais imunizados com antígenos solúveis diversos de *Brucella* spp. resultantes da lise bacteriana. [Sutherland \(1984\)](#) em experimento relevante utilizando bovinos infectados/não infectados e tendo como referência o isolamento de *Brucella abortus* após necrópsia verificou para o ELISAI com antígeno solúvel extraído com 0,25 N NaOH, fixação de complemento, soro aglutinação e para o Teste Rosa de Bengala (equivalente ao AAT) sensibilidade e especificidade de 96%:81%, 81%:97%, 93%:97% e 78%:71%, respectivamente. Estes resultados considerando o isolamento de *B. abortus* indicando relativa concordância com os resultados obtidos pelos testes de ELISAI, fixação de complemento e soro aglutinação e concordância fraca com o Teste Rosa de Bengala (78%:71%). Mais recentemente, [Simpson et al. \(2018\)](#) utilizando um ELISAI comercial “IDEXX Brucellosis antibody test kit” (IDEXX, Montpellier, France) e comparando com o Teste Rosa de Bengala (equivalente ao AAT) observaram inicialmente um Kappa de 0,63 entre os testes; porém, quando os mesmos animais foram avaliados 15 meses após a vacinação, o AAT identificou somente 14% dos animais vacinados, enquanto o ELISAI comercial identificou o dobro de animais soro positivos (32%), sendo alguns animais sorologicamente positivos até 4,5 anos. Assim como [Rocha et al. \(2018\)](#) que, em 118 amostras de soros de bubalinas vacinadas com B19 e examinadas por meio da técnica AAT não encontrou nenhum animal reagente a técnica para soros coletados entre 24 e 28 meses de idade. Quando esses soros foram testados pelo ELISAI utilizando antígeno solúvel, obteve 82 amostras reagentes ou seja 69% das amostras mostrando uma concordância entre os dois testes de 30,5%. Também [Maturino \(2014\)](#) sensibilizando a placa de ELISA com amostra lisa de *Brucella abortus* avaliou 666 animais selecionados ao abate aleatoriamente verificando reagentes ao AAT 1,2% e para o ELISAI 13,21%. Assim quanto a sensibilidade, a técnica ELISAI indica ser sempre mais promissora do que o AAT.

Tabela 3. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) com respectivos IC_{95%} do método de ELISAI considerando o método Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como referência.

	Valores	IC _{95%}
Sensibilidade	0,7826	0,5630 a 0,9254
Especificidade	0,3023	0,1718 a 0,4613
Valor predito positivo	0,3750	0,2395 a 0,5265
Valor predito negativo	0,7222	0,4652 a 0,9031

*IC_{95%} - Intervalo de confiança de 95%.

Em contrapartida, outros autores que utilizaram células íntegras para o ELISAI observaram concordância com os resultados de AAT. [Colby et al. \(2002\)](#) utilizando células íntegras de *Brucella* spp. em todos os testes executados verifica elevada concordância entre o ELISAI e AAT. [Molnár et al. \(2002\)](#) tendo o teste de ELISA competitivo como padrão verifica uma concordância de 96,13% e 93,18% entre a sensibilidade e especificidade de AAT e ELISAI, respectivamente. Também [Paulin et al. \(2009\)](#), utilizando como padrão o TFC e células íntegras de *Brucella abortus* observaram entre o ELISAI e AAT um Kappa com valor de 0,91, indicando uma ótima concordância.

Assim, devemos considerar que o processo de obtenção do antígeno solúvel utilizado por este experimento e outros autores (Berman et al., 1980; Chand et al., 1990; Rocha et al., 2018) libera, além dos constituintes da membrana externa, diversos outros antígenos bacterianos que podem ser indutores de produção de anticorpos adquirindo uma maior sensibilidade na detecção de anticorpos anti *Brucella*. Como diferencial dos demais autores que utilizam antígeno solúvel, certamente o antígeno deste experimento possui uma maior especificidade visto o uso do processo de dialise realizado, eliminando assim moléculas antigênicas menores de 100 kilodaltons que são em geral antígenos comuns a diversos microrganismos capazes de induzir reação cruzada.

Entende-se ainda que o teste de ELISAI desenvolvido neste estudo utilizando antígenos solúveis possui uma aceitável sensibilidade ($\chi^2 = 0,7826$) e fraca especificidade ($\chi^2=0,3023$) provavelmente pela menor sensibilidade do teste AAT para antígenos brucélicos que não sejam o S-LPS. Assim deve-se considerar que antígenos internos da *Brucella* spp. liberados pela lise neste experimento, e comuns a outros microrganismos gram negativos, são capazes de induzir reação cruzada, resultando em baixa especificidade do teste ELISAI e são passíveis de ocorrer para os testes que utilizam como referencial os S-LPS (AAT) visto reações cruzadas reconhecidas pela literatura em geral com *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:9, *Escherichia coli* O:157 e *Salmonella* grupo N (Currò et al., 2012; Gupta et al., 2010).

O estudo mostrou que o protocolo de ELISAI desenvolvido possui potencial para monitorar bovinos vacinados e infectados na proposta de triagem com maior sensibilidade que o AAT, uma vez que os testes confirmatórios sempre podem ser realizados. Particularmente, em relação a animais vacinados o ELISAI desenvolvido, poderá ser uma ferramenta relevante de avaliação de proteção vacinal a longo prazo sendo que para os animais reagentes suspeitos de infecção podem ser descartados com o método do 2-Mercaptoetanol/soro aglutinação lenta ou outros testes confirmatórios que indiquem presença de IgMs, até mesmo porque se os resultados obtidos fossem devido a imunidade cruzada com antígenos de outros gram negativos seria verificada uma elevada resposta para o teste de ELISAI aos 16 meses pós vacinação, e não uma tendência de declínio conforme indica o resultado estatístico. Por fim, o protocolo de ELISAI utilizando antígenos solúveis de uma vacina comercial de *Brucella abortus* amostra B19, foi validado mostrando sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*Brucella* em fêmeas impúberes vacinadas.

As observações acima indicam ainda a necessidade de novas pesquisas, como testar o ELISAI em animais não vacinados, em animais vacinados com a RB51, ou em um maior número de animais infectados reagentes a campo relacionando com outros testes confirmatórios para diagnóstico da brucelose.

Referências bibliográficas

- Aguirre, N. P., Vanzini, V. R., Echaide, S. T., Valentini, B. S., Lucca, G., Aufranc, C., Canal, A., Vigliocco, A., & Nielsen, K. (2002). Antibody dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 23(4), 471–478. DOI: <https://doi.org/10.1081/IAS-120015478>
- Almeida Filho, N., & Rouquayrol, M. Z. (2002). *Introdução à epidemiologia*. Guanabara Koogan S.A.
- Baldi, P. C., Giambartolomei, G. H., Goldbaum, F. A., Abdon, L. F., Velikovsky, C. A., Kittelberger, R., & Fossati, C. A. (1996). Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with B. abortus S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype 0: 9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3(4), 472–476. DOI: <https://doi.org/10.1128/cdli.3.4.472-476.1996>
- Berman, D. T., Wilson, B. L., Moreno, E., Angus, R. D., & Jones, L. M. (1980). Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(4), 355–362. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.11.4.355-362.1980>
- Brandão, A. P., Oliveira, F. S., Carvalho, N. B., Vieira, L. Q., Azevedo, V., Macedo, G. C., & Oliveira, S. C. (2011). Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- γ knockout than IL-12/ β 2-microglobulin double-deficient mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/589494>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal* (PNCEBT) – MAPA/SDA/DSA, 2006.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 20 jun. 2017. Seção 1, p. 4-8.
- Chand, P., Sadana, J. R., & Batra, H. V. (1990). Comparison of a dot-ELISA and a plate-ELISA for bovine brucellosis diagnosis. *Veterinary Record*, 127(7), 169–170. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.127.7.169>
- Colby, L. A., Schurig, G. G., & Elzer, P. H. (2002). An indirect ELISA to detect the serologic response of elk (*Cervus elaphus nelsoni*) inoculated with *Brucella abortus* strain RB51. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4), 752–759. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.4.752>
- Currò, V., Marineo, S., Vicari, D., Galuppo, L., Galluzzo, P., Nifosì, D., Pugliese, M., Migliazzo, A., Torina, A., & Caracappa, S. (2012). The isolation of *Brucella* spp. from sheep and goat farms in Sicily. *Small Ruminant Research*, 106, Suppl(0), S2–S5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.025>
- Gall, D., & Nielsen, K. (2004). Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Revue Scientifique et Technique*, 23(3), 989–1002. DOI: <https://doi.org/10.20506/rst.23.3.1545>
- Gupta, V. K., Kumari, R., Vohra, J., Singh, S. V., & Vihan, V. S. (2010). Comparative evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in goats. *Small Ruminant Research*, 93(2–3), 119–125. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.05.009>
- Herr, S., & Brugge, L. A. (1985). Profiles of serological reactions following adult cow inoculation with standard dose *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *Journal of the South African Veterinary Association*, 56(2), 93.
- Lawinsky, M. L. J., Ohara, P. M., Elkhoury, M. R., Faria, N. C., & Cavalcante, K. R. L. J. (2010). Estado da arte da brucelose em humanos. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(4), 75–84. DOI: <https://doi.org/10.5123/s2176-62232010000400012>
- Maturino, M. P. M. (2014). *Levantamento soropidemiológico de brucelose em amostras de bovinos abatidos em matadouros inspecionados no estado da Bahia*. Cruz das Almas, 2014. 91fl. (Dissertação) - Mestrado profissional em Defesa Agropecuária - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- Miot, H. A. (2016). Agreement analysis in clinical and experimental trials. *Jornal Vascular Brasileiro*, 15(2), 89–92. DOI: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.004216>
- Molnár, L., Molnár, É., Lima, E. S. C., & Dias, H. L. T. (2002). Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 22(2), 41–44. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2002000200002>
- Paulin, L. M. S., Andrade-Pacheco, W. A., Castro, V., & Federsoni, I. S. P. (2009). Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella abortus* en bovinos. *Instituto Biológico*, 76(1), 9–15.
- Ribeiro, M. G., Spago, N., Fava, N., Ratti, J., & Megid, J. (1997). Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostras B19. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 137–150.
- Rocha, K. P. C., Cerqueira, R. B., Andrea, M. V., Brandão, P. V. D., Vieira, V. P., Silva Júnior, L. S., & Silva, B. P. (2018). Utilização de um teste ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose em amostras de soro de búfalas. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, 10(30), 1679–7353.
- Samartino, L., Gregoret, R., Gall, D., & Nielsen, K. (1999). Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Journal of Immunoassay*, 20(3), 115–126. DOI: <https://doi.org/10.1080/01971529909349347>
- Simpson, G. J. G., Marcotty, T., Rouille, E., Chilundo, A., Letteson, J.-J., & Godfroid, J. (2018). Immunological response to *Brucella abortus* strain 19 vaccination of cattle in a communal area in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 89(1), 1–7. DOI: <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1527>

- Sola, M. C., Freitas, F. A., Sena, E. L. S., & Mesquita, A. J. (2014). Brucelose bovina: revisão. *Enciclopédia Biosfera*, 10(18), 186--714.
- Sutherland, S. S. (1984). Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*, 10(1), 23–32. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(84\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(84)90053-1).
- World Organisation For Animal Health – OIE. (2018). Terrestrial Manual 2018: Chapter 3.1.4. – Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2019, 09:05.

Histórico do artigo:

Recebido: 27 de julho, 2020.

Aprovado: 15 de setembro, 2020.

Disponível online: 5 de novembro, 2020.

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.