

COMPARAÇÃO ENTRE AS PROVAS DE 2-MERCAPTOETANOL E DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA EM ANIMAIS COM DIFERENTES HISTÓRICOS VACINAIS

Paulo Martins Soares Filho¹, Kelly Fagundes Nascimento², Guilherme Canhestro de Faria³,
Ronnie Antunes de Assis⁴

RESUMO

Foi realizada comparação entre os testes de 2-mercaptoetanol e fixação de complemento pelos testes kappa e qui-quadrado de McNemar a partir dos resultados obtidos em 194 amostras de soro sanguíneo bovino enviadas ao LANAGRO/MG para confirmação do diagnóstico da brucelose. Obtiveram-se 87,76% de resultados concordantes, com kappa igual a 0,75 ($p < 0,05$) variando de 0,655 a 0,843 (95% de confiabilidade). Não foi observada discordância estatisticamente significativa entre as provas ao teste de qui-quadrado de McNemar. Os resultados obtidos contribuem nas recomendações do PNCEBT quanto ao uso destes dois testes, no entanto, fica clara a necessidade de uma avaliação mais profunda dos mesmos em função dos resultados discordantes encontrados notadamente entre os soros de títulos mais baixos. Recomenda-se a construção de um banco de soros de referência que permitiria a validação dos mesmos de modo a reduzir a possibilidade de falso-negativos, mais danosos ao PNCEBT.

Palavras-chave: *Brucella*, diagnóstico sorológico, 2-mercaptoetanol, fixação de complemento.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*, que acomete animais domésticos, podendo ser transmitida ao ser humano. Entre os bovinos, o principal sintoma clínico é o abortamento no terço final da gestação, mas normalmente, os animais infectados são assintomáticos (CORBEL, 2006).

Por essas características, as provas laboratoriais têm papel fundamental na identificação de animais ou rebanhos infectados. Dentre elas, as provas sorológicas são as mais utilizadas como método diagnóstico auxiliar por serem mais baratas, mais rápidas e mais simples de serem executadas em comparação com outras, como isolamento, identificação e biologia molecular (BRASIL, 2006).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) preconiza a utilização das provas de soroaglutinação lenta em tubos / 2-mercaptoetanol (2-ME) e fixação de complemento (FC) como testes confirmatórios e/ou definitivos às amostras reagentes ao teste de triagem pelo antígeno acidificado tamponado (BRASIL, 2006).

¹ Médico Veterinário, MSc, Fiscal Federal Agropecuário – LANAGRO/MG. Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, Avenida Rômulo Joviano s/nº., Caixas Postais 35 e 50, 33600-000, Pedro Leopoldo-MG. E-mail: paulomfilho@yahoo.com.br

² Médica Veterinária, Fiscal Federal Agropecuário – LANAGRO/MG

³ Médico Veterinário, MSc, Fiscal Agropecuário, Convênio Instituto Mineiro de Agropecuária de Minas Gerais – LANAGRO/MG

⁴ Médico Veterinário, DSc, – LANAGRO/MG

Tais recomendações baseiam-se na alta especificidade dessas provas (NICOLETTI, 1969; STEMSHORN et al., 1985; NIELSEN, 2002) obtida por meio da calor (FC) (MACMILLAN, 1990).

Segundo Jacobson (1998), os testes sorológicos empregados no diagnóstico de doenças infecciosas devem ser constantemente avaliados quanto ao seu desempenho (sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão etc.), mesmo depois de validados. O teste kappa constitui-se uma alternativa a essa necessidade, uma vez que permite a comparação entre dois testes sem levar em consideração os valores de suas respectivas especificidades e sensibilidades, além de não necessitar de padrões-ouro para ser realizado (TARABLA, 2000; MCKENNA e DOHOO, 2006).

O presente trabalho teve por objetivo comparar os testes de 2-ME e fixação de complemento executados na rotina do LANAGRO/MG para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina e estimar as concordâncias por teste kappa e qui-quadrado de MacNemmar.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 194 amostras de soro provenientes de diferentes regiões do país e obtidas de fêmeas com mais de 24 meses de idades provenientes de animais vacinados e não vacinados, enviadas ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) entre 2006 e 2007, foram analisadas na rotina do laboratório pelas provas de antígeno acidificado tamponado (triagem) e/ou soroaglutinação lenta em tubos / 2-mercaptoetanol (2-ME) (Brasil, 2006), conforme solicitação feita pelos usuários, veterinários habilitados ou dos serviços de defesa sanitária animal estaduais e federal. As mesmas amostras também foram submetidas à prova de fixação de complemento pela microtécnica a quente, segundo Anônimo (1977) e Alton et al.

inativação das imunoglobulinas da classe M (IgM), principais responsáveis pelas reações inespecíficas, quer seja pela ação de um agente redutor (2-ME) ou pelo

(1988), utilizando como ponto de corte 25% de fixação de complemento na diluição 1:4.

Todos os equipamentos, reagentes, procedimentos e registros utilizados atenderam às normas de Garantia da Qualidade em implantação no LANAGRO/MG (Manual da Qualidade LANAGRO/MG - documento interno). Os antígenos utilizados foram previamente testados e aprovados para uso de acordo com a IN15 de 19 de fevereiro de 2004 (BRASIL, 2004).

Os títulos dos soros foram tabulados e foi construída uma tabela de contingência 2x2 com os resultados obtidos em ambas as provas para as 194 amostras. Foi utilizado o teste Kappa para avaliar a concordância entre as provas e o teste de qui-quadrado de MacNemmar para avaliar a discordância entre elas (SIEGEL, 1975; TARABLA, 2000; DORIA FILHO, 2001).

Foi estabelecido o intervalo de confiança do kappa, com 95% de confiabilidade a partir da fórmula do erro padrão do índice:

$$(k) = \frac{[(fo(1-fo)/N(1-fe)^2)]^{1/2}}{k}$$

conforme (VERAS e MARTINS, 1994), sendo:

fo = frequência observada

fe = frequência esperada

N = número de comparações realizadas

RESULTADOS

Os títulos observados no 2-ME e na FC são apresentados na Tabela 1, e na Tabela 2 é apresentada a comparação de resultados entre as duas provas. Consideraram-se como sendo positivas as amostras com título maior ou igual a 25 na prova de 2ME e título maior ou igual a quatro, com no mínimo 25% de fixação de complemento, na prova de FC.

Tabela 1 – Resultados das provas de 2-mercaptoetanol e fixação de complemento em 194 amostras de soro enviadas para o diagnóstico de Brucelose bovina ao LANAGRO/MG entre 2006 e 2007.

		Títulos Fixação de Complemento (NEG < 4, POS ≥ 4)						
		NR	2	4	8	16	32	64
Títulos 2- Mercaptoetanol (NEG < 25, POS ≥ 25)	NR	44	3	3				
	25I	19	7	10				
	25	1	1	3				
	50I	5	2	13	9	1		
	50	1		2	2	3		
	100I			3	5	10	2	
	100				2	1	1	
	200I				1	2	1	
	200	1				1	1	5

NR: não-reagente, NEG: negativo, POS: positivo, Total de amostras analisadas 194

Tabela 2: Resultados concordantes e discordantes entre 2-mercaptoetanol e fixação de complemento em soros bovinos enviados para o diagnóstico de Brucelose bovina ao LANAGRO/MG entre 2006 a 2007.

2- Mercaptoetanol	Fixação de Complemento		Totais
	Positivo (≥4)	Negativo (<4)	
Positivo (≥25)	97	11	108
Negativo (<25)	13	73	86
Totais	110	84	194

Concordância = 87,76%; kappa = 75,0%, Intervalo de confiança = 65,5% - 84,3%; $\chi^2 = 1,1$ (p>0,05)

Das 194 amostras analisadas, seis foram encaminhadas sem o resultado do teste de triagem, outras sete não reagiram à prova do antígeno acidificado tamponado e as 181 restantes reagiram. Cento e oito amostras reagiram ao teste de 2-ME e foram consideradas positivas e outras 86 amostras foram consideradas negativas. Na prova de FC, esses valores corresponderam a 110 e 84, respectivamente.

De acordo com os resultados, observou-se uma concordância de 87,76% entre as provas, sendo kappa igual a 0,75 (p<0,05), com intervalo de confiança variando de 0,655 a 0,843 e qui-quadrado igual a 1,1 (p>0,05).

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que há concordância de resultados acima do que é devido ao acaso e que não há discordância acima do esperado entre as provas. Registra-se que a discordância e a concordância nos resultados foram observadas nos mesmos soros.

Mesmo sendo o 2-ME e a FC provas biologicamente relacionadas (ANDERSON et al., 1964; NIELSEN, 2002), não foi encontrado valor elevado para kappa. Outros pesquisadores, no entanto, obtiveram: 0,919 para bovinos vacinados e 0,885 para bovinos não

vacinados (PAULIN et al., 2002); 0,96 para bovinos (KURODA et al., 2004) e 0,86 em búfalos de um rebanho infectado do estado de São Paulo (PINTO et al., 2005). Contudo, a comparação entre os intervalos de confiança revela não haver diferença significativa entre o valor obtido nesse estudo e os kappas relatados por Paulin et al. (2002) e Pinto et al. (2005).

Acredita-se que o menor valor de kappa obtido em relação aos demais (PAULIN et al., 2002; KURODA et al., 2004; PINTO et al., 2005) seja devido, principalmente, aos resultados discordantes obtidos nas diluições mais baixas de ambas as provas (Tabela 1). Isso indica que estudos conduzidos predominantemente com soros de altos títulos e amostras não-reagentes ou que contemplem um pequeno número de amostras com baixo título sorológico poderiam superestimar o valor do kappa. Como em nenhum desses estudos foram utilizados soros sabidamente positivos e sabidamente negativos, não foi possível fazer uma comparação mais acurada entre os resultados.

O tipo de amostragem realizada neste estudo pode ter contribuído, pelo menos em parte, para o valor de kappa encontrado, já que foi analisado um número considerável de amostras com baixo título sorológico, fato que provavelmente não ocorreria se as mesmas fossem tomadas aleatoriamente na população levando-se em consideração os índices de prevalência da doença no Brasil. Este tipo de amostragem não é o mais comum nesses tipos de estudos, mas Greiner e Gardner (2000) preveem o uso da mesma e Dajer et al. (1992) aplicaram o mesmo procedimento em estudo semelhante.

Uma amostra que não reagiu à prova de FC apresentou título maior ou igual a 200 na prova de 2-ME. Por se tratar de uma amostra oriunda de um animal do qual foi isolada *Brucella* spp. (LANAGRO, dados não publicados), trata-se, provavelmente, de uma reação de prozona ocorrida na prova de FC, possivelmente devido a uma maior

concentração de IgG₂ presente na mesma (PLACKETT et al.,1975; MCNAUGHT et al., 1977; SUTHERLAND e SEARSON, 1990). Apesar de não ter sido observada nenhuma reação de prozona na prova de 2-ME, dentre as amostras analisadas, este fenômeno já foi constatado na rotina laboratorial do LANAGRO/MG (LANAGRO/MG dados não publicados) e já foi relatado também por Pinto et al. (2005) em soros de búfalos. Em ambos os casos, a frequência dessas reações foi baixa (PINTO et al, 2005; LANAGRO/MG dados não publicados).

De acordo com os resultados observados nesse estudo, verifica-se que ambas as técnicas são equivalentes e podem ser utilizadas como provas confirmatórias como recomendado pelo PNCEBT (Brasil, 2006), haja vista o índice de concordância entre elas. Contudo, há divergência de resultados entre as duas provas, notadamente nos soros de títulos baixos, e o kappa por si só é incapaz de indicar qual das provas dá resultados mais confiáveis. Desse modo, torna-se necessária a realização de estudos mais aprofundados dos parâmetros de desempenho destes testes. Um estudo dessa natureza permitiria ainda avaliar de forma mais objetiva a relação custo/benefício de cada prova, especialmente de forma a evitar resultados falso-negativos, mais danosos a um programa de controle e erradicação, como o da Brucelose, por permitir a manutenção de animais doentes no rebanho (MOLNÁR et al., 2002; PINTO et al., 2005).

Assim, sugere-se a criação de um banco de soros de referência, o qual poderia ser utilizado não só para a validação dos testes já existentes, como também de novos testes que se deseja implantar no país. Diante das dificuldades de se obter tal material, um trabalho colaborativo entre instituições de pesquisa e/ou ensino, serviços de defesa sanitária animal, inspeção sanitária, laboratórios credenciados da rede do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e veterinários habilitados pelo

PNCEBT, poderia ser uma alternativa mais viável de obtê-lo.

Comparison between 2-mercaptoethanol and complement fixation test for the serological diagnostic of bovine brucellosis in animals with different vaccination history

ABSTRACT

One hundred ninety four bovine serum samples were submitted to 2-mercaptoethanol and complement fixation test at LANAGRO's routine confirmatory test procedures for bovine Brucellosis diagnosis. Sample results were compared using Kappa statistics and McNemar's chi-square test. Agreement between test results was observed in 87,76% sera, kappa index was 0,75 ($p < 0,05$) varying from 0,655 to 0,843 (95% confidence). Observed differences were not statistically significant ($p > 0,005$). Results corroborate PNCEBT recommendations for 2-mercaptoethanol and complement fixation test use as confirmatory tests for bovine Brucellosis serological diagnosis. Nevertheless disagreement among low titer serum samples address to the necessity for further diagnostic test's evaluation regarding to avoid animal's misclassification as false-negative reactors which is more deleterious for a eradication control Brucellosis program. For these purposes it is necessary to build a reference serum bank which aims to validate these tests.

Key-words: Brucella, Sorologic Diagnosis, 2-mercaptoethanol, Complement Fixation

REFERÊNCIAS

ANÔNIMO. Standardised complement fixation test for the bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 53, n.8, p. 394-400, 1977.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. **Thechniques for the**

brucellosis laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988, 190p.

ANDERSON, R.K.; JENNESS, R.; BRUMFIELD, H.P.; GOUGH, P. Brucella-agglutinating antibodies: relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. **Science**, Washington, v. 143, n.20, p. 1331-1335, 1964.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, de 19 de fevereiro de 2004. Regulamento Técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra a Brucelose e antígenos para diagnóstico da Brucelose. **Diário Oficial da União** Nº 57, Brasília, 24 de março de 2004, Seção 1, p. 25-26, 2004.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Manual Técnico**. 2006. 184p.

CORBEL, M.J. **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: WHO Press, 2006, 89p.

DAJER, A.; GUTIERREZ, E.; HONHOLD, N.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S. Comparison of five serological tests to detect *Brucella abortus* antibodies and a report on prevalence of the disease in livestock in the state of Yucatan, Mexico. Regional network for Latin America on animal disease diagnosis using immunoassay and labeled DNA probe techniques. **Proceedings of a Final Research Co-ordination Meeting of an FAO/IAEA/SIDA Co-ordinated Research Programme, Join FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Heredia, Costa Rica**, p. 131 – 137, 1992

DORIA FILHO, ULISSES. **Introdução à bioestatística para simples mortais**. São Paulo: Negócio Editora, 2001, 157 p.

GREINER, M.; CARDNER, I.A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 45, n. 1-2, p. 3-22, 2000.

JACOBSON, R.H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Revue Scitifique et Technique des Office International Epizootie**. Paris, v. 17, n. 2, p. 469-486, 1998.

KURODA, R.B.S.; PAULIN, L.M.S.; NOZAKI, C.N.; SILVA JÚNIOR, 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**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 137 – 142, 2004.

MacMILLAN, A. P. Conventional serological tests. In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990, Cap. 8, p. 153 – 197.

McKENNA, S.L.B.; DOHOO, I.R. Using and interpreting diagnostic tests. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 22, n.1, p. 195-205, 2006.

McNAUGHT, D.J.; CHAPPEL, R.J.; ALLAN, G.S.; GOURKE, J.A.; ROGERSON, B.A. The effects of IgG₂ and antigen concentration on prozoning in the complement fixation test for bovine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 22, n.2, p. 194 – 197, 1977.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose

bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n.2, p. 41-44, 2002.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose bucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.30, n.10, p.1811-1816, 1969.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n.1-4, p. 447 – 459, 2002.

PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes de 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 41-47, 2002.

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

PLACKETT, B.A.; ALTON, G.G. A mechanism for prozone formation in the complement fixation test for bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 51, n.8, p. 374 – 377, 1975.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Brasil: McGraw-Hill, 1975, 350p.

STEMSHORN, B.W.; FORBES, L.B.; EAGLESOME, M.D.; NIELSEN, K.H.; ROBERTSON, F.J.; SAMAGH, B.S. A comparison of standard serological tests

for the diagnosis of bovine brucellosis in Canadá. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa , v. 49, n.4, p.391-394,1985.

SUTHERLAND, S.S., SEARSON, J. The immune response to *Brucella abortus*: The humoral response. In: NIELSEN, K; DUNCAN, J.R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990, Cap. 3, p. 65-83.

TARABLA, H. D. **Epidemiologia diagnóstica**. Universidad Nacional del Litoral, Argentina: Editora, 2000. 120p.

VERAS, C.M.T.; MARTINS, M.S. A confiabilidade dos dados nos formulários de autorização de internação hospitalar (AIH), Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, 1994. Disponível em <http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S0102-311x1994000300014&script=sci_arttext>. Acesso em 11 novembro 2008.