

USO DA REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO NA CONFIRMAÇÃO DE RESULTADOS POSITIVOS DO TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA¹

USE OF THE COMPLEMENT FIXATION TEST TO CONFIRM ROSE BENGAL TEST POSITIVE RESULTS FOR THE SERODIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS

R. B. MEIRELLES-BARTOLI^{2*}, L. A. MATHIAS²

RESUMO

O Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose prevê o uso da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) como teste de triagem no diagnóstico da brucelose bovina e bubalina. Os animais com resultado negativo nesse teste são considerados livres da infecção, e os com resultado positivo podem ser submetidos a um teste confirmatório, ou então já podem ser considerados infectados e encaminhados para o sacrifício. Caso se opte pela confirmação, há duas alternativas: a combinação da soroaglutinação em tubos com o teste do mercaptoetanol, ou então a reação de fixação de complemento (RFC). A opção pelos testes confirmatórios aumenta a especificidade do diagnóstico, minimizando o descarte por resultado falso-positivo, mas também aumenta o custo, reduz a sensibilidade do diagnóstico e retarda a adoção da medida sanitária. Por isso, o trabalho teve por objetivo verificar a proporção de soros com resultado positivo no AAT que tem o resultado positivo confirmado pela RFC. Foram selecionados 2.784 soros sanguíneos bovinos reagentes no AAT, os quais foram submetidos à RFC. Adotando-se a diluição 1:4 como ponto de corte, constatou-se que, dos 2.784 soros testados, 2.014 soros, ou seja, 72,3%, tiveram o resultado positivo confirmado na RFC, ao passo que 770 (27,7%) tiveram resultado negativo nesse teste confirmatório. Calculando-se o intervalo de confiança, verifica-se que, com 95% de probabilidade, de 70,6% a 74,0% dos soros positivos no teste de triagem apresentaram também resultado positivo no teste confirmatório. Isso indica que, caso o veterinário opte por classificar o animal como infectado com base apenas no resultado positivo do teste de triagem, a probabilidade de acerto é elevada.

PALAVRAS-CHAVE: Teste Confirmatório. Teste de Triagem.

SUMMARY

The National Program for Brucellosis and Tuberculosis Control and Eradication establishes that the rose Bengal (RBT) is the screening test for bovine brucellosis diagnosis. Animals without reaction in this test should be considered free of infection, and the reactors may be submitted to a confirmatory test or may be considered infected and slaughtered. If the option is the confirmatory diagnosis, there are two alternatives: the 2-mercaptoethanol test, combined with the standard agglutination test, or the complement fixation test (CFT). The option by the confirmatory tests enhances the diagnosis specificity, reducing the probability of slaughtering a false-positive animal, but also enhances diagnosis cost, reduces the diagnosis sensitivity and delays the herd sanitation. The purpose of this investigation was to verify the proportion of serum samples reacting in the RBT whose positive results are confirmed by the CFT. Serum samples of 2,784 AAT reactor cattle were tested by the CFT. Choosing the dilution 1:4 as the cut-off, 2,014 (72.3%) serum samples had the positive result confirmed by the CFT, and 770 (27.7%) tested negative. The 95% confidence interval for the proportion of CFT positive results was 70.6% to 74.0%. This means that the option of using the positive results of the RBT, without a confirmation by the CFT, provides a high probability of correctly diagnosing reactor cattle.

KEY-WORDS: Confirmatory Test. Screening Test.

¹ Parte da dissertação de mestrado da primeira autora. Projeto financiado pela FAPESP

² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP: 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

* E-mail: raphaellabrazil@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Os programas de controle ou erradicação da brucelose bovina baseiam-se em duas medidas principais, a vacinação e o diagnóstico para identificação das fontes de infecção e posterior aplicação de medidas de profilaxia, para conseguir a redução nas taxas de prevalência da enfermidade. Uma vez que para a identificação dos animais infectados é necessário examinar um grande número de animais, o diagnóstico deve basear-se em métodos rápidos, de baixo custo e fácil execução. Por isso, os testes sorológicos ainda constituem a alternativa mais viável para essa finalidade. Vários são os testes sorológicos já avaliados para o diagnóstico da brucelose bovina, alguns de execução mais simples e outros de execução mais complexa (NIELSEN, 2002), e esses testes variam entre si quanto ao isotipo de imunoglobulina envolvido na reação e quanto ao limiar de detecção (WRIGHT & NIELSEN, 1990), o que ajuda a explicar a ocorrência de resultados divergentes entre eles. Entre essa variada gama de testes, aqueles baseados na detecção de IgG₁ apresentam maior especificidade, uma vez que, em bovinos, esse isotipo está mais associado à infecção por *Brucella abortus* (BEH, 1974, BUTLER et al., 1981, 1986).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) prevê o uso da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) como teste de triagem no diagnóstico da brucelose bovina e bubalina. Os animais com resultado negativo no teste de triagem são considerados livres da infecção, e os animais com resultado positivo podem ser submetidos a um teste confirmatório, ou então o animal já pode ser considerado infectado e encaminhado para o sacrifício. Os testes confirmatórios são a soroprecipitação lenta em tubos (SAT) em combinação com o teste do 2-mercaptoetanol (ME) ou então a reação de fixação de complemento (RFC). Pela legislação brasileira, o teste de triagem pode ser realizado pelo veterinário habilitado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para atuar no PNCEBT, e os testes confirmatórios devem ser realizados em laboratórios credenciados (BRASIL, 2004).

A opção pelos testes confirmatórios aumenta a especificidade do diagnóstico, minimizando a possibilidade de descartar animais incorretamente por causa de resultados falso-positivos. Entretanto essa opção também implica aumento no custo, perda de sensibilidade no diagnóstico e retardo na adoção da medida sanitária, devido ao tempo de espera pelo resultado do laboratório. Por isso, este trabalho teve por objetivo verificar que proporção de soros com resultado positivo no AAT tem o resultado positivo confirmado pela RFC. Com isso, pretende-se verificar qual a probabilidade de acerto no caso de o veterinário habilitado considerar apenas o resultado do teste de triagem para a adoção da medida sanitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras analisadas

Foram examinadas 2.784 amostras de soros sanguíneos de fêmeas bovinas adultas, com resultado positivo no AAT. Essas amostras foram selecionadas entre aquelas encaminhadas por médicos veterinários ao Laboratório de Diagnóstico de Brucelose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no período de 2004 a 2007.

Técnicas sorológicas

Teste do antígeno acidificado tamponado

Essa técnica foi realizada como descrita no Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006). Colocavam-se 30 µL do soro a ser testado em presença de 30 µL de antígeno padronizado, pH 3,65, corado com rosa de Bengala, preparado e comercializado pelo Instituto Biológico de São Paulo. Em seguida, homogeneizava-se a mistura, mantinha-se em movimentação por 4 minutos e efetuava-se a leitura, observando a formação de grumos de aglutinação, que caracteriza a reação positiva.

Reação de fixação de complemento

Empregou-se a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação. Utilizou-se antígeno com *Brucella abortus* 119/3, preparado e comercializado pelo Instituto Biológico de São Paulo para o teste de SAT, e como complemento utilizou-se soro de cobaia, empregando-se na reação cinco unidades hemolíticas 50%. O sistema hemolítico era formado por hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo de coelho contra hemácia de ovino). Considerou-se positivo o soro com pelo menos 25% de fixação de complemento na diluição 1:4. Todos os detalhes da técnica, assim como a titulação dos reagentes, basearam-se nas recomendações de Alton et al. (1988).

Análise dos dados

Para a análise dos dados, calculou-se a proporção de resultados positivos na RFC e determinou-se o intervalo de confiança com 95% de probabilidade, segundo a fórmula:

$$p \pm z \cdot \sqrt{p \cdot (1 - p) / n}$$

sendo: p = proporção de resultados positivos; q = 1 - p; z = nível de confiança; e n = número de amostras examinadas (SCHWABE et al., 1977).

RESULTADOS

Dos 2.784 soros com resultado positivo no AAT, 514 não apresentaram título na RFC, 256 apresentaram reação na diluição 1:2, 436 apresentaram na diluição 1:4, 413 reagiram até a diluição 1:8, 312 até 1:16, 210 até 1:32 e 643 apresentaram título igual ou superior a 64, conforme se pode observar na Tabela 1.

Adotando-se a diluição 1:4 como ponto de corte, constata-se que, dos 2.784 soros testados, 2.014 soros, ou seja, 72,3%, tiveram o resultado positivo confirmado na RFC, ao passo que 770 (27,7%) tiveram resultado negativo no teste confirmatório (Tabela 2).

Calculando-se o intervalo de confiança, verifica-se, com 95% de probabilidade, que de 70,6% a 74,0% dos soros positivos no teste de triagem apresentaram também resultado positivo no teste confirmatório.

Tabela 1 – Número de soros bovinos com resultado positivo no teste do antígeno acidificado tamponado distribuídos de acordo com o título observado na reação de fixação de complemento (RFC) para o diagnóstico sorológico da brucelose.

Título na RFC	Número	Porcentagem
-	514	18,5
2	256	9,2
4	436	15,7
8	413	14,8
16	312	11,3
32	210	7,5
≥ 64	643	23,1
Total	2.784	100

Tabela 2 – Número de soros bovinos com resultado positivo no teste do antígeno acidificado tamponado distribuídos de acordo com o resultado da reação fixação de complemento (RFC) para o diagnóstico sorológico da brucelose.

Resultado da RFC	Número	Porcentagem
Negativo	770	27,7
Positivo (título ≥ 4)	2.014	72,3
Total	2.784	100

DISCUSSÃO

Há um grande número de testes sorológicos disponíveis para uso no diagnóstico da brucelose bovina, e com isso podem ocorrer discordâncias entre os resultados dos vários testes, discordâncias essas que estão associadas ao fato de as reações basearem-se em diferentes isotipos e diferentes quantidades de imunoglobulinas. Essas diferenças é que vão proporcionar à técnica a sensibilidade desejável nos testes indicados para triagem ou a especificidade desejável nos testes indicados para a confirmação de resultados positivos. A reação de fixação de complemento apresenta, entre os testes clássicos, a maior sensibilidade analítica para detectar IgG₁, além de que a IgG₁ é o único isotipo detectável nas condições em que o teste é realizado (WRIGHT & NIELSEN, 1990). Isso, associado ao fato de que a IgG₁ é o isotipo mais relacionado à infecção por *Brucella abortus* em bovinos (BEH, 1974, BUTLER et al., 1981, 1986), confere ao teste uma elevada especificidade, o que o credencia a ser indicado na confirmação do diagnóstico sorológico.

O PNCEBT adotou a aplicação em série dos testes AAT como triagem e RFC ou a combinação SAT mais ME na confirmação dos resultados positivos. Entretanto o programa admite também que o veterinário habilitado considere como infectado o animal com resultado positivo no teste triagem, sem a realização do teste confirmatório (BRASIL, 2004). Isso proporciona maior sensibilidade ao diagnóstico e permite maior rapidez na adoção da medida sanitária,

que é o sacrifício do animal infectado, embora acarrete redução na especificidade do diagnóstico.

Comparando os resultados do AAT com os do teste do ME, Megid et al. (2000) observaram que, entre 242 soros positivos no AAT, 226, ou seja, 93,4%, tiveram o resultado confirmado no teste ME. Na mesma comparação, Kuroda et al. (2004) observaram que 66 (90,4%) soros positivos no AAT foram também positivos no mercaptoetanol, e Greve et al. (2007) verificaram a confirmação da positividade em 44 (88%) de 50 soros bovinos positivos no AAT. Kuroda et al. (2004) realizaram também a RFC e constataram que 61 (83,6%) dos resultados positivos no AAT foram confirmados, mas adotaram um ponto de corte diferente do adotado no presente trabalho. Embora com base em um número não muito grande de soros, e mesmo usando outro teste confirmatório, as observações desses estudos estão de acordo com as do presente trabalho, que indicaram a confirmação do resultado positivo, pela RFC, em 72,3% dos 2.784 soros positivos no teste de triagem.

Os resultados obtidos permitem concluir que, ao fazer o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, caso o veterinário habilitado opte por classificar o animal como infectado com base apenas no resultado positivo do teste de triagem, a probabilidade de acerto é alta. Deve-se considerar ainda que essa indicação adequa-se principalmente a rebanhos comerciais sem valor genético elevado e a rebanhos com elevada taxa de prevalência, situação em que o valor preditivo positivo de um teste é mais elevado.

Além disso, deve-se considerar que a decisão de realizar ou não o teste confirmatório pode ser tomada com mais acerto quando se conhece o histórico de vacinação do animal testado. Infelizmente, no presente trabalho não foi possível obter informação segura sobre o histórico de vacinação de todos os animais examinados, uma vez que foram utilizadas amostras de diversas origens encaminhadas ao laboratório por veterinários de campo, nem todas com informações completas. Apesar disso, é válido admitir que em animais não vacinados a chance de um resultado positivo no teste de triagem ser confirmado é maior do que em animais vacinados com a amostra de *B. abortus* B19, uma vez que esta é sabidamente uma das principais causas de resultados falso-positivos no diagnóstico sorológico da brucelose bovina, e essa ocorrência de resultados falso-positivos pode ser reduzida quando se utiliza um teste mais específico, como a RFC.

REFERÊNCIAS

- ALTON, G. G., JONES, L. M., ANGUS, R. D., VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 190p.
- BEH, K. J. Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 17, p. 1-4, 1974.
- BRASIL. **Instrução Normativa SDA n. 06**, de 8 de janeiro de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 jan. 2004. Seção 1, p. 6-10.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.
- BUTLER, J. E., SEAWRIGHT, G. I., MCGIVERN, P. L., GILSDORF, M. Class and subclass antibody response of *B. abortus* strain 19-vaccinated and field-strain-challenged cattle: evidence for a predominant IgG₁ response in infected animals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 137, p. 790-791, 1981.
- BUTLER, J. E., SEAWRIGHT, G. I., MCGIVERN, P. L., 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. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1258-1264, 1986.
- GREVE, I. C., ZERBINATI, J., LEAL, R. F., AMORIM, L. M. P. V., SILVA, D. L., OLIVEIRA, E. M. D., CARMINATI, R., CERQUEIRA, R. B. Estudo comparativo da sensibilidade e especificidade dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Revista Acadêmica**, v. 5, n.3, p. 255-263, 2007.
- KURODA, R. B. S., PAULIN, L. M. S., NOZAKI, C. N., SILVA JUNIOR, F. F., GERONUTTI, L., MEGID, J. Prevalência da brucelose bovina na microrregião da Serra de Botucatu – Estudo comparativo dos resultados das técnicas de soroaglutinação lenta em tubos, 2-mercaptoetanol e fixação de complemento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.2, p.137-142, 2004.
- MEGID, J., RIBEIRO, M. G., MARCOS JÚNIOR, G., CROCCI, A. J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 5, 2000.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.447-459, 2002.
- SCHWABE, C. W., RIEMANN, H. P., FRANTI, C. E. **Epidemiology in Veterinary Practice**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. 303 p.
- WRIGHT, P. R., NIELSEN, K. H. **Current and future serological methods**. In: ADAMS, L. G. ed. **Advances in Brucellosis Research**. Texas A & M University Press, 1990. p. 305-320.