

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS DESIDÉRIO FINAMOR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

DESEMPENHO DO TESTE DE POLARIZAÇÃO FLUORESCENTE NO
DIAGNÓSTICO DE *Brucella abortus*

Alessandra Lopes Goelzer

Eldorado do Sul, abril de 2016.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS DESIDÉRIO FINAMOR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

DESEMPENHO DO TESTE DE POLARIZAÇÃO FLUORESCENTE NO
DIAGNÓSTICO DE *Brucella abortus*

Alessandra Lopes Goelzer

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Saúde Animal (PPGSA) da FEPAGRO como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Saúde Animal, com ênfase em Epidemiologia e Defesa Sanitária Animal.

Orientador: Dr. Rogério Rodrigues

Co-orientador: Dr. Geder Paulo Herrmann

Eldorado do Sul, abril de 2016.

Ficha catalográfica

COMISSÃO AVALIADORA DA DISSERTAÇÃO

Dr. Rogério Rodrigues

Orientador e presidente da comissão

Dr. Fernando Padilla Poester
LANAGRO MG
, Minas Gerais, Brasil

Dr. Marilise Oliveira Mesquita
UFRGS
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Dr. Mário de Menezes Coppola
FEPAGRO SAÚDE ANIMAL - IPVDF
Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Fabiana Quoos Mayer
(*suplente*)
FEPAGRO SAÚDE ANIMAL - IPVDF
Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Veterinária (MICROVET) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Tempo de execução do mestrado:
24 meses

Apoio financeiro a este trabalho:
Laboratório de Microbiologia Veterinária (MICROVET)

Bolsa de mestrado concedida ao autor deste trabalho pela CAPES.

*“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito
trabalho”*

(Clarice Lispector)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
a minha filha Catarina,
que chegará para alegrar
ainda mais meus dias.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, pela oportunidade de cursar o mestrado em uma instituição de ensino pública, pela infra-estrutura e professores.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realizar meus experimentos e minha docência orientada em sua estrutura.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, por não medir esforços em ajudar seus primeiros mestrandos.

Ao orientador Dr. Rogério Rodrigues que acreditou na minha capacidade de tornar-me mestra com suas orientações.

Ao co-orientador Prof. Dr. Geder Paulo Herrmann que me proporcionou trabalhar no Laboratório de Microbiologia Veterinária e sempre me desafiou a ser uma profissional competente.

À Vanessa por sua calma e extrema dedicação ao me auxiliar da preparação a leitura de todos os testes, e a Aline que nos piores momentos veio me “salvar” no laboratório. A vocês meninas toda a gratidão do mundo!

Às meninas da primeira turma pela parceria e companheirismo a cada aula, trabalho, intervalo, e no whats!!

Aos demais professores, colegas de turma, colegas de laboratório e amigos que estiveram durante estes dois anos participando da minha formação e sendo parte importante da minha vida.

E por fim, destaco a imensa gratidão a minha família, a minha mãe Maria Silvana e a minha irmã Maiara. Sem o seu amor e apoio nada disso seria possível.

Ao meu namorado, e pai da Catarina, Eduardo Augusto Küntzer pela paciência e carinho com que sempre me apoiou, por não me deixar desistir dos meus sonhos, mesmo com todas as surpresas que o caminho nos trouxe.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2-ME	2-Mercaptoetanol
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FC	Fixação de Complemento
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
LPS-O	Lipopolissacarídeo de cadeia O
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MICROVET	Laboratório de Microbiologia Veterinária
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPGSA	Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal
PROCETUBE	Programa Estadual de Controle e Erradicação da Tuberculose e da Brucelose Bovídea
RS	Rio Grande do Sul
S	Sensibilidade
SAL	Soroaglutinação Lenta
SEAPA	Secretaria de Agricultura, Pecuária e Agronegócio
SEAPI	Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação
SP	Especificidade
TPF	Teste de Polarização Fluorescente
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
USA	Estados Unidos
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
μP	Milipolarização

ÍNDICE

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Brucelose	13
2.2 Brucelose bovina no Brasil	14
2.3 Importância econômica	15
2.4 Controle e erradicação da brucelose bovina.....	16
2.5 Certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose	16
2.6 Diagnóstico da brucelose bovina.....	17
2.6.1 Antígeno Acidificado Tamponado.....	19
2.6.2 Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol	20
2.6.3 Polarização Fluorescente	21
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Geral.....	22
4.2 Específicos.....	23
5. METODOLOGIA	23
5.1 Amostras	23
5.2 Testes sorológicos	24
5.2.1 Teste de Polarização Fluorescente.....	24
5.2.2 Antígeno Acidificado Tamponado.....	25
5.2.3 Soroaglutinação Lenta em Tubos e 2-Mercaptoetanol.....	25
5.2.4 Análise dos dados	26
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSSÃO	33
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	41

RESUMO

Avaliou-se o desempenho do teste de polarização fluorescente (TPF) em diferentes situações para o diagnóstico da brucelose bovina. A avaliação se deu através da comparação do TPF com as provas do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do 2-mercaptoetanol (2-ME/SAL), provas preconizadas para o diagnóstico da brucelose bovina pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Para tanto, foram utilizadas 1666 amostras de soro bovino, provenientes de propriedades certificadas livres ou monitoradas pelo PNCEBT, e de propriedades não certificadas onde havia a circulação da doença. O TPF identificou amostras falso-negativas deixadas pelo teste de triagem (AAT), e teve bons valores de sensibilidade, altos valores relativos de especificidade e valores preditivos (positivo e negativo). A concordância entre os testes do TPF com o AAT e com o 2-ME/SAL na análise geral das amostras foi boa, com índices kappa de 0,7921 e 0,7145. O desempenho do TPF foi satisfatório para que seja utilizado no diagnóstico da brucelose bovina.

ABSTRACT

We evaluated the performance of the fluorescence polarization assay (TPF) in different situations for the diagnosis of bovine brucellosis. The evaluation was made through the TPF comparison with the evidence of the acidified antigen buffered (AAT) and 2-mercaptoethanol (2-ME / SAL) tests recommended for the diagnosis of bovine brucellosis by the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT). Therefore, we used 1666 serum samples, from certified farms free or monitored by PNCEBT, and uncertified properties where there was the movement of the disease. The TPF identified false-negative samples left by the screening test (AAT), and had good sensitivity, high relative values of specificity and predictive values (positive and negative). The agreement between the TPF tests with the AAT and the 2-ME / SAL in the overall analysis of the samples was good with kappa indexes of 0.7921 and 0.7145. The performance of TPF was satisfactory to be used for diagnosis of bovine brucellosis.

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa cujo principal sintoma e meio de transmissão é o abortamento. É uma doença de grande importância por estar amplamente difundida nos rebanhos de todo o território brasileiro, e por sua relevância em saúde pública. É uma zoonose de distribuição mundial, em que poucos países desenvolvidos conseguiram a erradicação da brucelose, e o fizeram através da adoção de medidas sanitárias destinadas ao controle e erradicação desta doença.

O Brasil busca o controle e erradicação da brucelose bovina através da vacinação compulsória das bezerras entre três e oito meses de idade, diagnóstico sorológico dos animais, e abate sanitário dos animais positivos, conforme prevê o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). O estado do Rio Grande do Sul adota medidas que complementam o PNCEBT, descritas no Programa Estadual de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovídea (Procetube).

Os testes de diagnóstico sorológico utilizados são bastante antigos, e a busca por novos testes que possam ser mais eficientes motivaram esta pesquisa. O Teste de Polarização Fluorescente (TPF) é um teste já validado em alguns países, incluindo o Brasil, onde seu uso foi regulamentado em 2010. Neste trabalho, os testes preconizados pelo PNCEBT foram comparados ao TPF a fim de avaliar o desempenho deste em diversas situações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brucelose

A brucelose é uma importante zoonose causada por bactérias gram negativas. Esta bactéria foi isolada pela primeira vez por David Bruce, em 1886, na Ilha de Malta, a partir de humanos que teriam morrido por uma febre, chamada por ele de Febre de Malta. Já em 1897, Bernard Bang descobriu que o aborto infeccioso bovino, doença que acometia o norte europeu, era causado por um germe que foi isolado a partir de fetos abortados de vacas. Em 1920, Meyer e Shaw levando em consideração as analogias entre o germe causador da Febre de Malta e do aborto infeccioso bovino, propuseram reuni-los em um único gênero chamado *Brucella*, em homenagem a Bruce. (Pacheco e Mello, 1956)

As bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos ou bastonetes curtos, gram negativos, e são extracelulares facultativos (Bathke, 1999). São aeróbios, imóveis e crescem bem em temperaturas entre 20 e 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal para seu crescimento (OIE, 2008). Também podem ser classificadas de acordo com sua morfologia colonial, sendo divididas entre lisas e rugosas através da presença ou ausência, respectivamente, da cadeia O na superfície externa da bactéria (Alton et al., 1988).

O gênero *Brucella* contém nove espécies conhecidas, sendo as mais estudadas a *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* e *B. canis*. Geralmente a *B. melitensis* e *B. suis* são mais virulentas para o homem do que a *B. abortus* e *B. canis*. Em humanos a *Brucella* causa a febre ondulante, que pode persistir e progredir para uma doença crônica incapacitante com várias complicações como artrites deformantes e osteomielites, orquites e epididimites, e até mesmo endocardites (Brucellosis, 2006).

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Brucella abortus*, que se manifesta clinicamente por aborto no terço final da gestação, retenção de placenta e nascimento de bezerros fracos (Corbel et al., 2006). A principal forma de entrada da brucelose em uma propriedade é a introdução de animais infectados (Brasil, 2006). A transmissão faz-se principalmente pelo contato

direto com os líquidos e restos placentários e feto abortado, sendo agravado pelo hábito de cheirar e lambe os recém-nascidos e fetos. Também se dá através de outras secreções como o leite, descargas vaginais e o sêmen (Bathke, 1999; Silva et al., 2005).

O quadro clínico não é específico nos animais ou no homem e o diagnóstico deve ser auxiliado por testes laboratoriais. Existe tratamento disponível para a brucelose humana, mas deve-se priorizar a prevenção através do controle da doença nos animais e da implementação de medidas de saúde pública (Brucellosis, 2006)

A brucelose bovina é considerada uma enfermidade transmissível, importante do ponto de vista sanitário e socioeconômico em nível nacional e que tem repercussão no comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2008). A doença está distribuída mundialmente, e tem maior prevalência nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, causando prejuízos econômicos.

2.2 Brucelose bovina no Brasil

A brucelose bovina parece estar disseminada em todo território brasileiro, com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Um estudo que envolveu 15 estados brasileiros foi publicado em 2009 (Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2009), e demonstrou que a prevalência de brucelose entre os estados variou de 0,32% em Santa Catarina (Sikusawa et al., 2009) a 41,5% no Mato Grosso do Sul (Chate et al., 2009).

Segundo Marvulo et al (2009), no estado do Rio Grande do Sul, a brucelose bovina tem prevalência de focos de 2,1% e de animais infectados de 1,0%, podendo ser dividido em dois grandes grupos de regiões, um de alta prevalência (regiões litoral norte, missões central, fronteira oeste e sul) e outro de baixa prevalência (regiões norte, serra e metropolitana).

No Brasil o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de diminuir o impacto negativo

dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (Brasil, 2006).

No Rio Grande do Sul o Programa Estadual de Controle e Erradicação da Tuberculose e da Brucelose Bovídea (PROCETUBE) foi instituído em 2011, pela então Secretaria de Agricultura, Pecuária e Agronegócio (SEAPA), hoje Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI).

O PROCETUBE tem como objetivos reduzir a prevalência e a incidência da brucelose e da tuberculose no estado, complementando as ações do PNCEBT, reduzir os riscos à saúde pública, certificar propriedades como livres ou monitoradas para estas doenças, proporcionar condições sanitárias de agregação de valor aos produtos de origem animal, apoiar o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva da bovinocultura, e difundir informações do produtor ao consumidor, pertinentes a prevenção destas doenças.

2.3 Importância econômica

Nos bovinos a brucelose gera grandes perdas diretas, devido aos baixos índices reprodutivos, diminuição da produção de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. Também torna o comércio de animais e subprodutos vulnerável às barreiras sanitárias, comprometendo a competitividade da pecuária bovina no comércio internacional (Brasil, 2006). Além das perdas diretas há perdas indiretas como as geradas pela infecção humana, pelos altos custos de diagnóstico e tratamento, e pelo tempo de internação que pode ser prolongado (Santos et al., 2005)

Lucas, em 2006 simulou, a partir de um registro de banco de dados econômicos dos anos de 2001 e 2002, o impacto econômico da brucelose bovina em rebanhos produtores de leite das regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Neste trabalho os prejuízos totais atribuídos ao impacto causado pela brucelose bovina nas propriedades amostradas chegaram a 14% nas regiões centro oeste e sudeste, com prevalência estimada em 3%, e a 5% na região Sul, com prevalência estimada em 0,06%. Estas porcentagens representavam na época, R\$18532,80 ou 39131,60

litros de leite perdidos por ano nas regiões centro oeste e sudeste, e R\$4279,94 ou 10204,83 litros de leite perdidos por ano na região Sul (Lucas, 2006).

2.4 Controle e erradicação da brucelose bovina

As consequências econômicas para produção pecuária, além dos reflexos na área de saúde pública, têm motivado a adoção de medidas de erradicação ou diminuição da ocorrência de brucelose em diversos países (Mathias e MacMillan, 1995). O controle da brucelose previsto pelo PNCEBT envolve basicamente quatro partes importantes: higiene, vacinação em massa das bezerras entre 3 e 8 meses, diagnóstico e sacrifício dos animais positivos (Brasil, 2004).

Uma das medidas de controle da brucelose é a vacinação obrigatória de bezerras com idade entre 3 e 8 meses com a vacina B19. A vacina B19 é uma amostra de *B. abortus* lisa, atenuada, que induz a formação de anticorpos específicos contra o lipopolissacarídeo liso e pode interferir no diagnóstico sorológico da brucelose. Quando a vacinação ocorre até os 8 meses de idade estes anticorpos desaparecem rapidamente, sendo estes animais negativos aos 24 meses (Brasil, 2006).

Além da vacinação outras medidas devem ser adotadas nos programas de erradicação da brucelose, como a presença de um procedimento diagnóstico seguro disponibilizado de forma generalizada, e a eliminação dos animais infectados (Blood e Radostits, 1991). Medidas complementares como o controle da movimentação dos animais, e conhecimento da situação também são imprescindíveis para o funcionamento do programa (Dias, 2004; Brasil, 2006).

2.5 Certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose

O PNCEBT prevê a certificação de propriedades livres ou monitoradas de brucelose e tuberculose. Os procedimentos de certificação destas propriedades foram ajustados à realidade dos sistemas de produção brasileiros e às necessidades do PNCEBT. Estes procedimentos obedecem aos princípios técnicos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). As propriedades aderem ao processo de certificação de maneira voluntária (Brasil, 2006).

O saneamento das propriedades é realizado testando todos os animais elegíveis para o diagnóstico e sacrificando os reagentes positivos. Os testes no rebanho são repetidos até a obtenção de três testes consecutivos sem um único animal reagente positivo, ao longo de um período mínimo de nove meses. Uma vez terminado o processo de saneamento, a propriedade obtém o certificado de livre dessas doenças, quando propriedade produtora de leite, ou certificado de monitorada, quando produtora de carne. A manutenção da certificação depende do cumprimento de todas as regras e normas sanitárias estabelecidas pelo PNCEBT. As propriedades certificadas ficam obrigadas a repetir os testes anualmente (Brasil, 2006).

O PROCETUBE prevê ainda que todos os municípios do estado do Rio Grande do Sul que aderirem voluntariamente ao programa serão considerados “área sob controle para brucelose e tuberculose”. Todas as propriedades existentes nos municípios em área sob controle deverão participar das medidas de saneamento previstas no PROCETUBE. Estas propriedades poderão ser certificadas como livres ou monitoradas de acordo com o PNCEBT, porém não são obrigadas a aderirem à certificação. As propriedades que não quiserem ser certificadas pelo PNCEBT serão controladas por testes anuais no rebanho (Rio Grande do Sul, 2013).

2.6 Diagnóstico da brucelose bovina

A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos isoladamente ou em conjunto. Entre eles destacam-se o isolamento e identificação do agente etiológico e a demonstração de anticorpos nos fluídos orgânicos (Poester *et al.*, 2005; OIE, 2008).

A identificação da *B. abortus* é um processo lento, caro e de alto risco para o laboratorista, pois envolve a manipulação de material biológico contaminado (Alton *et al.*, 1988; Corbel *et al.*, 2006), que exige a observação de normas estritas de biossegurança. Apesar disto, a identificação e a caracterização das espécies e biovariedades de *Brucella* sp. presentes num rebanho ou região, são importantes do ponto de vista epidemiológico da doença (OIE, 2008).

A importância do diagnóstico para o êxito das campanhas de combate à brucelose tem incentivado o desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas sorológicas (Mathias e MacMillan, 1995; Nielsen, 2002). A detecção de anticorpos no soro ou leite é o meio mais rápido, barato e menos laborioso de diagnóstico e é um indicativo confiável de resposta à exposição a *B. abortus* (Nielsen, 2002, Poester *et al.*, 2005).

O diagnóstico indireto, por meio de testes sorológicos, busca detectar a resposta imune produzida pela infecção no animal. Estes testes apresentam diferentes sensibilidades e especificidades, que dependem de muitas variáveis como a dose infectante, a presença de reações cruzadas, a cinética da indução da resposta imune, a vacinação previa dos animais, entre outras (Godfroid; Nielsen; Saegerman, 2010).

O desenvolvimento do primeiro teste de aglutinação para a detecção de anticorpos contra a infecção por *Brucella* foi descrito há mais de 100 anos. Desde então, muito esforço tem sido feito para aprimorar os métodos diagnósticos e a acurácia, culminando na produção de ensaios de ligação primária (ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA, Polarização Fluorescente) e procedimentos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Mathias e MacMillan, 1995; Nielsen e Gall, 2004).

Ensaio de ligação primária medem diretamente a interação entre antígeno e anticorpo, enquanto testes sorológicos convencionais, como do Antígeno Acidificado Tamponado e Fixação de Complemento, medem fenômenos secundários como aglutinação e ativação do complemento (Nielsen e Gall, 2004).

Dependendo da sensibilidade e especificidade, os testes diagnósticos podem ser usados para triagem ou para confirmar a doença. Tradicionalmente, testes de triagem apresentam custo relativamente mais baixo, são rápidos e de alta sensibilidade, mas não apresentam necessariamente alta especificidade, enquanto testes confirmatórios devem mostrar alta especificidade (Nielsen e Gall, 2004).

O diagnóstico sorológico da brucelose no Brasil é baseado no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (ATT) como teste de triagem, sendo os resultados positivos confirmados pelo teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME), realizado em paralelo com a

soroaglutinação lenta em tubos (SAL), ou pelo teste de fixação de complemento (FC) (Brasil, 2006).

Os testes do AAT e do 2-ME/SAL tem como característica identificar os anticorpos produzidos frente ao antígeno virulento presente na parede celular da *Brucella*, o lipopolissacarídeo com a cadeia "O" (LPS-O). Os lipopolissacarídeos fazem parte da composição da parede celular das bactérias do gênero *Brucella*, tanto as lisas quanto as rugosas. As espécies *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus*, são diagnosticadas por antígenos de *Brucella* lisa, geralmente produzidos a partir de amostras de *B. abortus* (Nielsen, 2002; Lage, 2008).

A partir da exposição ao agente uma forte resposta imune humoral é induzida. A resposta aos antígenos da *Brucella abortus* (LPS-O) nos bovinos consiste na produção de anticorpos, em uma resposta precoce por Imunoglobulinas M (IgM), que decorridas duas a três semanas decaem e desaparecem em poucos meses, seguida pela produção de Imunoglobulinas G1 (IgG1), mais tarde e em menores níveis Imunoglobulinas G2 (IgG2) e Imunoglobulinas A (IgA). A resposta às IgG é detectada após três a quatro semanas da exposição ao agente, e permanecem por longos períodos, até mesmo anos após a infecção (Nielsen, 2002; Godfroid; Nielsen; Saegerman, 2010).

O principal anticorpo utilizado no diagnóstico sorológico é a IgG1. A IgM é o anticorpo menos específico e com maior capacidade aglutinante em pH neutro ou ligeiramente baixo. Esta reatividade induz a reações falso-positivas por respostas cruzadas com outras aglutininas. Sendo assim os testes de diagnóstico que detectam IgM não são desejáveis (Nielsen, 2002).

2.6.1 Antígeno Acidificado Tamponado

O teste do AAT é uma prova qualitativa, rápida e prática. Utiliza como antígeno células de *B. abortus* coradas com o corante Rosa Bengala em um meio acidificado (pH 3,65±0,05). Baseia-se no princípio de que a capacidade de IgM se ligarem a antígenos é marcadamente reduzida em baixo pH, reduzindo as reações inespecíficas. Podem ocorrer resultados falso-negativos devido ao efeito de prozona (Nielsen, 2002; Brucellosis,2006).

É um excelente teste de triagem, mas pode ser excessivamente sensível para o diagnóstico individual de animais, particularmente aqueles vacinados (Brucellosis, 2006). De acordo com Nielsen (2002), para evitar que reações cruzadas ou que a detecção de anticorpos vacinais condene um animal, se faz necessário utilizar testes confirmatórios para classificar um animal como infectado.

2.6.2 Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol

O teste do 2-ME é uma prova semiquantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova da soroaglutinação lenta em tubos (SAL) (Brasil, 2006).

Baseia-se no fato de os anticorpos de classe IgM, que tem configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radical tiol. Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. O tratamento por 2-ME aumenta a especificidade do teste por degradar as pontes dissulfídicas das moléculas de IgM, no entanto pode causar reações falso-negativas ao reduzir as pontes dissulfídicas das moléculas de IgG (Brasil, 2006; Godfroid; Nielsen; Saegerman, 2010).

A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta - SAL) frente ao soro tratado com 2-ME. Os resultados positivos na SAL e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são aglutininas relacionadas à infecção, considerando estes animais como infectados (Brasil, 2006).

O teste do 2-ME utiliza reagentes tóxicos para o laboratorista, que deve tomar todas as medidas de precaução, como uso de máscaras e capela de exaustão na preparação destes. Além disso, o teste tem outras desvantagens como o longo tempo para a obtenção dos resultados, o uso de grandes quantidades de

reagentes, e a necessidade de que as amostras estejam em condições ótimas de conservação (Brasil, 2006; Faria, 2010).

2.6.3 Polarização Fluorescente

O Teste da Polarização Fluorescente (TPF) baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel (marcado com fluorocromo) e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. Moléculas menores giram aleatoriamente, a uma velocidade maior, resultando em maior despolarização da luz, ao passo que complexos maiores giram mais lentamente, e a despolarização da luz ocorre de forma reduzida. Essa mudança da polarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente. Os resultados são expressos em unidades de luz polarizada ou em milipolarização (mP), sendo que o valor em mP será maior quanto maior for a quantidade de anticorpos no soro analisado (Nielsen et al., 2001).

Este teste tem boa sensibilidade e alta especificidade. Para a realização deste teste, necessita-se de um equipamento de luz polarizada e de reagentes compatíveis. A grande vantagem desta prova é que ela pode ser realizada a campo, e o resultado pode ser obtido em dois minutos (Nielsen, 2002; Poester *et al.*, 2005; OIE, 2008).

No Brasil este equipamento, assim como o kit que contem o antígeno ligado ao fluorocromo e os controles positivos e negativos, só pode ser importado da marca Diachemix, dos Estados Unidos, por uma única empresa que detém o direito de importação. Outros kits de reagentes foram desenvolvidos, como por exemplo na Argentina, o que pode vir a diminuir os custos caso a importação seja liberada.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O Teste de Polarização Fluorescente (TPF) foi validado no Brasil, e apresentou sensibilidade de até 97,3% e especificidade de até 98,3% (Mathias, et al., 2010). Quando a prevalência da doença diminui (abaixo de 10%) cresce a necessidade de diminuir a proporção de reações falso-positivas, através do aumento da especificidade dos métodos diagnósticos (Brasil, 2006). Como a prevalência de

brucelose bovina no Rio Grande do Sul se encontra em 2,1% (Marvulo, et al., 2009), a utilização do TPF é justificada.

Nielsen e Gall (2004) consideraram o TPF o teste de menor custo por amostra, quando comparado com outros testes de diagnóstico da brucelose bovina. Este fator poderia vir a justificar uma maior adesão dos produtores aos programas de controle e erradicação da brucelose bovina.

As pesquisas realizadas no Brasil até então, utilizando o TPF, tiveram como objetivo o estudo do comportamento deste teste para medir a resposta vacinal com a utilização da vacina B19 (Faria, 2010). Faz-se necessário o estudo do comportamento deste teste para fins de certificação de propriedades livres de brucelose, certificando o desempenho do TPF, e verificando os valores preditivos positivos e negativos, para que se possa diminuir o número de animais falso-positivos condenados ao abate. Para tanto é necessário que se conheça o comportamento do TPF em amostras de animais infectados naturalmente, com cepas de campo e em propriedades que já foram certificadas livres pelo PNCEBT.

A hipótese deste trabalho é de que o Teste de Polarização Fluorescente tem desempenho superior aos demais testes sorológicos para o diagnóstico da brucelose bovina.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Contribuir com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), e com o Programa Estadual de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovídea (Procetube) através da avaliação da utilização do Teste de Polarização Fluorescente no Rio Grande do Sul.

4.2 Específicos

Avaliar o Teste de Polarização Fluorescente, em diferentes situações no Rio Grande do Sul, comparando com os testes de diagnóstico do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME).

Avaliar o desempenho do teste através dos valores preditivos positivos e negativos para evidenciar a proporção de animais falsos-positivos e falsos-negativos e seu desempenho, comparando-se com os testes do AAT e 2-ME.

5. METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) e no Laboratório de Microbiologia Veterinária (MICROVET) da Universidade Federal de Santa Maria.

5.1 Amostras

Foram utilizados soros sanguíneos de bovinos dos bancos de dados do Laboratório de Microbiologia (MICROVET) e do Laboratório de Bacteriologia (LaBac) da Universidade Federal de Santa Maria. Estas amostras foram mantidas a -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

Foram selecionados soros provenientes de três propriedades leiteiras, de distintos municípios no estado do Rio Grande do Sul, que na época da coleta dos soros tinham a certificação de livres de brucelose e tuberculose pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT); E soros provenientes de duas propriedades de corte, também de diferentes municípios no estado do Rio Grande do Sul, que tinham a certificação de propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose pelo PNCEBT.

Além das propriedades certificadas, foram utilizados soros de animais positivos para brucelose nos testes preconizados pelo PNCEBT, provenientes de quatro

propriedades não certificadas, de diferentes municípios no estado do Rio Grande do Sul. Estes animais positivos foram submetidos a abate sanitário.

Todas as amostras já haviam passado por um teste prévio para diagnóstico da brucelose bovina. As amostras provenientes de propriedades certificadas pelo PNCEBT obrigatoriamente seriam negativas no teste de triagem utilizado pelo programa (AAT), ou então a propriedade não teria a certificação de livre ou monitorada. As amostras provenientes de propriedades não certificadas, nem sempre representavam toda a propriedade, mas sim aqueles animais que foram testados por algum motivo (compra e venda, saneamento do rebanho, entre outros).

5.2 Testes sorológicos

As amostras foram submetidas aos testes sorológicos no Laboratório de Microbiologia Veterinária (MICROVET) da Universidade Federal de Santa Maria. Foram utilizados os protocolos de realização de testes do mesmo laboratório, e a execução e leitura dos testes foram realizadas pelo mesmo analista.

Todas as amostras foram submetidas ao teste do Antígeno Acidificado Tamponado e da Polarização Fluorescente. Em virtude do custo de execução e da quantia de resíduos gerados pelo teste do 2-Mercaptoetanol, foram submetidos a este teste todas as amostras positivas e inconclusivas no TPF e/ou AAT, e 20% das amostras negativas nos dois testes.

5.2.1 Teste de Polarização Fluorescente

O Teste de Polarização Fluorescente (TPF) para diagnóstico da brucelose utiliza o Polissacarídeo-O extraído de células de *Brucella abortus* e conjugado com fluoresceína. O equipamento de leitura de polarização Sentry 100® (Diachemix, USA) foi utilizado para mensurar o estado de polarização do OPS conjugado. Quando não há anticorpos contra *B. abortus* a polarização é baixa. Quando há anticorpos, estes se ligam ao conjugado e a polarização aumenta.

Foi utilizado o “*Brucella abortus* Antibody Test Kit” produzido por Diachemix, USA. O kit é composto por um controle negativo, um controle positivo, um tampão de

reação concentrado 25x e um antígeno conjugado. Foram utilizados tubos de borosilicato (10 x 75mm) em perfeito estado para que não interferissem na leitura dos testes.

Para a interpretação dos resultados foi utilizada a metodologia descrita na bula do kit. Foram consideradas positivas as amostras com leituras superiores a 20mP da média de três leituras do controle negativo. As amostras negativas foram aquelas que a leitura foi menor do que 10mP acima da média dos controles negativos. As amostras que apresentaram resultados entre 10 mP e 20mP acima da média dos controles negativos foram consideradas inconclusivas.

Cada vez que o equipamento Sentry 100® foi ligado, foi realizada a leitura e foi calculada a média dos controles negativos para as análises realizadas naquele dia. Posteriormente foi calculada a média dos controles negativos para cada situação (geral, propriedades certificadas e propriedades não certificadas).

5.2.2 Antígeno Acidificado Tamponado

O teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) é considerado prova de triagem pelo PNCEBT (Brasil, 2006). Foi utilizada a técnica recomendada por Alton et al. (1988), empregando-se o antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3. Foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram aglutinação parcial ou completa após quatro minutos.

5.2.3 Soroaglutinação Lenta em Tubos e 2-Mercaptoetanol

Conforme prevê o PNCEBT, os testes de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) são utilizados em associação para confirmar resultados positivos em provas de rotina (Brasil, 2006). Foi utilizada a técnica recomendada por Alton et al. (1988) empregando-se antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3.

A interpretação do teste foi feita a partir da observação da turbidez da suspensão nos tubos e da presença de aglutinação quando os tubos são agitados suavemente. O grau de aglutinação em cada diluição foi classificado como completo (suspensão da mistura de soro e antígeno aparece límpida e a agitação dos tubos revela

aglutinação), incompleto (suspensão aparece turva e com aglutinação ao agitar os tubos) ou negativo (suspensão turva e que a agitação não revela aglutinação).

A interpretação dos resultados seguiu o recomendado pelo Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2006) utilizando-se o quadro para bezerras vacinadas com B19 (Quadro 1). Dessa forma, animais com título 25 incompleto no 2-ME, e título 100 incompleto ou superior na SAL, são considerados inconclusivos. Animais com título 25 ou superior no 2-ME são considerados positivos.

Quadro 1: Interpretação da prova do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses vacinadas entre os 3 e 8 meses

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	-								
25 I	-	-							
25	-	-	+						
50 I	-	-	+	+					
50	-	-	+	+	+				
100 I	-	-	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo
 - : negativo
 Inc : reação inconclusiva
 □ : combinação que não pode ocorrer

2-ME : 2-Mercaptoetanol
 SAL : soroaglutinação lenta
 NR : não reagente
 I : reação incompleta

*Retirado de Brasil, 2006

5.2.4 Análise dos dados

O desempenho do TPF foi avaliado pelas características intrínsecas dos testes, através da sensibilidade, especificidade, e valores preditivos positivos e negativos (Tabela 1). Também foi avaliada a concordância através da medida de aceitação entre os testes pela estatística Kappa de Cohen (Tabela 2) em ambas as situações

de propriedades já certificadas livres ou monitoradas, e propriedades não certificadas.

Tabela 1: Tabela de contingência para avaliar o desempenho do teste.

Teste sob avaliação	Teste de referência		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	

Sensibilidade= $a/a+c$; Especificidade= $d/b+d$;

VPP= $a/a+b$; VPN= $d/c+d$

a= verdadeiro positivo

b= falso positivo

c= falso negativo

d= verdadeiro negativo

Tabela 2: Escala de concordância pelo índice *Kappa*.

Kappa	Concordância
<0,00	Nenhuma
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Um teste binomial exato para proporções correlacionadas foi utilizado para comparação das proporções de acertos entre as situações utilizando-se do teste de McNemar.

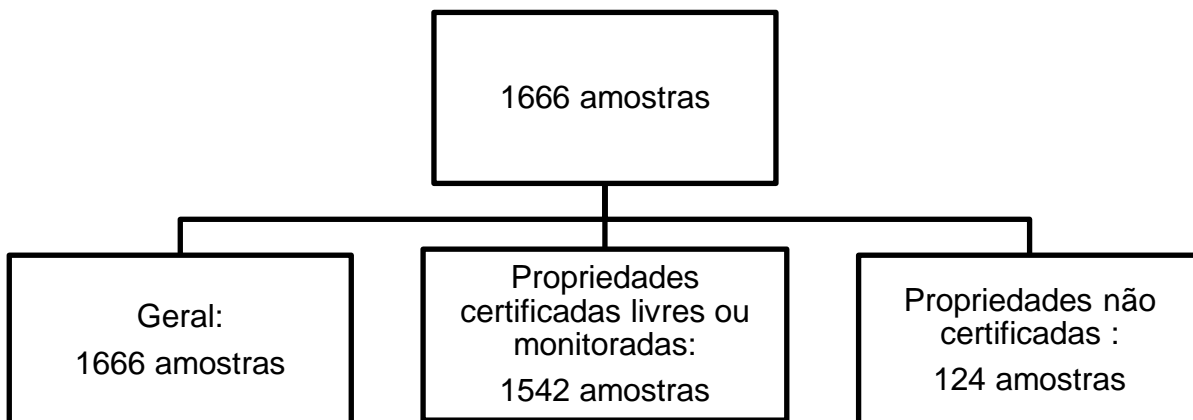
As amostras inconclusivas no TPF foram consideradas como negativas para a análise estatística.

6. RESULTADOS

Foram utilizadas 1666 amostras de soro bovino, que foram analisadas em três diferentes situações (Quadro 2): geral, com todas as amostras juntas; amostras

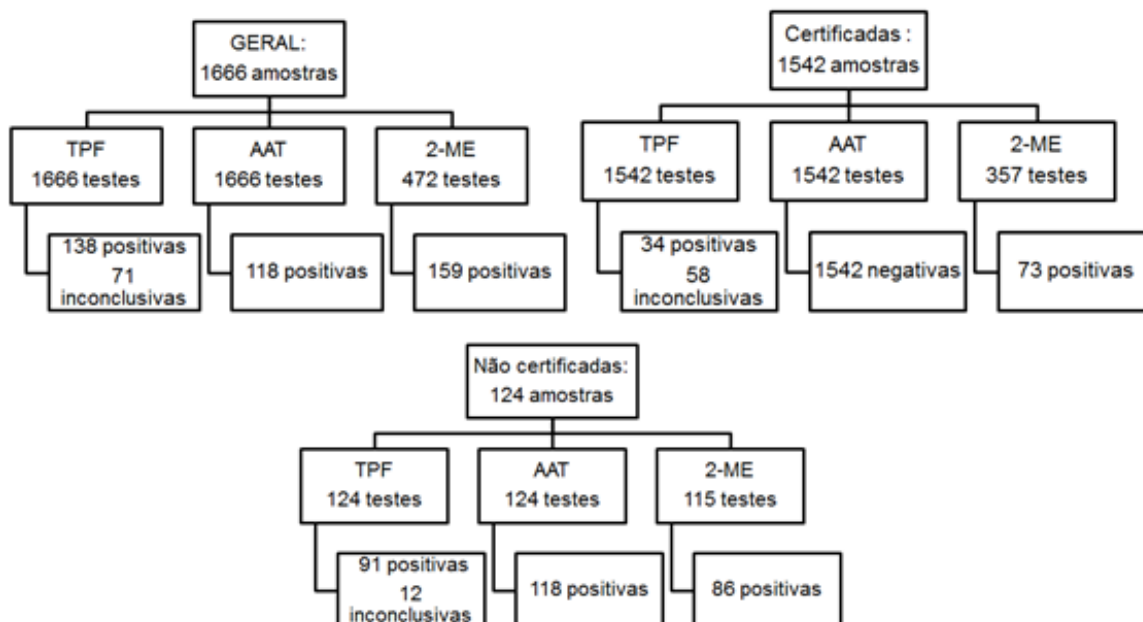
provenientes de propriedades certificadas; e amostras provenientes de propriedades não certificadas.

Quadro 2: Organograma com as amostras divididas nas diferentes situações (geral, propriedades certificadas, e propriedades não certificadas).



Todas as 1666 amostras foram submetidas ao TPF e ao AAT. O teste do 2-Mercaptoetanol/Soroaglutinação lenta não foi realizado em todas as amostras pelo custo elevado, além de ser demorado e gerar resíduos. O 2-ME/SAL foi realizado em 472 amostras, sendo estas, todas as positivas em algum dos dois testes (TPF e AAT), todas as amostras inconclusivas no TPF, e 20% das amostras negativas nos dois testes selecionadas ao acaso. Os resultados dos testes testão dispostos no quadro 3.

Quadro 3: Resultados dos testes sorológicos (Teste de Polarização Fluorescente, Antígeno Acidificado Tamponado, e 2-Mercaptoetanol) nas diferentes situações.



A partir dos resultados de cada teste, analisamos comparativamente o resultado do TPF em relação ao procedimento preconizado pelo PNCEBT: triagem utilizando o AAT e posterior confirmação dos positivos pelo 2-ME/SAL (AAT+2-ME/SAL). Esta análise está disposta no tabela 3. Dentre as 1457 amostras negativas no TPF, apenas 5 foram positivas no AAT, e nenhuma delas foi confirmada pelo teste do 2-ME/SAL.

Tabela 3: Análise dos resultados dos testes, comparando o TPF aos testes do AAT confirmado pelo 2-ME/SAL.

Situação	TPF	AAT	2-ME/SAL	AAT+ 2-ME/SAL
Geral	138 positivas	103 positivas	86 positivas	86 positivas
	71 inconclusivas	9 positivas	0 positivas	0 positivas
Certificada	34 positivas	0 positivas	25 positivas	0 positivas
	58 inconclusivas	0 positivas	25 positivas	0 positivas
Não certificada	91 positivas	91 positivas	85 positivas	85 positivas
	12 inconclusivas	12 positivas	1 positiva	1 positiva

*TPF: Teste de Polarização Fluorescente; AAT: Antígeno Acidificado Tamponado; 2-ME/SAL: 2-Mercaptoetanol/Soroaglutinação lenta

A comparação estatística entre os testes foi realizada comparando os testes entre si (TPF, AAT e 2-ME/SAL), nas diferentes situações (todas as amostras, amostras de propriedades certificadas, amostras de propriedades não certificadas). Somente

as amostras em que foram realizados os três testes puderam ser utilizadas para a análise estatística.

Ao comparar o TPF e o AAT, nas três situações, houve diferença estatística na proporção de acertos pelo teste de McNemar. Foi calculado a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do TPF a partir da comparação com o AAT (Tabela 4). Somente na análise de todas as amostras em conjunto observou-se uma concordância boa, pois o valor de kappa foi de 0,79.

Tabela 4: Comparação das técnicas sorológicas: Antígeno Acidificado Tamponado e Teste de Polarização Fluorescente, utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina nas diferentes situações (geral, propriedades certificadas e propriedades não certificadas)

Tabela 4.A: Geral

TPF	AAT		TOTAL	
	Positivo	Negativo		
Positivo	102	34	136	S= 75,00%
Negativo	2	285	287	SP=99,30%
TOTAL	104	319	423	VPP= 98,08%
				VPN= 89,34%

*TPF: teste de polarização fluorescente; AAT: antígeno acidificado tamponado; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0000 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,7921 (concordância boa)

Tabela 4.B: Propriedades certificadas

TPF	AAT		TOTAL	
	Positivo	Negativo		
Positivo	0	33	33	S=100,00%
Negativo	0	279	279	SP= 0,00%
TOTAL	0	312	312	VPP=10,58%
				VPN= 0,00%

*TPF: teste de polarização fluorescente; AAT: antígeno acidificado tamponado; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0000 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,0000 (concordância ao acaso)

Tabela 4.C: Propriedades não certificadas

TPF	AAT		TOTAL	
	Positivo	Negativo		
Positivo	90	0	90	S=100,00%
Negativo	11	2	13	SP=15,38%
TOTAL	101	3	103	VPP=89,11%
				VPN=100,00%

*TPF: teste de polarização fluorescente; AAT: antígeno acidificado tamponado; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0009 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,2411 (concordância razoável)

Ao comparar o TPF e o 2-ME, somente nas amostras oriundas de propriedades não certificadas houve diferença estatística na proporção de acertos pelo teste de McNemar. Foi calculado a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do TPF a partir da comparação com o 2-ME (Tabela 5). Em todas as situações houve concordância considerável entre o resultado dos dois testes pelo índice kappa; o valor de kappa na análise geral foi de 0,71; nas propriedades certificadas foi de 0,56; e nas propriedades não certificadas, o valor de kappa foi de 0,81.

Tabela 5: Comparação das técnicas sorológicas (TPF e 2-ME) utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina nas diferentes situações (geral, propriedades certificadas pelo PNCEBT, e propriedades não certificadas)

Tabela 5 A: Geral

TPF	2-ME/SAL		TOTAL	
	Positivo	Negativo		
Positivo	111	25	136	S=81,62%
Negativo	28	259	287	SP=90,24%
TOTAL	139	284	423	VPP=79,86%
				VPN=91,20%

*TPF: teste de polarização fluorescente; 2-ME: 2-mercaptoetanol; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.6803 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,7145 (concordância boa)

Tabela 5 B: Propriedades certificadas

TPF	2-ME/SAL		TOTAL	
	Positivo	Negativo		
Positivo	25	8	33	S=75,75%
Negativo	23	256	279	SP=91,76%
TOTAL	48	264	312	VPP=52,08%
				VPN=96,97%

*TPF: teste de polarização fluorescente; 2-ME: 2-mercaptoetanol; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0071 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,5624 (concordância moderada)

Tabela 5 C: Propriedades não certificadas

TPF	2-ME/SAL		TOTAL	
	Positivo	Negativo		
				S=94,44%

Positivo	85	5	90	SP=100,00%
Negativo	0	13	13	VPP=100,00%
TOTAL	85	18	103	VPN=72,22%

*TPF: teste de polarização fluorescente; 2-ME: 2-mercaptoetanol; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0253 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,8110 (concordância ótima)

Ao comparar o AAT e o 2-ME, nas três situações, houve diferença estatística na proporção de acertos pelo teste de McNemar. Foi calculado a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do AAT a partir da comparação com o 2-ME (Tabela 6). Somente quando todas as amostras foram analisadas em conjunto é que houve concordância considerável entre o resultado dos dois testes no teste kappa (0,5935).

Tabela 6: Comparação das técnicas sorológicas (AAT e 2-ME) utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina nas diferentes situações (geral, propriedades certificadas pelo PNCEBT, e propriedades não certificadas)

Tabela 6 A: Geral

AAT	2-ME/SAL		TOTAL	S=82,69%
	Positivo	Negativo		
Positivo	86	18	104	SP=83,39%
Negativo	53	266	319	VPP=61,87%
TOTAL	139	284	423	VPN=93,66%

*AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: 2-mercaptoetanol; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0000 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,5935 (concordância moderada)

Tabela 6 B: Propriedades certificadas

AAT	2-ME/SAL		TOTAL	S=15,38%
	Positivo	Negativo		
Positivo	0	0	0	SP= -
Negativo	48	264	312	VPP=100,00%
TOTAL	48	264	312	VPN=0,00%

*AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: 2-mercaptoetanol; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0000 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,0000 (concordância ao acaso)

Tabela 6 C: Propriedades não certificadas

AAT	2-ME/SAL		TOTAL	S=84,16%
	Positivo	Negativo		

Positivo	85	16	101	SP=100,00%
Negativo	0	2	2	VPP=100,00%
TOTAL	85	18	103	VPN=11,11%

*AAT: antígeno acidificado tamponado; 2-ME: 2-mercaptoetanol; S: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

*Prob>chi2= 0.0001 (teste de McNemar)

*Kappa: 0,1710 (concordância fraca)

7. DISCUSSÃO

Os testes sorológicos constituem a base do diagnóstico nos programas de controle e erradicação da brucelose animal. No entanto, os testes sorológicos estão sujeitos a erros, pela ocorrência de resultados falso-negativos e falso-positivos (Meirelles-Bartoli e Mathias, 2010). O PNCEBT adotou a utilização de testes sorológicos em série para o diagnóstico da brucelose em bovinos e bubalinos, o que melhora a especificidade do diagnóstico e minimiza a ocorrência de resultados falso-positivos. O AAT é o teste de triagem utilizado pelo PNCEBT, e o 2-ME/SAL é o teste mais utilizado como teste confirmatório (Brasil, 2004;2006).

A busca pelo êxito das campanhas de combate à brucelose tem incentivado o desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas sorológicas, que busquem um diagnóstico mais rápido e preciso (Mathias e MacMillan, 1995; Nielsen, 2002). O TPF é um ensaio de ligação primária, que mede diretamente a interação entre antígeno e anticorpo, diminuindo as interferências presentes em testes de ligações secundárias como o AAT e o 2-ME (Nielsen e Gall, 2004). O TPF já era citado como um novo método de diagnóstico pelo Manual do PNCEBT, em 2006, porém seu uso só foi regulamentado em 2010 (Brasil, 2010).

O presente trabalho buscou avaliar o desempenho do TPF a partir da comparação com os testes do AAT e do 2-ME/SAL. A análise geral das amostras (certificadas + não certificadas) demonstrou que 8,28% das amostras foram positivas no TPF, porém somente 5,16% das amostras foram positivas nos testes utilizados hoje como padrão para o diagnóstico da brucelose bovina no Brasil (AAT + 2-ME/SAL). Esses resultados indicam que os testes utilizados (AAT + 2-ME/SAL) podem estar deixando 3,12% das amostras positivas como falso-negativos, o que poderia ser

justificado por serem testes de ligação secundária e que sofrem maiores interferências do que o TPF.

Levando em conta a análise de todas as amostras em conjunto, como se fosse um inquérito para diagnóstico, tivemos, no geral, os resultados mais satisfatórios em relação ao TPF. Nesta situação, quando comparamos o TPF com o teste do AAT, a concordância entre os testes foi boa, com índice kappa de 0,7921. A concordância também foi boa quando comparamos os testes do TPF e do 2-ME, com kappa=0,7145, o que seria esperado levando em conta que os dois testes servem como testes confirmatórios. Essas concordâncias foram superiores do que a encontrada na comparação entre o AAT e o 2-ME/SAL na mesma situação (kappa=0,5935). A concordância entre o AAT e 2-ME/SAL em outros trabalhos foi mais elevada, como por Megid et. al (2000) kappa=0,84, Kuroda et al (2004) kappa=0,94, e Meirelles-Bartoli e Mathias (2010) Kappa=0,80.

O TPF é um teste que, pela legislação brasileira, pode ser utilizado como um teste único ou como um teste confirmatório em amostras positivas no AAT ou inconclusivas no 2-ME (Brasil, 2010). Na situação de um inquérito epidemiológico, ou de propriedades onde não se conhece a incidência da brucelose no rebanho, dados os resultados de boa concordância com o AAT e o 2-ME/SAL deste trabalho, pode-se afirmar que o TPF terá um bom desempenho no diagnóstico desta doença.

Quando analisamos as amostras oriundas das propriedades certificadas temos que levar em conta o fato de todas estas amostras serem negativas no teste de triagem (AAT). As amostras que foram positivas ou inconclusivas nos testes confirmatórios (TPF e 2-ME/SAL) a pesar do teste de triagem ser negativo mostram a possibilidade de resultados falso-negativos no teste utilizado pelo PNCEBT.

Esta fragilidade do AAT como teste de triagem já foi apontada por outros autores, quando comparado a testes confirmatórios como o 2-ME/SAL, FC, e ELISA (Bercovich, 1998; Guarino et al, 2001, Meirelles-Bartoli e Mathias, 2010). Esta situação não é desejada, já que um teste de triagem deve primar pela alta sensibilidade, e resultados falso-negativos podem comprometer a erradicação da doença.

A análise das características intrínsecas dos testes, assim como da concordância entre os testes na situação de amostras certificadas, foi prejudicada pelos resultados negativos no teste de triagem. A comparação entre TPF e 2-ME nestas amostras teve concordância moderada ($Kappa= 0,5624$), e o TPF em relação ao 2-ME teve alta especificidade com alto valor preditivo negativo, o que aumenta as chances das amostras negativas serem realmente correspondentes a animais sadios.

Levando em consideração os resultados dos testes, dispostos na tabela 3, e correlaciona-los com as características dos testes, teremos poucos falso-negativos e falso-positivos utilizando o TPF, por seus valores preditivos positivo e negativo, na comparação com o AAT e o 2-ME. A utilização do TPF como teste único para a manutenção da certificação de livre ou monitorada pelos programas de sanidade poderá diminuir os falso-negativos deixados pelo AAT.

As amostras não certificadas, ao contrario das certificadas, eram na sua maioria de animais que foram positivos nos testes anteriores. Na análise destas amostras a concordância entre o teste de triagem e os confirmatórios foi de fraca a razoável, o que significaria a necessidade de buscar outros testes de diagnóstico combinados para o diagnóstico de brucelose nestes animais. Porém ao analisar os resultados, comparando o TPF como um teste único e a combinação dos testes de AAT e 2-ME/SAL como disposto na tabela 3, teremos resultados satisfatórios do uso do TPF como do AAT+2-ME/SAL para esta situação.

A concordância entre o TPF e o 2-ME neste grupo de amostras foi ótima ($kappa=0,8110$), o que nos mostra que o TPF pode ser utilizado como teste confirmatório em amostras triadas por outros testes nesta situação.

Das 71 amostras inconclusivas no TPF, quando analisadas conforme prevê o PNCEBT, com o AAT como triagem e o 2-ME/SAL como confirmatório, nenhuma seria considerada positiva. Porém quando feito o teste do 2-ME, independentemente do resultado do AAT, 28,1% destas amostras seriam confirmadas positivas pelo 2-ME. Isto sugere que o TPF teria uma maior probabilidade de eliminar os falso-negativos do rebanho.

É de extrema importância que os estudos a respeito da polarização fluorescente continuem sendo realizados, para que se garanta que o mesmo possa ser utilizado como teste único como está previsto na legislação brasileira. Infelizmente não pudemos neste trabalho realizar a confirmação dos resultados inconclusivos do TPF com a realização de testes em série ou em paralelo do próprio TPF. Isto se deu por vários fatores: as amostras eram de bancos de soros, com quantidades limitadas de soro; o orçamento do trabalho não nos permitia a compra de mais kits para a realização de mais testes; e os animais já não existiam, para possibilitar novas coletas de material.

Os resultados obtidos sugerem que o TPF seria um recurso de diagnóstico útil em diferentes situações, uma vez que é um teste menos sujeito a influência de anticorpos vacinais, assim como interferências como o efeito prozona que pode ocorrer nos testes de ligação secundária como o AAT e o 2-ME (Nielsen et al, 2002). É um teste de fácil execução, rápido e bastante confiável, que pode ser realizado a campo, e que não produz resíduos que tragam riscos para a saúde dos operadores.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O TPF apresentou um bom desempenho no diagnóstico da brucelose em bovinos, quando comparado aos testes do AAT e do 2-ME/SAL, mesmo em situações em que não se conhece a prevalência da doença.

O TPF possui características intrínsecas que permitem que o mesmo seja utilizado como um teste único de diagnóstico da brucelose bovina.

O TPF será o teste mais adequado para atender, em um futuro próximo, as demandas dos programas nacional e estadual de controle e erradicação da brucelose bovina, diminuindo os prejuízos gerados pelos resultados falso-negativos e falso-positivos.

Ao adotar o uso do TPF se eliminaria os riscos de biossegurança gerados pela utilização de reagentes de grande potencial tóxico como o mercaptoetanol.

O TPF possui maior agilidade na realização do teste e obtenção dos resultados, característica fundamental para os programas sanitários.

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. 189p.
- ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA. Belo Horizonte: FEPMVZ, v. 61, supl. 1, p. 1-141, Nov. 2009.
- BATHKE, W. Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose. São Paulo: Roca, 1999, v.2., p.144-160
- BERCOVICH, Z. Maintenance of Brucella abortus-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. *Veterinary Quarterly*, v.20, n.3, p.81-88, 1998.
- BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M. *Clínica Veterinária*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 570-579.
- BRASIL. Instrução Normativa n.6, de 08 de janeiro de 2004. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de janeiro de 2004, seção 1, p.6-10.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose. **Manual Técnico**. 2006. 184p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no. 27, de 20 de outubro de 2010. D.O.U. no. 203, Seção 1, p. 2, de 22 de outubro de 2010. 2010.
- BRUCELOSIS in humans and animals. Geneva: WHO/CDS/EPR/2006. 89p.

CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 61, supl. 1, p. 46-55, 2009.

CORBEL, M. J.; ELBERG S.S.; COSIVI O. (Ed.) *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: WHO Press, 2006. 89p.

DIAS, R. C. Caracterização espacial da brucelose bovina no Estado de São Paulo. 2004. 112p. , São Paulo, **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FARIA, G.C. *Avaliação do teste de polarização fluorescente para discriminar títulos sorológicos de bezerras vacinadas com amostras B19 de Brucella abortus*. 2010, 31p. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)** – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. *Diagnosis of brucellosis in livestock e wildlife. Review*. Doi: 10.3325/cmj.2010.51.296/www.cmj.hr. p. 296-305. 2010.

GUARINO, A.; FUSCO, G.; DI MATTEO, A.; URBANI, G.; CONDOLEO, R.; SERPE, L.; TITTARELLI, M.; DI VENTURA, M.; GALLO, P. Indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. *Veterinary Record*, v.149, p.88-90, 2001.

KURODA, R.B.S.; PAULIN, L.M.S.; NOZAKI, C.N.; SILVA JUNIOR, F.F.; GERONUTTI, 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.

LAGE, A. P.; POESTER, F.P.; PAIXÃO, T.A.; SILVA, T.M.A.; XAVIER, M.N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K.L.; ALVES, C.M.; MOL, J.P.S.; SANTOS, R.L. Brucelose bovina: uma atualização. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212, jul./set. 2008.

LUCAS, A. Simulação de impacto econômico da brucelose bovina em rebanhos produtores de leite das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. VPS - USP. 2006. 123 p.

MARVULO, M.F.V.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; GROFF, A.C.M.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, supl. 1, p.93-102, 2009.

MATHIAS, L.A.; MACMILLAN, A.P. Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico da brucelose bovina. *Pesq. Vet. Bras.* v. 15, n. 4, p. 101-105, 1995.

MATHIAS, L.A.; CORBELLINI, L.G.; MAIA, L.; NASCIMENTO, K.F.; PAULIN, L.M.S.; SAMARTINO, L.E.; SERQUEIRA, M.A.; SOARES, P.M.F.; SOUZA, M.M.A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n10, p2135-2140, out, 2010.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A.J. Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.4, p.395-399, 2000.

MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS L.A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.1, p.11-17, jan./mar., 2010

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HEHEGHAN, T.; McNAMRA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNAMARTÍNEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet. Microbiol.*, v. 80, p. 163-170, 2001.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 447-459, 2002.

NIELSEN, K.; GALL, D. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v. 23, n. 3, p. 989-1002, 2004.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, 2008, p. 328-345.

PACHECO, G.; MELLO, M.T. *Brucelose*. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1956. 727 p.

POESTER FP, SAMARTINO LE, LAGE AP. Diagnóstico da brucelose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.13-29, 2005.

RIO GRANDE DO SUL. Resolução nº1 de 20 de agosto de 2013. Regulamento Técnico do Programa Estadual de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovídea. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, 11 de setembro de 2013, p46. 2013

SANTOS, R. L., SILVA, F. L., PAIXÃO, T. A., SAMARTINO, L. E., Brucelose: Zoonose e Bioterrorismo. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p. 83-98, 2005.

SILVA, F. L., PAIXÃO, T. A., BORGES, A. M., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Brucelose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.1-12, 2005.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. Situação epidemiologic da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 61, supl. 1, p. 103-108, 2009.

ANEXOS

Anexo 1: Manuscrito de artigo a ser submetido à Revista Ciência Rural, com o título “Desempenho do teste de polarização fluorescente no diagnóstico de *Brucella abortus*”