

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*

(EVALUATION OF THE ROSE BENGAL PLATE TEST, IN COMPARISON TO THE COMPLEMENT FIXATION AND MERCAPTOETHANOL TESTS, FOR THE SERODIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN A *Brucella abortus* INFECTED BUFFALO (*Bubalus bubalis*) HERD)

(EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DEL ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO, EN COMPARACIÓN CON LAS PRUEBAS DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO Y 2-MERCAPTOETANOL, PARA EL DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LA BRUCELOSIS EN UN REBAÑO BUBALINO (*Bubalus bubalis*) INFECTADO POR *Brucella abortus*)

M. R. A. PINTO¹, J. J. FAGLIARI², L. A. MATHIAS³, J. MEGID⁴, V. R. SALGADO⁵

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) do qual foi isolada *Brucella abortus*, comparando seus resultados com aqueles obtidos na prova do 2-mercaptoetanol (2-ME) e na reação de fixação de complemento (RFC). Foram colhidas amostras de sangue de 90 fêmeas adultas com idade entre três e cinco anos e não vacinadas contra brucelose. Todos os soros foram submetidos às três provas sorológicas, e os resultados foram comparados por meio do indicador kappa e do teste de X^2 de MacNemar, adotando-se como ponto de corte o título 25 na 2-ME e o título 4 na RFC. Os três testes apresentaram boa concordância entre si (AAT x RFC, $k = 0,82$; AAT x 2-ME, $k = 0,92$; 2-ME x RFC, $k = 0,86$), e o teste de X^2 não apontou diferença significativa entre eles. A sensibilidade relativa da AAT, em comparação com a combinação dos resultados da 2-ME e da RFC, foi de 93,03%, com um intervalo de confiança (95%) de 87,57% a 98,47%. Três animais, de um total de 43 classificados como infectados pela combinação dos resultados dos outros dois testes, apresentaram resultado negativo na AAT, indicando a possibilidade de ocorrência de resultado falso-negativo nesse teste.

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose. *Bubalus bubalis*. Diagnóstico sorológico. Prova do antígeno acidificado tamponado. Reação de fixação de complemento. Prova do 2-mercaptoetanol.

¹ Médico Veterinário. Docente da Faculdade de Medicina Veterinária - UNICASTELO - Campus de Descalvado.

² Médico Veterinário. Docente da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Campus de Jaboticabal - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 5 - 14844-900 - Jaboticabal - SP; fagliari@fcav.unesp.br

³ Médico Veterinário. Docente da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Campus de Jaboticabal.

⁴ Médica Veterinária. Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Campus de Botucatu.

⁵ Médico Veterinário. Residente da disciplina de Enfermidades Infeciosas dos Animais - Unesp - Campus de Botucatu.

SUMMARY

The purpose of this investigation was to evaluate the rose Bengal plate test (RBPT) for brucellosis serodiagnosis in a *Brucella abortus* infected buffalo (*Bubalus bubalis*) herd, comparing the results with those obtained by the mercaptoethanol (MET) and the complement fixation tests (CFT). Serum samples from 90 three-to-five-years-old cows were collected. Animals were unvaccinated against brucellosis. Every serum was tested by the three serological tests, and the results were compared by kappa (k) and the MacNemar chi-square, adopting as cut-off the titre 25 for the MET and the titre 4 for the CFT. A good agreement was observed among the tests (RBPT *versus* CFT, $k = 0.82$; RBPT *versus* MET, $k = 0.92$; MET *versus* CFT, $k = 0.86$), and the chi-square did not show significant difference. The relative sensitivity of the RBPT, when compared with the combination of the results of MET and CFT, was 93.03%, with a confidence interval (95%) ranging from 87.57% to 98.47%. Out of 43 animals considered infected by the combination of the results of the two other tests, three tested negative by the RBPT, suggesting the possibility of occurrence of false-negative results.

KEY-WORDS: Brucellosis. *Bubalus bubalis*. Serodiagnosis. Rose Bengal plate test. Complement fixation test. Mercaptoethanol test.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la prueba del antígeno acidificado tamponado (AAT) para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño bubalino (*Bubalus bubalis*) del cual se aisló *Brucella abortus*, por la comparación de sus resultados con los obtenidos en la prueba de 2-mercaptoetanol (2-ME) y en la reacción de fijación del complemento (RFC). Fueron colectadas muestras de sangre de 90 hembras adultas con edad entre tres y cinco años y no vacunadas contra brucelosis. Todos los sueros fueron sometidos a las tres pruebas serológicas y los resultados fueron comparados por medio del indicador kappa y del teste de X^2 de MacNemar, adoptándose como punto de corte el título 25 en la 2-ME y el título 4 en la RFC. Los tres testes presentaron buena concordancia entre sí (AAT x RFC, $k = 0,82$; AAT x 2-ME, $k = 0,92$; 2-ME x RFC, $k = 0,86$) y el teste de X^2 no apuntó diferencia significativa entre ellos. La sensibilidad relativa de la AAT, en comparación con la combinación de los resultados de la 2-ME y de la RFC, fue de 93,03%, con un intervalo de confianza (95%) de 87,57% a 98,47%. Tres animales, de un total de 43 clasificados como infectados por la combinación de los resultados de otros dos testes, presentaron resultado negativo en la AAT, indicando la posibilidad de ocurrencia de resultados falsos negativos en ese teste.

PALABRAS-CLAVE: Brucelosis. *Bubalus bubalis*. Diagnóstico serológico. Prueba del antígeno acidificado tamponado. Reacción de fijación del complemento. Prueba del 2-mercaptoetanol.

INTRODUÇÃO

Para a Organização Mundial de Saúde, a brucelose continua sendo uma das mais importantes zoonoses no mundo. Trata-se de uma enfermidade infecciosa causada pela *Brucella spp.*, e, de acordo com o INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY (1988), a espécie *Brucella abortus*, o principal agente causador da brucelose bovina, é composta por sete biovars, sendo o biovar 1 o mais amplamente difundido pelo mundo (ACHA e SZYFRES, 2001).

Embora seja o bovino o hospedeiro preferencial, a *B. abortus* pode infectar outras espécies, como búfalos, camelos, cervos, cães, eqüinos, ovinos, suínos e o homem (STACK e MacMILLAN, 2003).

No Brasil, a população atual de búfalos (*Bubalus bubalis*) é estimada em aproximadamente 1,7 milhões de cabeças, e a maior parte desse efetivo, cerca de 65%, está localizada na região Norte (BRASIL, 2000). No entanto,

com o aumento do interesse na exploração econômica dessa espécie para a produção de carne e leite, o número de animais vem crescendo em outras regiões.

Pouco se sabe sobre as características epidemiológicas e fisiopatológicas da brucelose nos rebanhos de búfalos em nosso País, onde a maioria dessas criações é trabalhada sem um controle específico (MOTTA et al., 2002).

Em um estudo envolvendo o rebanho bubalino da região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Mathias et al. (1998) observaram uma prevalência de 10,39% de animais reagentes, encontrados em 11 (68,75%) dos 16 rebanhos examinados. Motta et al. (2002) encontraram uma taxa de prevalência de 11% em rebanhos criados no Estado de Minas Gerais. Fosgate et al. (2002) detectaram taxas de prevalência da brucelose em bubalinos nas ilhas caribenhas de Trinidad e Tobago, que variavam de 4 a 56,4%. Esses dados demonstram a amplitude que a doença pode atingir se medidas de controle não são rapidamente

adotadas.

Os esquemas de controle e erradicação baseiam-se na vacinação das fêmeas de três a oito meses de idade (BRASIL, 2001) e na detecção dos animais infectados, por meio dos testes sorológicos (SILVA et al., 2000), enaltecendo-se, portanto, a importância de métodos de diagnóstico confiáveis e práticos, capazes de reduzir a proporção de resultados falso-negativos e falso-positivos (MATHIAS et al., 1995). Nesse sentido, destacam-se a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) como prova de triagem, e a prova do 2-mercaptoetanol (2-ME) e a reação de fixação de complemento (RFC) como testes confirmatórios (BRASIL, 2001, NIELSEN et al., 2002).

A AAT é um teste barato, simples e de rápida execução, e há trabalhos demonstrando sua sensibilidade e sua especificidade (NICOLETTI, 1985, NICOLETTI, 1992, FOSGATE et al., 2002). Entretanto, vários estudos indicam a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos (ALTON et al., 1975, GUARINO et al., 2001, FOSGATE et al., 2002) e falso-negativos (MATHIAS e PINTO, 1983, NICOLETTI, 1985, SUTHERLAND, 1984/85, SHANDU e JOSHI, 1993, BERCOVICH, 1998, GUARINO et al., 2001).

A 2-ME é o teste confirmatório oficialmente recomendado pelo Ministério da Agricultura para ser utilizado para teste de animais reagentes na AAT ou de animias que apresentaram resultado inconclusivo na 2-ME (BRASIL, 2001) e caracteriza-se por ser de fácil realização e não exigir equipamentos sofisticados (GARCIA-CARRILLO, 1970). Trata-se de uma prova comprovadamente eficiente para bovinos (NICOLETTI, 1969, MARIÑO et al., 1991) e para búfalos (SHANDU e JOSHI, 1993, BERCOVICH, 1998). Entretanto, BERCOVICH (1998) indicou não ser uma prova adequada para identificar o animal com infecção aguda, e NIELSEN et al. (2002) alegaram a possibilidade de ocorrência de resultados falso-negativos.

A RFC é um dos mais importantes testes para a detecção de bovinos infectados por *B. abortus* (HILL, 1963, MacKINNON, 1963) e, devido à sua especificidade, está também indicada para confirmar resultados positivos nos testes de triagem (BRASIL, 2001). Estudos indicaram que a RFC apresenta boa correlação com o isolamento do agente etiológico (HAYES e CHAPPEL, 1982, SUTHERLAND et al., 1982, CORNER et al., 1983), o que permitiu a sua adoção como teste de referência para a avaliação de outros testes sorológicos (MATHIAS e PINTO, 1983, NICOLETTI, 1985). Por outro lado, essa técnica é bastante trabalhosa, requerendo a utilização de reagentes recém-preparados e pessoal especializado, não havendo uma padronização internacional (ALTON et al., 1975, ACHA e SZYFRES, 2001).

Diante disso, e tendo em vista a carência de pesquisas relacionadas ao diagnóstico da brucelose em búfalos, tem este trabalho o objetivo de avaliar a prova do

antígeno acidificado tamponado, comparando seus resultados com aqueles obtidos nas provas do 2-mercaptoetanol e de fixação de complemento, para o diagnóstico sorológico da brucelose nessa espécie.

MATERIALE MÉTODOS

1. Rebanho estudado

Foi estudado um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, composto por 92 fêmeas com idade entre três e cinco anos, não vacinadas contra a brucelose, alocadas em uma fazenda de criação do Município de São Carlos, na região central do Estado de São Paulo. Durante o verão de 2002/2003, verificou-se a ocorrência de abortamento em seis búfalas, sendo isolada a bactéria *Brucella abortus* do líquido gástrico de um feto examinado no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Campus de Botucatu – SP.

2. Colheita e preparação das amostras de sangue

Amostras de sangue de 10 mL foram colhidas da veia jugular de 90 fêmeas adultas, pelo sistema de colheita a vácuo, em frascos de vidro siliconizados (Vacutainer-Labnil), sem anticoagulante. Após a coagulação sanguínea, as amostras foram centrifugadas, e alíquotas de soro sanguíneo foram congeladas a -20°C até o momento dos exames.

3. Técnicas sorológicas

3.1. Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT)

AAAT, considerada a prova de triagem (BRASIL, 2001), foi realizada segundo a técnica recomendada por Alton et al. (1988). As reações foram visualmente classificadas em negativas (-) ou positivas (+), na ausência ou presença de aglutinação parcial ou completa, sendo realizadas no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Campus de Botucatu – SP.

3.2 Reação de Fixação de Complemento (RFC)

A RFC foi considerada a prova confirmatória (BRASIL, 2001), sendo empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, de acordo com as recomendações de Alton et al. (1988). O antígeno empregado foi produzido pelo Tecpar (Instituto de Tecnologia do Paraná), indicado para a prova de

oroaglutinação em tubos. Para a interpretação dos resultados, foi considerado como ponto de corte o título 4. As provas foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp - Campus de Jaboticabal.

3.3. Prova do 2-mercaptoetanol (2-ME)

A 2-ME foi realizada de acordo com metodologia descrita por Garcia-Carrilo (1982). Empregou-se antígeno preparado com *Brucella abortus*, produzido pelo Tecpar. Para a interpretação dos resultados, foi considerado como ponto de corte o título 25, adotado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2001). A PME foi realizada no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Campus de Botucatu – SP.

4. Análise dos dados

Para verificar a independência entre os resultados, empregou-se o teste de qui-quadrado de McNemar. Para a comparação entre os testes sorológicos, calculou-se a concordância e o coeficiente kappa (PEREIRA, 1995; ZAR, 1999).

Para estimar a sensibilidade relativa da prova do antígeno acidificado tamponado, considerou-se como infectado o animal que apresentasse título igual ou superior a 4 na reação de fixação de complemento e título igual ou superior a 25 na prova do 2-mercaptoetanol. Animais com resultado negativo nas provas de fixação de complemento e 2-mercaptoetanol foram considerados não infectados, e animais com resultado positivo em um desses dois testes e negativo no outro foram desconsiderados, conforme recomendam Martin et al. (1987). O cálculo do intervalo de confiança da sensibilidade foi realizado de acordo com as recomendações de Thorner e Remen (1961), usando a seguinte fórmula: $S \pm 1,96 \cdot \frac{\sqrt{S(100-S)}}{N}$, na qual S é a sensibilidade, e N é o número de animais

examinados.

RESULTADOS

Dos 90 soros sanguíneos analisados, 41 (45,56%) foram positivos na AAT, 47 (52,22%) na RFC e 45 (50,00%) na 2-ME. Admitindo como infectados os animais que apresentaram resultado positivo simultaneamente na RFC e na 2-ME, o rebanho estudado apresentou taxa de prevalência de 47,78% (43/90).

Dos 41 soros positivos na AAT, 40 (97,56%) também o foram na RFC, e 1 (2,44%) foi negativo. Dos 49 soros negativos na AAT, 42 (85,71%) foram negativos e 7 (14,29%) foram positivos na RFC, com títulos que variavam de 4 a 32 (Tabela 1).

Essa comparação resulta em uma concordância de 91,11% entre a AAT e a RFC, com um coeficiente kappa 0,82. A diferença entre esses resultados não foi significativa pelo teste de McNemar, com X^2 igual a 3,12 ($p > 0,05$).

A Tabela 2 mostra que dos 41 soros positivos na AAT, 41 (100%) também o foram na 2-ME e que, dos 49 soros negativos na AAT, 45 (91,84%) foram também negativos e 4 (8,16%) foram positivos na 2ME, todos apresentando títulos de 25.

Essa comparação resulta em uma concordância de 95,56% entre a AAT e a 2-ME, com um coeficiente kappa 0,92. A diferença entre esses resultados não foi significativa pelo teste de McNemar, com X^2 igual a 2,25 ($p > 0,05$).

Um dos animais reagentes na AAT, com título 128 na RFC e 400 na 2-ME, apresentou efeito prozona na 2ME. Considerando a existência de 43 animais positivos no rebanho, a frequência desse fenômeno aqui encontrada foi de 2,32% (1:43).

Observando-se a Tabela 3, nota-se que, dos 45 soros positivos na 2-ME, 43 (95,56%) também o foram na RFC, e 2 (4,44%) foram negativos, um dos quais com título 2 na RFC. Dos 45 soros negativos na 2-ME, 41 (91,11%) foram negativos e 4 (8,89%) foram positivos na RFC, os

Tabela 1 - Comparação entre os resultados obtidos por meio da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico de brucelose em búfalas adultas de um rebanho infectado por *Brucella abortus*, no Município de São Carlos, Estado de São Paulo, 2003.

AAT	RFC \geq 4		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	40	1	41
Negativo	7	42	49
Total	47	43	90

Concordância $40 + 42 / 90 = 91,11\%$
 Kappa = 0,82
 $X^2 = 3,12$

Tabela 2 - Comparação entre os resultados obtidos por meio da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da prova do 2-mercaptoetanol (2-ME) para diagnóstico de brucelose em búfalas adultas de um rebanho infectado por *Brucella abortus*, no Município de São Carlos, Estado de São Paulo, 2003.

AAT	2-ME \geq 25		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	41	0	41
Negativo	4	45	49
Total	45	45	90

Concordância $41 + 45 / 90 = 95,56\%$

Kappa = 0,92

$X^2 = 2,25$

Tabela 3 - Comparação entre os resultados obtidos por meio da prova do 2-mercaptoetanol (2-ME) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico de brucelose em búfalas adultas de um rebanho infectado por *Brucella abortus*, no Município de São Carlos, Estado de São Paulo, 2003.

2-ME \geq 25	RFC \geq 4		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	43	2	45
Negativo	4	41	45
Total	47	43	90

Concordância $43 + 41 / 90 = 93,33\%$

Kappa = 0,86

$X^2 = 0,17$

Tabela 4 - Resultados da prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com a condição do animal, determinada pela combinação dos resultados da prova do 2-mercaptoetanol (positivo \geq 25) e da reação de fixação de complemento (positivo \geq 4), para diagnóstico da brucelose em búfalas adultas de um rebanho infectado por *Brucella abortus*, no Município de São Carlos, Estado de São Paulo, 2003.

AAT	Condição do animal		Total
	Infectado	Não infectado	
Positivo	40	0	40
Negativo	3	41	44
Total	43	41	84

Sensibilidade = $40/43 \cdot 100 = 93,02\%$

Limite de confiança:

$$93,02 \pm 1,96 \cdot \sqrt{93,02 \cdot 6,98 / 84}$$

$$93,02 \pm 5,45$$

$$93,02 + 5,45 = 98,47$$

$$93,02 - 5,45 = 87,57$$

$$\text{Limite de confiança (95\%)} = 87,57\% - 98,47\%$$

DISCUSSÃO

No Brasil, há vários fatores que dificultam a implantação de um programa de controle da brucelose, como o grande número de fazendas distribuídas num amplo território, o desigual nível de comprometimento dos proprietários com os programas sanitários, além da elevada contagiosidade da doença entre os animais e destes para o homem, o crescente interesse na exploração leiteira de

búfalos, espécie suscetível à brucelose e até recentemente sem um programa de controle estabelecido. Também é importante mencionar a carência de estudos avaliando testes sorológicos para diagnóstico da brucelose em bubalinos, apesar de um volume considerável de investigações envolvendo bovinos. Para lograr êxito no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, lançado no Brasil em janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), nenhum elo epidemiológico deve ser

negligenciado, sob o risco de não atingir o objetivo almejado.

Apesar da escassez de estudos referentes à brucelose em búfalos, prova da importância dessa espécie na epidemiologia da doença são as taxas encontradas em alguns estudos realizados no Brasil (MATHIAS et al., 1998, MOTTA et al., 2002) e no exterior (FOSGATE et al., 2002). Nesses trabalhos, as taxas variaram de 4% a 56,4%, enquanto a encontrada no presente estudo foi 47,78%. Isso configura uma evidência da dimensão do problema a ser enfrentado para, ao menos, manter sob taxas controláveis a infecção por *Brucella spp.* no rebanho bubalino de nosso País.

AAAT, a RFC e a 2-ME, comparadas neste estudo, são todas provas recomendadas pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001) e apresentam uma vasta galeria de estudos para a espécie bovina, mas poucos relatos em relação à espécie bubalina.

Nicoletti (1967) indicou que a AAT forneceu poucos resultados falso-negativos em bovinos. Além disso, Nicoletti (1992) observou que o “card test”, uma prova similar à AAT, foi capaz de identificar todos os búfalos infectados de um rebanho, e Shandu e Joshi (1993) e FOSGATE et al. (2002) recomendaram a AAT como prova de triagem para o controle da brucelose em bovinos e bubalinos, por sua maior sensibilidade em comparação com outros testes.

No presente estudo, apesar da boa concordância entre os resultados da AAT e os da RFC e da 2-ME, foram observados animais com resultado negativo na AAT e positivo tanto na RFC quanto na 2-ME, combinação que permite considerar um animal nessa condição como infectado, principalmente levando-se em conta que houve o isolamento do agente etiológico nesse rebanho. Isso permite afirmar que ocorreram resultados falso-negativos na AAT, embora seja necessário mencionar que nesses casos os títulos observados na RFC e na 2-ME foram baixos, próximos do ponto de corte. Resultados negativos na AAT e positivos em provas confirmatórias também já foram relatados em outros trabalhos (MATHIAS e PINTO, 1983, NICOLETTI, 1985, SUTHERLAND, 1984/85, BERCOVICH, 1998, GUARINO et al. 2001), mas isso não seria o esperado de um teste de triagem, o qual deve primar pela elevada sensibilidade. Isso pode trazer sérias consequências, sobretudo por tratar-se de uma doença contagiosa, com enorme impacto econômico e sérias implicações zoonóticas.

Guarino et al. (2001), comparando o teste rosa de Bengala, uma prova similar à AAT, com a RFC, obtiveram uma concordância de 88%. Apesar da boa concordância entre a AAT e a RFC observada no presente estudo (91,11%; $k = 0,82$), a elevada porcentagem de resultados negativos na AAT (7 em 47, ou 14,89%) sugere a influência de fatores como a baixa produção de anticorpos, tal como ocorre nos estágios precoces da doença e no período

pós-parto ou pós-aborto. Esses resultados negativos na AAT ocorreram em animais que haviam parido entre 12 e 38 dias antes da colheita de soro sanguíneo ou que pariram entre 18 e 29 dias após a colheita. No entanto, nenhum desses animais apresentou soroconversão na AAT em exame realizado três a quatro meses após o parto.

Shandu e Joshi (1993), estudando 38 búfalos não vacinados e reagentes na 2-ME, detectaram a ocorrência de um soro com efeito prozona (2,6%). Agora, estudando 45 búfalos reagentes na mesma prova, observou-se também um caso do fenômeno, resultando em uma frequência de 1,96%. Quando isso ocorreu, a AAT foi capaz de detectar esse animal, indicando um resultado positivo. Shandu e Joshi (1993) indicaram a 2-ME como o melhor teste confirmatório para o diagnóstico da brucelose em búfalos. Por outro lado, Nielsen et al. (2002) afirmaram que essa prova pode proporcionar resultados falso-negativos. Neste trabalho, observou-se que quatro animais com resultado positivo na RFC foram negativos na PME, enquanto dois soros com resultado positivo na 2-ME foram negativos na RFC. A concordância entre essas duas provas foi de 93,33%, com indicador kappa 0,86, mostrando boa concordância, o que sugere que a 2-ME também pode ser utilizada como prova confirmatória para o diagnóstico sorológico da brucelose em búfalos, principalmente se for considerado que a 2-ME não apresenta as dificuldades da RFC (ALTON et al., 1975, ACHA e SZYFRES, 2001), sendo uma prova de procedimento simples e de baixo custo. As ressalvas a serem feitas à 2-ME são a necessidade de local apropriado e bem ventilado para a sua realização, conforme indicaram NIELSEN et al. (2002).

As reações inespecíficas que ocorrem durante o diagnóstico sorológico da brucelose ainda constituem uma questão a ser resolvida. Entretanto, a presença de animais infectados falso-negativos, os quais não são detectados até que o aborto e a transmissão da doença ocorram, é muito mais problemática em termos de erradicação da doença. Sendo o bubalino uma potencial fonte de reinfecção para bovinos, todos os esforços necessários devem ser implementados em nosso País, a fim de suplantarem as dificuldades que serão encontradas, sob o risco de fracassarem os recentes programas de controle e erradicação da doença. O uso de testes confirmatórios de alta especificidade, como a RFC, é importante para reduzir o número de búfalas classificadas equivocadamente como infectadas. Por outro lado, testes de triagem de alta sensibilidade são fundamentais para que animais falso-negativos não sejam retidos nos rebanhos, o que seria desastroso nos programas de controle e erradicação. Os achados deste trabalho indicam a necessidade de estudos mais aprofundados em relação à sensibilidade de testes de triagem para o diagnóstico da infecção em rebanhos bubalinos acometidos pela brucelose.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N., SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y los animales**: v.1. **Bacteriosis y micosis**. 3. ed. Washington: OPS, 2001. v.1, 398 p.
- ALTON, G. G., MAU, J., ROGERSON, B. A., McPHERSON, G. G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose Bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.57-63, 1975.
- ALTON, G. G., JONES, L. M., ANGUS, R. D., VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 190p.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, v.30, p.39-50, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº2, de 10 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16, jan., 2001. Seção 1, p.11-17.
- CORNER, L. A., ALTON, G. G., McNICHOL, L. N., STREETENS, T., TRUEMAN, K. F. An evaluation of an anamnestic test for brucellosis in cattle of the northern pastoral areas. **Australian Veterinary Journal**, v.60, n.1, p.1-3, 1983.
- FOSGATE, G. T., ADESIYUN, A. A., HIRD, D. W., JOHNSON, W. O., HIETALA, S. K., SCHRIG, G. G., RYAN, J. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.11, p.1598-1605, 2002.
- GARCIA-CARRILLO, C. Métodos para el diagnóstico de la brucelosis. **Gaceta Veterinaria**, v.32, n.246, p.661-667, 1970.
- GARCIA-CARRILLO, C. **Pruebas suplementarias para el diagnóstico de la brucelosis**. RAMOS MEJIA: Centro Panamericano de Zoonosis, 1982. 30p. (Nota Técnica, 25).
- 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.21, p.88-90, 2001.
- HAYES, J., CHAPPEL, A. Comparison of the results of the brucellosis radioimmunoassay and other serological tests in experimentally infected cattle. **Journal of Hygiene**, v.88, p.21-28, 1982.
- HILL, W. Standardization of the complement fixation test for brucellosis. **Bulletin of OIE**, v.60, p.401-410, 1963.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY. Subcommittee on taxonomy of *Brucella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.450-452, 1988.
- MacKINNON, D. The fixation test in brucellosis. **Bulletin of OIE**, v.60, p.383-400, 1963.
- MARIÑO, J. O. C., GALLEGOS, M., DELEÓN, L. S., ALMANSA, M. J. Comparación de técnicas serológicas en la evaluación de bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. In: FRANK, J. F. (Ed.) **Networking in brucellosis research**. Tokyo: United Nations University Press, 1991. p.120-130.
- MARTIN, S. W., MEEK, A. H., WILLEBERG, P. **Veterinary epidemiology: principles and methods**. Ames: Iowa State University Press, 1987. 343 p.
- MATHIAS, L. A., DEL FAVAL, C., GIRIO, R. J. S., SAMARA, S. I. Estimated prevalence of brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Ribeira Valley region, State of São Paulo, Brazil. **Revue d'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 51, p. 289-292, 1998.
- MATHIAS, L. A., PINTO, A. A. Serological diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): comparison among complement fixation, serum agglutination and rose bengal plate test. **International Journal of Zoonosis**, v.10, p.122-126, 1983.
- MATHIAS, L. A., MACMILLAN, A. P., GREISER-WILKE, I., MOENNIG, E. V. Comparação entre a reação de fixação de complemento, teste imunoenzimático indireto e teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos procedentes de rebanhos com histórico da enfermidade. **Ars Veterinaria**, v.11, n.1, p.47-55, 1995.

MOTTA, P. M. C., LEITE, R. C., LOPES, L. B., AMARAL, F. R., PRADO, P. E. F., LAGE, A. P. Brucelose e tuberculose em oito rebanhos de núcleo de bubalinos de Luz-Dores do Indaiaí. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.151, n.12, p.1778-1783, 1967.

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

NICOLETTI, P. The serologic diagnosis of brucellosis in buffaloes. In: BUFFALO CONGRESS, 1., Cairo, 1985, **Proceedings...**, p.830-833.

NICOLETTI, P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health and Production**, v.24, p.40-44, 1992.

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

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia**. Teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 596p.

SHANDU, K. S., JOSHI, D. V. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic tests for brucellosis. **Indian Journal Pathology and Microbiology**, v.36, n.4, p.458-465, 1993.

SILVA, I., DANGOLLA, A., KULACHELVY, K. Seroepidemiology of *Brucella abortus* infection in bovids in Sri Lanka. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p.51-59, 2000.

STACK, J. J., MacMILLAN, A. P. Identification and biotyping of *Brucella* spp. Brunet Publications. Disponível em: <<http://www.progress.box.co.il/brunet/>>. Acesso em: 14 jun. 2003.

SUTHERLAND, S. S., LE GRAS, D. V., ROBERTSON, A. G., JOHNSTON, J. M., EVANS, R. J. Serological response of cattle after vaccination and challenge with *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v.7, n.2, p.165-175, 1982.

SUTHERLAND, S. S. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v.10, p.23-32, 1984/85.

THORNER, R. M., REMEIN, Q. R. **Principles and procedures in the evaluation of screening for disease**. Washington, U.S. Government Printing Office, 1961. 24 p. (Public Health Service Publication, 846).

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663 p.