

## **ANTICORPO ANTI-*Brucella abortus* EM TERNEIROS DE GADO LEITEIRO**

RECUERO\*, A. L. C., STARK, C. B., HENTGES, A., MARTINS, P. L., JORGE, S., BANDEIRA, F. S., FERNANDES, C. P. H., BROD, C. S.

### **1. RESUMO**

Foi realizado um estudo de prevalência de Brucelose bovina na bacia leiteira do Município do Capão do Leão, avaliando 148 terneiros de 1 a 10 meses de idade, de trinta propriedades leiteiras. Utilizou-se o programa EpiInfo 6.04 para determinar o número de propriedades a serem analisadas, estimando-se uma expectativa de 14% de Prevalência, um erro relativo de 11%, e um limite de confiança de 95%, que resultou em um número de 28 propriedades. As técnicas laboratoriais utilizadas foram as preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como triagem e as Provas Lentas em Tubo (PLT) sem e com 2-Mercaptoetanol (2-ME) como testes confirmatórios para os reagentes no AAT. O número de animais com menos de um ano encontrado nas 30 propriedades foi de 148, sendo 106 fêmeas e 42 machos. Com relação à idade, 67 (45,3%) tinham até dois meses, 74 (50%) de 3 à 8 meses e 7 (4,7%) de 9 à 10 meses. Das 30 propriedades examinadas, 18 apresentavam animais em idade de vacinação e destas somente três tinham animais vacinados o que equivale a 83,3% de propriedades que não vacinam ou que pelo menos não o tinham feito até o momento da coleta dos animais. Os testes laboratoriais revelaram quatro animais reagentes ao AAT (27,03%), três reagentes na PLT (20,27%) e dois reagentes ao 2-ME (13,51%). As reações encontradas foram discutidas com relação à idade e o status vacinal do animal, chegando-se a conclusão que esta investigação não convencional para Brucelose bovina (terneiros menores de um ano de idade) detectou duas propriedades com animais infectados (6,67%) bem como a análise de animais em idade de vacinação (fêmeas com 3 a 8 meses de idade) revelou 79% de animais não vacinados.

### **2. INTRODUÇÃO**

A Brucelose é uma antroponose causada por bactérias gram-negativas parasitas intracelulares facultativas do gênero *Brucella*. Cada espécie de *Brucella* tem seu hospedeiro natural preferencial que serve como reservatório da infecção (Quinn et al., 1994). A Brucelose é essencialmente uma doença dos animais maduros sexualmente com predileção para placenta de ungulados, fluidos fetais e testículos dos machos. Compromete especialmente o sistema reprodutivo ocasionando, freqüentemente, abortamento no terço final da gestação (METCALF et al., 1994).

A brucelose é uma das doenças mais devastadoras economicamente, que provoca grandes perdas durante o período de parição e causa problemas de saúde na população rural e urbana, devido tanto ao contato com materiais contaminados como ao consumo de produtos lácteos contaminados (Brooks et al., 2004; Ryan, 2004). Além dos problemas causados à saúde pública, a brucelose também gera prejuízos econômicos ao tornar o produto vulnerável às barreiras sanitárias, comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (BRASIL, 2003).

A Organização Internacional de Epizootias (OIE) classifica a brucelose como doença da lista B, onde estão incluídas as enfermidades que têm importância socioeconômica e/ou para saúde pública e conseqüências significativas no comércio

internacional de animais e seus produtos (ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS, 2002).

A criação de animais de corte, principalmente bovinos, no extremo sul do país, na maioria das propriedades se apresenta de forma extensiva, e isto engloba a presença de outros animais em convívio estreito, propiciando a disseminação de doenças entre as diversas espécies. Os eqüinos que auxiliam no manejo de diversos animais podem ser portadores e disseminadores de Brucelose através de secreções e excreções quando circulam em poteiros nas propriedades, podendo até inviabilizar os atuais programas de erradicação de Brucelose (RECUERO, et al,2006).

O PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose), implantado no Brasil em 2001, tem por objetivo diminuir o impacto destas enfermidades, que são zoonoses e de propiciar o crescimento da pecuária nacional. Instituída a obrigatoriedade da vacinação de bovinos e bubalinos em todo o Brasil, espera-se tornar possível a erradicação destas doenças em todo país (BRASIL,2003).

A disseminação da doença para o homem resulta da ingestão de leite cru ou não pasteurizado ou de produtos lácteos provenientes de animais infectados; da inalação de poeira contaminada; e do contato com conteúdo uterino infectado, descargas e carcaças contaminadas (Blood and Radostits, 1989; Nielsen, 1997).

A espécie *B. abortus* em bovinos é incontestavelmente a mais importante, entre as espécies às quais os bovinos são mais suscetíveis, porém a infecção pode ocorrer por *B. suis*, sendo possível também a infecção por *B. melitensis*, entretanto desta espécie não se encontra citação no Brasil (ACHA, 2001).

Os antígenos usados nos testes de triagem e confirmatórios para esta doença são preparados com *B. abortus* 1119-3, sendo possível, contudo, a ocorrência de reações falso-positivas em decorrência de vacinação tardia com B19 acima da idade de 8 meses, que é obrigatória para as fêmeas, ou da presença de anticorpos inespecíficos resultante da presença de outras bactérias como: *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O:157 , ou *Pseudomonas* sp. Estas reações inespecíficas podem mascarar o resultado inicial, na triagem e limitá-lo também, porque os diagnósticos se baseiam em somente uma espécie de *Brucella* sp, a mais prevalente (BRASIL,2006).

A infecção vertical é citada por Acha, (2001), onde os autores afirmam que ocorrem valores entre 2,5% e 10% de presença de anticorpos, em filhas de vacas infectadas artificialmente ou sorologicamente positivas, estes valores já foram encontrados em estudos de transmissão de Brucelose de vacas para sua prole.

Este trabalho tem por objetivo investigar anticorpos anti-brucela em terneiras de zero a um ano de idade, a partir de uma triagem sem investigação prévia de suas progenitoras e diferenciar através dos testes a possível proveniência dos anticorpos encontrados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRAS

A região em estudo compreende o município do Capão do Leão, que possui 100 propriedades leiteiras cadastradas na Inspecção Veterinária e Zootécnica. Para delimitar o número de propriedades a serem analisadas utilizou-se com o programa EpiInfo versão 6.04 ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)), uma expectativa de 14% de Prevalência (RECUERO et al, 2004), um erro relativo de 11%, e um limite de confiança de 95% que resultou em um número de 28 propriedades a serem analisadas.

O número de terneiros coletados foi de 148, com idades de zero a dez meses de idade, filhos de mães leiteiras presentes em trinta propriedades.

Os testes não estão vinculados ao PNCEBT, porque estes animais estão em estudo, em idade inferior ao recomendado pelo programa, o levantamento tem por objetivo pesquisa em tenra idade.

O sangue foi coletado em tubos de vidro, de Vacutainer 10 mL, onde cada amostra continha 8 mL de sangue total, separado imediatamente após a chegada ao laboratório em centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos. Após a separação foram acondicionados 4 mL de soro de cada amostra, em 2 tubos tipo ependorf contendo 2 mL cada e congelados a -20°C até o momento da análise.

### 3.2. TESTES LABORATORIAIS

Os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), prova aglutinação lenta em tubos e de aglutinação lenta em tubos com 2-mercaptoetanol foram realizados conforme o protocolo do PNCEBT.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a tabela 1, o número de animais com menos de um ano encontrado nas 30 propriedades foi de 148, sendo 106 fêmeas e 42 machos. Com relação à idade, 67 (45,3%) tinham até dois meses, 74 (50%) de 3 à 8 meses e 7 (4,7%) de 9 à 10 meses. Das 30 propriedades examinadas, 18 apresentavam animais em idade de vacinação e destas somente três tinham animais vacinados o que equivale a 83,3% de propriedades que não vacinam ou que pelo menos não o tinham feito até o momento da coleta dos animais.

Aproximadamente 75% das fêmeas vacinadas com a cepa B19 apresentam completa proteção contra a Brucelose, 15% uma proteção parcial e 10% nenhuma proteção. Isto foi provado quando animais foram vacinados com cepa B19 viável e ao serem expostos via conjuntival com *Brucella abortus* virulenta, produziu infecção em 75 a 90% dos controles não vacinados (MANTHEI, 1967).

A sorologia, que indica qualitativamente somente dois resultados, um positivo e outro negativo, utilizando-se o teste de triagem TAAT nos 148 terneiros, revelou quatro animais positivos (2,7%).

A resposta de anticorpos à infecção por *B. abortus* em bovinos consiste de uma precoce resposta do isotipo IgM, cujo tempo depende da via de exposição, da dose de bactéria e do status de saúde do animal (Beh, 1973, 1974; Allan et al., 1976). A resposta de IgM é seguida quase que imediatamente pela produção de IgG1 e mais tarde em menores quantidades de IgG2 e de IgA (Corbel, 1972; Beh, 1974; Allan et al., 1976; Levieux, 1978; Nielsen et al., 1984). A maioria das reações cruzadas resultantes de exposição a outros microorganismos que não *Brucella sp.* ou antígenos ambientais são principalmente de IgM (Corbel, 1985). Portanto, os testes sorológicos que medem IgM não são desejáveis uma vez que pode ocorrer falsos positivos, ocasionando baixa especificidade. Uma vez que os anticorpos IgG2 e IgA são mais tardios e normalmente ocorrem em pequena quantidade, o principal isotipo dos testes sorológico é o IgG1 (Allan et al., 1976; Lamb et al., 1979; Nielsen et al., 1984; Butler et al., 1986).

O TAAT é preparado com células inteiras de *B. abortus* 1119-3, coradas com rosa de bengala usando um pH de 3,65. O pH baixo evita algumas aglutinações pela IgM e favorece a aglutinação por IgG1, reduzindo portanto algumas interações inespecíficas (Corbel, 1972; Allan et al., 1976). O TAAT é indicado para triagem de animais individuais, entretanto pode apresentar reações falso-negativas devido ao

fenômeno de pró-zona como também falso-positivos resultantes de anticorpos vacinais ou de outros agentes como já citado (OIE, 2008).

A definição dos resultados é realizada com os testes confirmatórios, utilizando-se a Prova Lenta em Tubos conjuntamente com o 2-Mercaptoetanol, provas quantitativas que indicam títulos pré estabelecidos de: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200. Quando comparados, estes fornecem o desfecho final, ou a liberação dos animais se o resultado for negativo, ou o Abate Sanitário se o resultado for positivo.

Tabela 01. Caracterização por sexo, idade, status vacinal e resultado sorológico para Brucelose de 148 terneiros de 30 propriedades do Município do Capão do Leão, RS.

NP. <sup>6</sup>	Idade em meses			Total	Sexo			TAAT <sup>2</sup>		PLT <sup>3</sup>	
	até 2	3 – 8	9 – 10		M	F	V <sup>1</sup>	Pos	Neg	Lenta <sup>4</sup>	2ME <sup>5</sup>
1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
2	0	3	0	3	3	0	0	0	3	0	0
3	0	2	0	2	0	2	0	0	2	0	0
4	3	3	0	6	5	1	0	1	5	0	0
5	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
6	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
7	0	2	0	2	0	2	0	0	2	0	0
8	6	1	0	7	2	5	0	0	7	0	0
9	0	3	1	4	1	3	0	0	4	0	0
10	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
11	2	4	0	6	0	6	0	0	6	0	0
12	0	2	0	2	2	0	0	0	2	0	0
13	4	0	0	4	1	3	0	0	4	0	0
14	0	18	2	20	0	20	8	1	19	1	1
15	7	0	0	7	0	7	0	0	7	0	0
16	1	3	0	4	0	4	2	2	2	2	1
17	1	2	0	3	1	2	0	0	3	0	0
18	2	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0
19	0	3	1	4	1	3	0	0	4	0	0
20	0	3	0	3	0	3	3	0	3	0	0
21	2	3	0	5	0	5	0	0	5	0	0
22	1	3	0	4	1	3	0	0	4	0	0
23	0	3	3	6	3	3	0	0	6	0	0
24	5	3	0	8	1	7	0	0	8	0	0
25	5	11	0	16	6	10	0	0	16	0	0
26	5	0	0	5	2	3	0	0	5	0	0
27	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
28	4	0	0	4	2	2	0	0	4	0	0
29	3	0	0	3	3	0	0	0	3	0	0
30	13	0	0	13	8	5	0	0	13	0	0
<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>74</b>	<b>7</b>	<b>148</b>	<b>42</b>	<b>106</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>144</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

1 – Animais vacinados com B19    2 – Teste de soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado  
 3- Prova Lenta em Tubos            4 - Prova Lenta em Tubos sem 2 mercaptoetanol  
 5 - Prova Lenta em Tubos com 2 mercaptoetano;    6 – Número da Propriedade

Todas as quatro amostras reagentes ao TAAT testadas eram fêmeas bovinas pertencentes a três (10%) das 30 propriedades investigadas. A idade, status vacinal e resultados das provas confirmatórias são apresentados na tabela 2.

Os resultados da amostra 04-06 remetem às reações inespecíficas citadas no PNCEBT, que envolvem a presença de bactérias como *Pseudomonas*, sp, *Salmonella* sp entre outras, que se presentes no soro sanguíneo podem resultar no AAT positividade, não confirmada na prova lenta e no 2-Me (BRASIL, 2006). A bactéria *Yersinia enterocolitica* tipo 9, também é citada como promotora de reação cruzada no AAT chamado anteriormente Rosa de Bengala (ACHA, 2001).

Tabela 02. Caracterização das quatro amostras reagentes ao TAAT, provenientes de 30 propriedades investigadas do Município do Capão do Leão, RS.

Amostra	Idade	Vacinado	Tít. Prova Lenta	Tít. 2 ME
04-06	1 mês	Não	Não reagente	Não reagente
14-10	10 meses	Sim	100	100
16-01	7 meses	Sim	100	100
16-02	6 meses	Sim	200	Não reagente

As amostras 14-10 e 16-01, vacinadas em idade correta, apresentaram títulos de 1:100 tanto na Prova Lenta, quanto no 2-Me, revelando-se positivas para a doença. O período de incubação da brucelose pode ser de poucas semanas e até mesmo, meses ou anos. Quanto mais adiantada estiver a prenhes menor será o período de incubação. Se a fêmea se infectar por via oral no momento do serviço, o período de incubação pode prolongar-se por até 200 dias, ao passo que se ela se infectar seis meses após a monta, este período passa para dois meses (ACHA, 2001). As terneiras em questão podem ter adquirido a infecção no útero gravídico por exposição à mãe positiva, no parto em contato com sangue materno, no aleitamento, ou após este período no ambiente contaminado onde habitam. A vacina, como se observou, não protegeu os animais, ou foi aplicada após a infecção evidente, comprovada com os testes realizados.

A amostra 16-02 apresentou título de 1:200 somente na Prova Lenta, indicando com este resultado, presumidamente presença de anti-corpos vacinais anti-brucela, ou infecção inicial detectada precocemente. Porém, a presença de IgM na Prova Lenta, encontrada com o título mais alto pesquisado e preconizado pelo teste, que é de 1:200, direciona o resultado do teste, para uma resposta vacinal eficiente neste animal, o que não ocorreu no animal 16-01 que co-habita na mesma propriedade.

## 5. CONCLUSÃO

A investigação não convencional (terneiros menores de um ano de idade) detectou duas propriedades com animais infectados bem como a análise de animais em idade de vacinação (fêmeas com 3 a 8 meses de idade) revelou 79% de animais não vacinados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, P.N.; Szyfres, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p.28-56, 2001.

Allan, G.; Chappel, R.; Williamson, P.; McNaught, D. A quantitative comparison of sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg.* **76**, 287-298, 1976.

- Beh, KJ. 1973. Distribution of *Brucella* antibody among immunoglobulin classes and a low molecular weight antibody fraction in serum and whey of cattle. **Res. Vet. Sci.** **14**, 381-384, 1973.
- Beh, KJ., Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. **Res. Vet. Sci.** **17**, 1-4, 1974.
- Blood, DC., Radostits, OM., 1989. Diseases caused by *Brucella* spp. Veterinary Medicine, 7th Edition. Bailliere Tindall, London, pp. 677-690.
- BRASIL – 2003 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 – Versão Preliminar. set 2003. 126p.
- Brooks, GF., Butel, JS. and Morse, SA. 2004: The Brucellae. In: Jawetz, Melnick, and Adelberg's, Medical Microbiology, 23rd ed, pp. 284–286. Mc Graw Hill, New York.
- Butler, J.; Seawright, G.; McGivern, P.; Gilsdorf, M. Preliminary evidence for a diagnostic immunoglobulin G1 antibody response among culture-positive cows vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenge exposed with strain 2308. **Am. J. Vet. Res.** **47**, 1258-1264, 1986.
- Corbel, MJ., Characterization of antibodies active in the Rose Bengal plate test for bovine Brucellosis **Vet. Rec.** **88**, 447-449, 1972;
- Corbel, MJ. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions **Vet. Bull.** **55**, 927-942, 1985
- Lamb, V.; Jones, L.; Schurig G.; Berman, D. Enzyme linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. **Infect. Immun.** **26**, 240-247, 1979;
- Levieux, D. A solid phase radioimmunoassay for the determination of bacterial specific antibodies within different immunoglobulin classes: application to bovine *Brucella abortus* antibodies. **Ann. Vet. Rec.** **9**, 523-530, 1978a.
- Manthei, CA. Application of Research to Bovine Brucellosis Control and Eradication Programs. **J. Dairy Science** **51**,7: 1115-1120, 1967
- Metcalf, HE.; Luchsinger, DW.; Ray, WC. Brucellosis. In: Beran, GW.; Steele, J.H. (Eds.). *Handbook of zoonoses. section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic.* 2.ed. Raton: CRC Press, 1994. p.9-39.
- Nielsen, K.; Heck, F.; Wgner, G.; Stiller, J.; Rosenbaum, B.; Pugh, R.; Flores, E. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* to primary and secondary binding assays. **Prev. Vet. Med.** **2**, 197-204, 1984
- Nielsen, K., 1997. Brucellosis: development and success using ELISAs for diagnosis. In: Proceedings of the International Symposium on Diagnosis and Control of Livestock Diseases using Nuclear and Related Techniques, April 7-11, Vienna, Austria.
- Organización Internacional de Epizootias. *Código zoosanitário internacional, Enfermidades dos bovinos da lista B, Recomendações aplicáveis à enfermidades específicas.* Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>> Acesso em: 25 Ago. 2008.
- Quinn, PJ., Carter, ME., Markey, B., Carter, GR., 1994. *Brucella* species. **Clinical Veterinary Microbiology.** Wolfe Publishing, Spain, pp. 261-267.
- Recuero, ALC.; Oyarzabal, MEB.; Silva, ÉF.; Bermudez, VL.; Bourscheidt, D.; Forster, KM.; Marchiori, M.; Seyffert, N.; Sanes, EM.; Brod, CS. Brucelose bovina no extremo sul do Brasil. In: anais XIII Congr. Inic. Cient. UCPel, 2004.
- Recuero, ALC.; Recuero, RC.; Jorge, S.; Rassier, GL.; Fernandes, CPH.; Brod, CS. Importância da espécie equina no controle e erradicação da brucelose bovina. In: anais XVII Congr. Estadual de Med. Vet., Gramado, 2006.
- Ryan, KJ., 2004: *Brucella*. In: Ryan, KJ., and Ray, CG. (eds), Sherris Medical Microbiology, 4th edn, pp. 481–484. McGraw-Hill, New York.