

Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina

Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Jane Megid
Departamento de Higiene Veterinária e
Saúde Pública
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da UNESP
Caixa Postal 560
18618-000 – Botucatu – SP
e-mail: jane@fmvz.unesp.br

1-Departamento de Higiene Veterinária
e Saúde Pública (DHVSP) da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
UNESP, Botucatu - SP
2-Departamento de Bioestatística - Instituto
de Biociências - UNESP, Botucatu - SP

Jane MEGID¹; Márcio Garcia RIBEIRO¹; Gilberto MARCOS JÚNIOR¹;
Adalberto José CROCCI²

RESUMO

Avaliaram-se comparativamente as provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação em tubo, 2-mercaptoetanol e antígeno tamponado acidificado no diagnóstico da brucelose bovina. Todas as provas apresentaram boa concordância quando considerada a interpretação preconizada pelo Ministério da Agricultura do Brasil. As provas do antígeno tamponado acidificado e do 2-mercaptoetanol apresentaram alta concordância. Neste sentido, o presente estudo propõe o uso da prova do antígeno tamponado acidificado como triagem para o diagnóstico da brucelose bovina.

UNITERMOS: Brucelose animal; Bovinos; Diagnóstico; Serologia.

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma enfermidade causada pela *Brucella abortus* (*B. abortus*), apresentando-se em todo o mundo como problema sanitário e econômico¹⁶. Com exceção de um pequeno número de países, onde foi possível a erradicação, sua incidência é considerada alta, particularmente nos trópicos e em países com pouco investimento nas áreas de produção de leite e carne¹⁹.

A infecção com *Brucella* nos animais induz no hospedeiro uma resposta imune, tanto humoral como celular¹⁸, sendo que a magnitude e a duração desta resposta podem ser afetadas por fatores como: virulência da amostra, inóculo, idade, sexo, gestação, estado imune e espécie animal¹⁹.

Tanto no homem como nos animais, a infecção natural estimula o aparecimento simultâneo ou ligeiramente diferenciado de imunoglobulinas (Ig) das classes IgM e IgG. Durante a evolução da doença, ocorre o declínio e tendência de desaparecimento da IgM, enquanto a IgG se estabelece e persiste. O desaparecimento da IgG significa, geralmente, a eliminação da infecção⁷. Em bovinos classificados como positivos para brucelose, Beh⁵ encontrou que a maioria das Ig séricas pertencia à subclasse IgG1, com pequenas quantidades da classe IgM.

Na brucelose animal, assim como em outras infecções,

o isolamento do microrganismo é o método diagnóstico mais seguro, mas, em virtude das dificuldades deste procedimento e da sua limitação para uso em grandes rebanhos, os métodos sorológicos são os mais utilizados^{3,5,7,18}.

Deve ser levada em consideração no diagnóstico da enfermidade a presença de aglutininas séricas não específicas para *B. abortus*, que ocorrem em bovinos¹⁵. Estas aglutininas podem causar as denominadas reações cruzadas, mediadas por complexos normais entre antígeno e anticorpo, envolvendo principalmente imunoglobulinas da classe IgM, decorrentes de vacinação contra brucelose¹⁴ e outros agentes. Aceita-se, atualmente, que agentes como *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Escherichia coli* 0:116 e 0:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana*, *Pseudomonas maltophilia*, bem como outros gêneros possam causar reações cruzadas com *B. abortus* em testes sorológicos, dificultando o diagnóstico da enfermidade^{8,12}.

Dentre os testes sorológicos empregados no diagnóstico da doença, destacam-se como os mais amplamente utilizados: Soroaglutinação Lenta em Tubo (SAT), Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR), Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), 2-Mercaptoetanol (2-ME), Rivanol, Fixação de Complemento (FC) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA¹⁹.

A SAT foi o teste sorológico mais comumente utilizado

para o diagnóstico da brucelose bovina até aproximadamente 1967⁹. Em anos recentes, com o melhor conhecimento das diferentes classes de Ig, surgiram dúvidas com relação a sua eficácia⁴. Possui como desvantagem a ocorrência de reações cruzadas com antígenos heteroespecíficos e com aglutininas pós-vacinais¹⁹, que podem decorrer da sua maior eficiência em detectar Ig da classe IgM, do que da subclasse IgG1¹.

O teste de SAR é uma adaptação da SAT, e se baseia na visualização da aglutinação em placa³. Mac Millan¹² considera que a SAR possui como vantagem a simplicidade de execução e precocidade de resultados em relação à SAT, porém com menor sensibilidade, enquanto Alton *et al.*³ consideram-nas idênticas. Segundo Mac Millan¹², a SAR e a SAT detectam as mesmas classes de Ig.

A prova do ATA (Rosa Bengala) consiste em uma soroaglutinação em placa, onde o antígeno é tamponado em pH baixo¹⁹. Esta acidificação do antígeno reduz a atividade da IgM¹², tornando a prova seletiva para identificação da subclasse IgG1⁷. O teste é utilizado como prova de triagem em rebanhos e possui uma grande sensibilidade em animais vacinados com a B19. Recomenda-se, porém, que os positivos nesta prova sejam retestados em provas complementares¹⁹.

O 2-ME é utilizado como teste complementar às provas de SAR e SAT³. A prova fundamenta-se na ação de certos compostos que contêm o radical tiol (2-ME), que degradam a configuração em pentâmero da IgM, determinando assim a perda da sua atividade aglutinante. Este processo torna o teste sensível às aglutinações estabelecidas pela classe IgG, que não sofre alteração na sua atividade na presença deste reagente⁷. Conforme Nicoletti¹³, a prova do 2-ME gera reações falso-positivas em menor quantidade que as provas de SAT, SAR e ATA (Rosa Bengala).

Considerando a resposta imune animal decorrente da infecção pela *Brucella* e das características das diferentes provas, pretendeu-se avaliar a concordância entre as provas de SAR, SAT, 2-ME e ATA no diagnóstico da brucelose bovina e sua aplicabilidade a campo e laboratorial.

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisados soros sanguíneos procedentes de animais adultos, de diversas raças e de diferentes propriedades, com histórico vacinal desconhecido, encaminhados para diagnóstico à Disciplina de Enfermidades Infeciosas dos Animais - FMVZ - UNESP/Botucatu-SP.

Os soros foram submetidos às provas de SAR, SAT e 2-ME, de acordo com Alton *et al.*³, e ATA, com base em Mac Millan¹². Para a avaliação estatística da concordância entre as provas quantitativas (SAR, SAT e 2-ME) e qualitativas (ATA) foram considerados positivos os títulos maiores ou iguais a 100 na SAR e SAT, de acordo com o preconizado pelo Ministério da Agricultura do Brasil para animais não vacinados⁶ e título 50 para a prova do 2-ME. A

análise estatística foi baseada no estudo comparativo dos métodos, 2 a 2, quanto à igualdade das proporções de positivos detectados pelo teste de Mc Nemar²⁰, e a concordância entre os métodos através do coeficiente Kappa², considerando-se K = 0 ausência de concordância; K entre 0,6 e 0,8 boa concordância e K = 1 concordância perfeita.

RESULTADOS

As tabelas abaixo demonstram os resultados obtidos nos diferentes testes independentemente da interpretação de positividade adotada para cada prova.

Dos animais com títulos ≤ 50 na SAR, observou-se que 89,3% (732/820) resultaram negativos ao ATA. Por outro lado, dos soros que reagiram com títulos ≥ 100 na SAR, 85,7% (144/168) resultaram positivos ao ATA. Em 1,3% (8/609) dos soropositivos no ATA verificaram-se resultados negativos na SAR (Tab.1). Dos animais com títulos ≥ 100 na SAR constataram-se 14,3% (24/168) de resultados negativos no ATA.

Comparando-se a prova do ATA com a SAT, verificou-se que dos animais com títulos ≤ 25 na SAT, 3,3% (13/388) apresentaram reações positivas no ATA. Dos animais com títulos 25 e 50 na SAT, constatou-se em 78,7% (111/141) dos soros ausência de reação na prova do ATA. Em animais com títulos 100 na SAT, 33,7% (27/80) dos soros resultaram negativos no ATA, enquanto dos soros que apresentaram título ≥ 200 na SAT, 94,1% (161/171) resultaram positivos no ATA (Tab. 2).

Quando comparados os resultados do ATA com o 2-ME, observaram-se 3,7% (16/431) de reações positivas no ATA e negativas no 2-ME. Dos soros que reagiram na diluição 1:25 no 2-ME, 59,0% (23/39) resultaram negativos no ATA. Dos animais com títulos iguais a 50 no 2-ME, 23,5% (12/51) apresentaram reações negativas no ATA, enquanto 92,1% dos soros com títulos ≥ 50 no 2-ME também reagiram no ATA (Tab. 3).

Quando comparados os resultados da SAT e SAR, verificou-se que dos animais com títulos ≥ 25 na SAT, 20,4% (96/470) dos soros foram negativos na SAR. Destes animais, 46,9% (45/96), 35,4% (34/96) e 15,6% (15/96) apresentaram, respectivamente, títulos 25, 50 e ≥ 100 (Tab. 4).

Dos soros testados comparativamente na SAR e 2-ME, verificou-se que nos animais negativos ou que apresentaram títulos ≤ 25 no 2-ME, em 63,7% (426/669) não foram constatadas reações na SAR. Por outro lado, dos animais que apresentaram títulos ≥ 25 na SAR, em 29,6% (179/605) dos soros, verificou-se ausência de reação no 2-ME, dos quais, 17,8% (108/605) e 4,1% (25/605) apresentaram, respectivamente, títulos 50 e ≥ 100 na SAR. Dos soros que resultaram negativos na SAR, observaram-se 3,5% (16/456) de reações positivas no 2-ME, com títulos ≥ 50 (Tab. 5).

Tabela 1

Resultados obtidos na prova de Soroaglutinação Rápida (SAR) comparativamente à prova do Antígeno Acidificado Tamponado (ATA). Botucatu-SP, 1999.

ATA	SAR						Total
	NEG	25	50	100	200	400	
NEG	601	42	89	22	2	0	756
POS	8	8	72	62	69	13	232
Total	609	50	161	84	71	13	988

K = 0,65

Tabela 2

Resultados obtidos na prova de Soroaglutinação Lenta (SAT) comparativamente à prova do Antígeno Acidificado Tamponado (ATA). Botucatu-SP, 1999.

ATA	SAT							Total
	NEG	25	50	100	200	400	>800	
NEG	319	56	55	27	9	1	0	467
POS	7	6	24	53	66	38	57	251
Total	326	62	79	80	75	39	57	718

K = 0,77

Tabela 3

Resultados obtidos na prova de 2-Mercaptoetanol (2-ME) comparativamente à prova do Antígeno Acidificado Tamponado (ATA). Botucatu-SP, 1999.

ATA	2 ME							Total
	NEG	25	50	100	200	400	>800	
NEG	415	23	12	3	2	1	0	456
POS	16	16	39	37	52	47	35	242
Total	431	39	51	40	54	48	35	698

K = 0,84

Tabela 4

Resultados obtidos na prova de Soroaglutinação em Tubos (SAT) comparativamente à prova de Soroaglutinação Rápida (SAR). Botucatu-SP, 1999.

SAR	SAT							Total
	NEG	25	50	100	200	400	>800	
NEG	374	45	34	12	3	2	0	470
25	34	11	4	6	1	1	0	57
50	46	26	46	45	29	6	1	199
100	11	6	11	16	27	23	12	106
200	1	5	6	11	23	19	46	111
Total	466	93	101	90	83	51	59	943

K = 0,61

Na comparação entre a SAT e o 2-ME, observou-se que dos soros com títulos ≥ 25 na SAT, 26,8% (166/620) resultaram negativos no 2-ME, dos quais 25,5% (158/620) apresentaram títulos entre 25 e 100. Dos soros negativos no 2-ME, 5,0% (31/620) apresentaram título 100 na SAT. Os resultados negativos na SAT concordaram em 99,4% (469/472) com os resultados negativos ou com títulos ≤ 25 no 2-ME (Tab. 6).

Tabela 5

Resultados obtidos na prova de 2-Mercaptoetanol (2-ME) comparativamente à prova de Soroaglutinação Rápida (SAR). Botucatu-SP, 1999.

SAR	2 ME							Total
	NEG	25	50	100	200	400	>800	
NEG	426	14	9	4	1	2	0	456
25	46	4	4	3	1	0	0	58
50	108	28	27	23	21	5	1	213
100	20	15	14	12	16	23	6	106
200	5	3	11	12	10	27	41	109
Total	605	64	65	54	49	57	48	942

K = 0,61

Tabela 6

Resultados obtidos na prova de 2-Mercaptoetanol (2-ME) comparativamente à prova de Soroaglutinação Lenta (SAT). Botucatu-SP, 1999.

SAT	2-ME							Total
	NEG	25	50	100	200	400	>800	
NEG	454	14	2	0	2	0	0	472
25	75	15	3	1	0	0	1	95
50	60	16	25	4	2	1	0	108
100	23	16	26	26	5	2	0	98
200	7	2	4	19	37	13	2	84
400	1	0	1	4	15	29	5	55
>800	0	0	0	0	3	21	64	88
Total	620	63	61	54	64	66	72	1000

K = 0,79

DISCUSSÃO

Embora a análise estatística tenha demonstrado bom coeficiente de concordância (coeficiente Kappa) entre os diferentes métodos, os menores valores destes coeficientes de concordância foram observados na comparação da SAR - considerada prova de triagem - com a SAT e provas complementares (ATA e 2-ME). O maior coeficiente de concordância foi observado entre as provas do ATA e 2-ME, seguido, respectivamente, pelo 2-ME e SAT, ATA e SAT, ATA e SAR.

As provas de SAT e SAR apresentaram bom percentual de resultados concordantes quando considerados os títulos ≤ 50 , que resultaram negativos ao ATA e 2-ME. Quando avaliado, no entanto, o resultado dos animais com títulos iguais ou superiores a 100 na SAR e SAT - considerados positivos em ambas as provas para animais não vacinados⁶ - constatou-se que 14,3% e 33,7% dos animais, respectivamente, resultaram negativos no ATA. De maneira similar, dos animais com títulos ≥ 100 na SAR e entre 25 e 100 na SAT, 4,1% e 26,8% dos soros resultaram negativos, respectivamente, no 2-ME. Estes resultados podem ser justificados em virtude de SAR e SAT reagirem indistintamente com Ig da classe IgM e IgG¹, contrariamente ao ATA e 2-ME, que apresentam reações

preferencialmente com IgG⁷, considerada a classe de imunoglobulina de maior especificidade no diagnóstico da doença. No presente estudo, elevado percentual de resultados concordantes entre SAR e SAT com o 2-ME e ATA foi observado somente em soros com títulos iguais ou superiores a 200 na SAR e SAT, sendo estes títulos considerados positivos independentemente do estado vacinal do animal⁶.

As provas do ATA e 2-ME apresentaram alto percentual de resultados concordantes, visto que 92,1% dos animais com títulos ≥ 50 no 2-ME também reagiram no ATA. Por outro lado, 3,7% dos animais positivos no ATA não apresentaram reação no 2-ME, que poderia ser justificado com base na maior sensibilidade do ATA em relação ao 2-ME, conforme relatado por Huber e Nicoletti¹⁰. Estes autores referem a sensibilidade do ATA comparável à de FC na detecção de animais vacinados, infectados com amostra de campo, além da sensibilidade do ATA superior à FC na detecção de animais infectados não vacinados, porém com menor especificidade. Consideram, desta maneira, que, quando da ocorrência de reações positivas ao ATA e negativas à FC em animais não vacinados, fatores como rebanho, vaca e histórico vacinal deveriam ser avaliados. Entretanto, Casas Olascoaga⁷ relata rápida negatividade do ATA em animais vacinados entre 3 e 8 meses de idade, testados após 24 meses de idade. No Brasil, resultados semelhantes foram descritos por Ribeiro *et al.*¹⁷, que referem ausência de animais reagentes nas provas do ATA e 2-ME no 308.º dia após a vacinação de bezerras com a B19.

O uso do ATA como teste de triagem, no diagnóstico da brucelose bovina, vem sendo feito no controle da doença em países sul-americanos, como a Argentina. Adicionalmente, o ATA também tem sido empregado como prova de triagem para brucelose humana, comparativamente à FC, com resultados promissores, em virtude de sua alta sensibilidade, especificidade, praticidade e baixo custo¹¹. Casas Olascoaga⁷ relata que o emprego do ATA como teste de triagem em campanhas de controle e erradicação da brucelose permite reduzir o número de provas diagnósticas, possibilita a detecção de casos crônicos, a eliminação de

suspeitos, além da boa correlação com a fixação de complemento.

Os resultados obtidos no presente estudo caracterizaram bom coeficiente de concordância entre os testes utilizados rotineiramente no diagnóstico da brucelose bovina, desde que respeitados os critérios de positividade definidos pelo Ministério da Agricultura do Brasil para animais vacinados e não vacinados⁶. Demonstram claramente, no entanto, a ocorrência de reações falso-positivas e falso-negativas quando do uso da prova de soroaglutinação rápida como triagem, possibilitando, por um lado, a permanência de animais positivos no rebanho, e, por outro, a eliminação de animais falso-positivos quando utilizada isoladamente. O uso desta prova como triagem obriga o envio das amostras suspeitas e positivas para o reteste em provas complementares, por laboratórios especializados, aspecto muitas vezes difícil em virtude da distância dos laboratórios e do encaminhamento das amostras, retardando e encarecendo sobremaneira o diagnóstico.

A prova do 2-ME, avaliada comparativamente ao ATA, demonstrou o maior coeficiente de concordância e se caracterizou como prova complementar específica, o que sugere a sua utilização em substituição à fixação de complemento nos laboratórios que não realizam esta última prova rotineiramente, por dificuldades técnicas e materiais.

A utilização do ATA, concordante com Casas Olascoaga⁷, elimina reações suspeitas e falso-positivas observadas nas provas de soroaglutinação rápida e em tubo, além de permitir a realização do teste a campo, possibilitando aos veterinários um diagnóstico mais acurado, reduzindo a necessidade de envio de um grande número de amostras para laboratórios especializados e o reteste de animais suspeitos.

Os resultados obtidos sugerem o uso do ATA como teste de triagem em substituição à SAR em virtude de sua alta sensibilidade, especificidade, praticidade e baixo custo, o que no contexto global resulta em menor custo diagnóstico, aliado a maior eficácia diagnóstica, possibilitando estratégias de controle da brucelose em menor espaço de tempo.

SUMMARY

Bovine serums were evaluated by the plate agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-Mercaptoethanol tests for bovine brucellosis diagnosis. All presented a good concordance when considering the official Brazilian Ministry of Agriculture interpretation. High concordance was verified for the buffered plate antigen and 2-Mercaptoethanol tests. This study suggests the use of the buffered plate antigen test as a screening test for bovine brucellosis diagnosis.

UNITERMS: Brucellosis; Cattle; Diagnosis; Serology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P. *et al.* A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **Journal of Hygiene**, v.76, n.2, p.287-98, 1976.
- 2- ALTMAN, D.J. **Practical statistics for medical research**. London : Chapman & Hall, 1991. 611p.
- 3- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. **Las técnicas de laboratorios en la brucelosis**. Ginebra : Organización Mundial de la Salud, 1976. p.55-133 (Servie Monografías, 55).
- 4- ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A. *et al.* Serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v.51, n.2, p.57-63, 1975.
- 5- BEH, K.J. Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. **Research in Veterinary Science**, v.17, n.1, p.1-4, 1974.
- 6- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. Divisão de Profilaxia e Combate às Doenças. Seção de Controle do Trânsito de Animais e de Doenças Exóticas. **Manual de procedimentos**: movimento interestadual de animais e produtos. 2.ed. Brasília, 1979. 32p.
- 7- CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, v.18, n.3/4, p.107-41, 1976.
- 8- CORBEL, M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. **Veterinary Bulletin**, v.55, n.12, p.927-42, 1985.
- 9- DAVIES, G. The Rose Bengal test. **Veterinary Record**, v.88, n.17, p.447-9, 1971.
- 10- HUBER, J.D.; NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.7, p.1529-31, 1986.
- 11- LUCERO, N.E.; BOLPE, J.E. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p.1425-7, 1998.
- 12- MACMILLAN, A. Conventional serologic tests. *In*: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.155-300.
- 13- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.24, n.24, p.69-98, 1980.
- 14- NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R.; STEMSHORN, B. *et al.* Relationship of humoral factors (antibody and complement) to immune responsiveness, resistance and diagnostic serology. **Advances in Experimental Medical Biology**, v.137, n.1, p.367-89, 1981.
- 15- NOWLAN, P.F.; GEUS, H. Use of EDTA modified antigen in the serodiagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Record**, v.116, n.1, p.13, 1985.
- 16- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1972. p.3 (Serie de Informes Técnicos, 464).
- 17- RIBEIRO, M.G.; SPAGO, N.; FAVA, N.; RATTI JR., J.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.2, p.137-50, 1997.
- 18- SUTHERLAND, S.S. Immunology of bovine brucellosis. **Veterinary Bulletin**, v.50, n.5, p.359-68, 1980.
- 19- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis**. Genebra: World Health Organization, 1986. p.58-66 (Technical Report Service, 740).
- 20- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 718p.

Recebido para publicação: 19/11/1999
Aprovado para publicação: 10/08/2000