

Comunicação

[Communication]

Avaliação de testes sorológicos de triagem para diagnóstico da brucelose bubalina

[Evaluation of screening serological tests for brucellosis diagnosis in buffaloes]

L.M.S. Paulin¹, L.E. Samartino², S.B. Conde², C. Turilli³, F. Ferreira⁴,
M. Amaku⁴, R.A. Dias⁴, J.S. Ferreira Neto^{4*}

¹Instituto Biológico de São Paulo – São Paulo, SP

²Instituto de Patobiologia – Buenos Aires, Argentina

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise – Teramo, Itália

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87

05508-270 – São Paulo, SP

O Brasil detém um dos maiores rebanhos comerciais de bubalinos do mundo, atrás apenas da Índia e da Itália. Existem búfalos em todos os países americanos, exceto no Chile e no Canadá. Na América Latina, existem aproximadamente 3,8 milhões de búfalos, sendo que 92% encontram-se no Brasil, 150.000 na Venezuela, 50.000 na Argentina, 30.000 na Colômbia e o restante nos demais países (Bubbalife, 2005).

A brucelose tornou-se alvo de programas de controle e erradicação em vários países pelo fato de ser uma zoonose e causar prejuízos à produção de carne e leite. Esses programas geralmente não fazem distinção entre as espécies bovina e bubalina, adotando estratégias comuns para ambas as espécies as quais, basicamente, apoiam-se na vacinação em massa de bezerras e na certificação de propriedades livres (Paulin e Ferreira Neto, 2003). Nessa certificação é estabelecida uma rotina de testes a intervalos regulares, com sacrifício dos animais positivos até a obtenção de dois ou mais testes negativos para todos os animais de reprodução (World..., 2010). Como as operações de certificação baseiam-se no diagnóstico indireto, existe intensa atividade científica direcionada ao aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico indireto para a brucelose bovina. Porém, o número de estudos envolvendo búfalos é reduzido, havendo uma espécie de paradigma de

que o que foi desenvolvido para bovinos também serve para bubalinos.

O teste de fixação do complemento (FC) é o que apresenta melhor correlação com os isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados (Nielsen, 1995; Nielsen et al., 1995), o que levou à sua adoção como *gold standard* para a avaliação de outros testes sorológicos, além de ser utilizado como teste confirmatório em muitos países. O *Terrestrial Animal Health Code* determina que a FC seja a prova de referência para o comércio internacional de bovinos (World..., 2010).

Os programas de controle da brucelose bovina e bubalina geralmente adotam um protocolo de testes em série para as operações de certificação de propriedades livres, o que implica a escolha de um teste de triagem que deve ter boas características intrínsecas, além de ser simples, barato e fácil de executar. Os testes mais simples e baratos para essa finalidade são os de aglutinação com antígenos tamponados (World..., 2010), especificamente o teste de Rosa Bengala (RB) ou o teste de aglutinação em placa com antígeno tamponado (BPA). O que difere entre eles é a concentração da massa bacteriana (BPA = 11% e RB = 8%) e a estirpe de *B. abortus* utilizada na produção dos antígenos - 99 ou 1119-3 para o teste RB e apenas 1119-3 para o BPA, segundo o *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (World..., 2010).

Recebido em 15 de julho de 2009

Aceito em 2 de julho de 2010

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: jsoares@vps.fmvz.usp.br

A Itália utiliza como teste de triagem o RB produzido com a estirpe 99 de *B. abortus* (RB99); o Brasil utiliza o mesmo teste, só que produzido com a estirpe 1119-3 (RB1119-3), e a Argentina o teste BPA, produzido também com a estirpe 1119-3. Apesar de a situação epidemiológica da brucelose bovina e bubalina ser diferente nesses três países, todos eles têm programas nacionais de combate à doença.

Tendo em vista essas pequenas diferenças nos testes de triagem adotados por esses países e a escassez de estudos sobre o diagnóstico sorológico da brucelose bubalina, o objetivo do presente estudo foi comparar o desempenho dos testes de triagem utilizados nesses três países.

Foram utilizados soros de 696 fêmeas bubalinas adultas, provenientes de propriedades localizadas no Vale do Paraíba, estado de São Paulo, com histórico de baixa cobertura vacinal com a cepa B19 e de problemas reprodutivos compatíveis com a brucelose. Todas essas amostras de soros foram submetidas a cinco testes para detecção de anticorpos anti-*B. abortus*: RB1119-3, RB99, BPA, 2-Mercaptoetanol (ME) e FC.

Os antígenos utilizados nos testes RB1119-3, ME e FC foram produzidos a partir da amostra 1119-3 de *B. abortus* no Instituto Biológico de São Paulo. O antígeno para o teste BPA foi produzido a partir da amostra 1119-3 de *B. abortus* pelo Laboratório de Brucelose do Instituto de Patobiologia do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Argentina. O antígeno para o teste RB99 foi produzido a partir da amostra 99 de *B. abortus* pelo Instituto Zooprofilattico Sperimentale del Abruzzo e del Molise, Itália.

Os testes RB1119-3, RB99 e ME foram executados e interpretados conforme o regulamento do PNCEBT (Brasil..., 2006). Para evitar o fenômeno de prozona, foram acrescentadas as diluições 1:400 e 1:800 no teste ME. O teste BPA foi executado e interpretado segundo o regulamento do *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria* da Argentina.

A FC assim como a titulação da hemolisina, do complemento e do antígeno foram realizadas de acordo com a técnica descrita por Alton et al. (1988). O título do soro foi obtido determinando-se a recíproca da maior diluição em que ocorreu fixação de 25% de complemento, convertendo-se o resultado em unidades internacionais (UI) de acordo com o *Veterinary Laboratories Agency* do Ministério da Agricultura do Reino Unido. Foram considerados positivos soros com títulos iguais ou superiores a 20UI.

O *gold standard* foi composto pela combinação dos testes de FC e ME. Os soros *gold standard* positivos foram aqueles positivos na FC e no ME, e os negativos aqueles negativos aos mesmos testes. Os soros com resultados inconclusivos ao ME foram descartados da análise. Segundo Martin et al. (1987), foram, então, calculadas as sensibilidades e especificidades relativas (Sr e Er) e os índices de concordância Kappa para os testes RB1119-3, RB99 e BPA. Os cálculos foram realizados pelo programa Win Episcope 2.0.

A Tab. 1 traz os resultados brutos dos testes RB1119-3, RB99 e BPA frente ao *gold standard*. A Tab. 2 foi construída com base nos dados da Tab. 1 e traz os valores encontrados de Sr, Er e do índice de concordância Kappa para os três testes.

Tabela 1. Resultados dos testes de triagem para o diagnóstico sorológico da brucelose em bubalinos frente à combinação dos testes de fixação de complemento (FC) e 2-mercaptoetanol (ME)

FC+ME	RB1119-3			RB99			BPA		
	Pos	Neg	Total	Pos	Neg	Total	Pos	Neg	Total
Pos	61	3	64	59	5	64	63	1	64
Neg	41	499	540	30	510	540	22	518	540
Total	102	502	604	89	515	604	85	519	604

RB1119-3: antígeno acidificado tamponado produzido com estirpe 1119-3 de *Brucella abortus*; RB99: antígeno acidificado tamponado produzido com estirpe 99 de *Brucella abortus*; BPA- aglutinação em placa com antígeno tamponado.

Tabela 2. Valores de sensibilidade (Sr) e especificidade (Er) relativas e do índice Kappa dos testes de triagem para o diagnóstico sorológico da brucelose em bubalinos frente à combinação dos testes de fixação de complemento (FC) e 2-mercaptoetanol (ME)

Teste	Sr [IC 95%]	Er [IC 95%]	Sr.Er	Kappa [IC 95%]
BPA	0,98 [0,95-1,00]	0,96 [0,94-0,98]	0,94	0,82 [0,76-0,89]
RB99	0,92 [0,86-0,99]	0,94 [0,92-0,96]	0,87	0,74 [0,66-0,82]
RB1119-3	0,95 [0,90-1,00]	0,92 [0,90-0,95]	0,88	0,70 [0,61-0,78]

BPA- aglutinação em placa com antígeno tamponado; RB99: antígeno acidificado tamponado produzido com estirpe 99 de *Brucella abortus*; RB1119-3: antígeno acidificado tamponado produzido com estirpe 1119-3 de *Brucella abortus*; IC: intervalo de confiança.

As melhores combinações de sensibilidade e especificidade relativas foram alcançadas pelo BPA (Tab. 2). Embora os intervalos de confiança dos índices Kappa dos três testes sobreponham-se, o melhor valor pontual também foi verificado para o BPA (Tab. 2). A comparação desses valores de sensibilidade e especificidade relativas com aqueles encontrados por outros autores deve ser feita com cautela, pois existem diferenças quanto à composição do *gold standard* e pontos de corte adotados.

Sandhu e Joshi (1993), Fosgate et al. (2002) e Molnár et al. (2002) avaliaram o teste de RB produzido com estirpe 1119-3 de *B. abortus*. Todos relataram valores de Sr dentro do intervalo de confiança calculado no presente estudo para os testes RB1119-3 (0,95 – 0,90-1,00 –, Tab. 2) e RB99 (0,92 – 0,86-0,99 –, Tab. 2). Sandhu e Joshi (1993) analisaram soros de 359 fêmeas bubalinas adotando como *gold standard* a combinação do ME com o teste de inativação pelo calor. As Sr encontradas foram de 0,95 e 0,94, respectivamente, para fêmeas vacinadas e não vacinadas. Fosgate et al. (2002) utilizaram 381 amostras de soro de fêmeas bubalinas divididas em quatro grupos: dois infectados (vacinadas e não vacinadas), utilizados para o cálculo da Sr e dois provenientes de rebanhos livres de doença e não vacinados, utilizados para o cálculo da Er. Esses autores estimaram a Sr e a Er sem uso de *gold standard*, a partir de abordagem bayesiana, assumindo independência entre os testes. A Sr, encontrada foi de 0,90. Molnár et al. (2002) estudaram 440 amostras de soros bubalinos e compuseram o grupo de *gold standard* positivo com base, exclusivamente, nos resultados do teste ELISAC. A Sr encontrada foi de 0,93.

Fosgate et al. (2002) e Molnár et al. (2002) também calcularam a especificidade do teste RB produzido com a estirpe 1119-3 de *B. abortus*,

obtendo valores de 0,99 e 0,94, respectivamente. A especificidade de 0,99, obtida por Fosgate et al. (2002), foi mais alta aos limites superiores dos intervalos de confiança calculados para as Er dos três testes aqui ensaiados (Tab. 2). Isso provavelmente é decorrente da diferente composição dos *gold standard* negativos. Fosgate et al. (2002) utilizaram animais provenientes de rebanhos livres e não vacinados, nos quais a probabilidade de ocorrência de falso-positivos é menor do que no grupo *gold standard* negativo do presente experimento. Molnár et al. (2002) relataram Er que se situou dentro dos intervalos de confiança dos três testes aqui ensaiados (Tab. 2).

Fosgate et al. (2002) relataram uma sensibilidade de 0,96 para o teste BPA, dentro, portanto, do intervalo de confiança das Sr encontradas para os três testes no presente estudo (Tab. 2). Os mesmos autores citaram a especificidade de 0,91, abaixo dos limites inferiores dos intervalos de confiança das Er obtidas para os testes PBA e RB99. Segundo esses autores, em rebanhos sabidamente livres de infecção brucélica, esse baixo valor pode significar aumento na probabilidade de resultados falso-positivos, um complicador nos programas de certificação de propriedades livres, principalmente naquelas com um grande número de animais.

O melhor Kappa foi o do teste BPA (ótimo), seguido pelo RB99 e RB1119-3 (substanciais). Molnár et al. (2002) e Pinto et al. (2005) verificaram Kappa de 0,84 e 0,93, respectivamente, para o teste RB produzido com a estirpe 1119-3 de *B. abortus*, acima dos limites superiores dos intervalos calculados de confiança do Kappa para os testes RB1119-3 e BB99 (Tab. 2). Os 90 soros analisados por Pinto et al. (2005) eram de fêmeas bubalinas vacinadas, e os critérios para composição dos *gold standard* foram os mesmos adotados no presente estudo.

Os resultados obtidos não divergiram da maioria das publicações sobre o tema. Embora tenham apresentado resultados ligeiramente diferentes, pode-se considerar que os três testes ensaiados têm *performances* equivalentes. O fato a ressaltar é que os valores pontuais de Er situaram-se entre 0,92 e 0,96, confirmando que a melhor indicação para a utilização desses testes é como procedimento de triagem numa estratégia de testes em série. Em outras palavras, os resultados positivos para qualquer desses testes devem sempre ser confirmados por outro, sobretudo em situação de baixa prevalência real da doença.

Os melhores resultados da combinação entre sensibilidade e especificidade e também do índice Kappa foram verificados para o teste BPA. Esses resultados sugerem que o BPA é um teste de triagem melhor que o RB para bubalinos, independente da estirpe de *B. abortus* utilizada para produzir o RB. Assim, seria interessante realizar ensaios posteriores com esse teste, porém empregando *gold standard* positivos com a confirmação bacteriológica da infecção e *gold standard* negativos provenientes de rebanhos certificados como livres de brucelose.

Palavras-chave: brucelose, búfalos, diagnóstico sorológico, triagem

ABSTRACT

The study compared the performance of three screening serological tests: buffered plate antigen (BPA), Rose-Bengal produced with 1119-3 Brucella abortus strain (RB1119-3), and Rose-Bengal produced with 99 Brucella abortus strain (RB99). Sera from 696 adult female animals were submitted to BPA, RB1119-3, RB99, 2-mercaptoethanol test (ME), and complement fixation test (FC). The gold standard was the combination of CF and ME. The Kappa values for BPA, RB99, and RB1119-3 were 0.82, 0.74, and 0.70, respectively. The relative sensitivity and specificity for the same tests were 0.98 and 0.96, 0.92 and 0.94, and 0.95 and 0.92, respectively. These results indicate that BPA is a better screening test than RB for buffalo, regardless of the B. abortus strain in RB.

Keywords: brucellosis, buffaloes, serological tests, screening

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D. et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: Intitut National de la Recherche Agronomique, 1988. 545p.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)*. Manual Técnico. Brasília, 2006, 184p.

BUBBALIFE. *Búfalos*. Disponível em: <<http://www.bubbalife.com.br.html>>. Acessado em: 2 jan. 2005.

FOSGATE, G.T.; ADESIYUN, A.A.; HIRD, D.W. et al. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Am. J. Vet. Res.*, v.63, p.1473-1608, 2002.

MARTIN, S.W., MEEK, A.H., WILLEBERG, P. *Veterinary epidemiology: principles, and methods*. Ames: University Press, 1987. 343p.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C. et al. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.22, p.41-44, 2002.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Arch. Med. Vet.*, v.28, p.9-17, 1995.

NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D. et al. Improved CELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopatol.*, v.48, p.285-295, 1995.

PAULIN, L.M.S.; FERREIRA NETO, J.S. *O combate à brucelose bovina*. Situação brasileira. Jaboticabal: Editora Funep, 2003, 154p.

PINTO, M.R.A.; FAGLIARI, J.J.; MATHIAS, L.A. et al. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação do complemento e 2-mercaptoetanol, para o diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. *Ars Vet.*, v.21, supl., p.147-154, 2005.

SANDHU, K.S.; JOSHI, D.V. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic tests for brucellosis. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, v.36, p.458-465, 1993.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Terrestrial Animal Health Code, Chapter 11.3. *bovine brucellosis*. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.4.3. *bovine brucellosis*. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acessado em 15 jul. 2010.