

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR E ELISA NO DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE OVINA EM CABANHAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO*

C.N. Nozaki, J. Megid, K.C. Lima, F.F. Silva Junior, C.S. Veloso

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, CP 560, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: jane@fmvz.unesp.br

RESUMO

A brucelose ovina, causada pela *Brucella ovis*, é responsável por perdas econômicas, com prejuízos para a produção de leite, carne e fertilidade do rebanho. O objetivo do trabalho foi comparar as técnicas de Imunodifusão em Gel de Agar e ELISA em soros de ovinos de cabanhas, da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, que registram seus animais na Associação Paulista dos Criadores de Ovinos, correlacionando os resultados obtidos na imunodifusão em gel de ágar sem 2-mercaptoetanol (ID S/2-ME), imunodifusão em gel de ágar com 2-mercaptoetanol (ID C/2-ME) e ELISA ao quadro clínico dos animais. Dos 1.033 soros analisados, observou-se 12% de positivos a ID S/2-ME, 1,1% de positivos a ID C/2-ME e 6% considerados suspeitos ao ELISA. A IDC/2-ME não foi capaz de detectar os animais reagentes ao teste de ELISA. Uma vez que as reações no ELISA foram somente suspeitas, não se pode afirmar que os animais fossem positivos. Os melhores resultados foram observados com a ID S/2-ME e ELISA. Ressalta-se a baixa concordância entre as provas sorológicas avaliadas. A aplicação associada da ID S/2-ME ao ELISA deve ser incentivada para o diagnóstico da brucelose ovina por possibilitar resultados mais confiáveis.

PALAVRAS-CHAVE: *Brucella ovis*, imunodifusão em gel de ágar, ELISA, brucelose ovina, 2-mercaptoetanol.

ABSTRACT

COMPARATION OF THE TECHNIQUE OF IMMUNODIFFUSION IN AGAR GEL AND ELISA TEST IN THE DIAGNOSIS OF OVINE BRUCELLOSIS IN SHEEP IN THE MIDWEST REGION OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL. Ovine brucellosis due to *Brucella ovis* is a major cause of economic losses related to milk yield drop, impaired meat production and poor reproductive performance. This study was designed in order to compare the ELISA test and the immunodiffusion in agar gel (AGID) technique in ovine sera from Paulista Ovine Bearer Association registered sheep in the midwest region from São Paulo state, Brazil. The observed results in the AGID test with 2-Mercaptoethanol (2-ME) and without 2-Mercaptoethanol and ELISA was correlated to the animals' clinical picture. A positivity rate of 1.1% and 12% to AGID, with and without 2-ME, respectively was recorded with 6% of results considered suspicious in ELISA test for the 1,033 analysed serum samples. Considering that ELISA results were of suspect, it cannot be linked with an infected status. The authors reinforce the low agreement of the tests analysed. The best results were achieved with AGID and ELISA. The associated performance of AGID and ELISA offers a more reliable diagnosis and therefore must be encouraged.

KEY WORDS: *Brucella ovis*, agar gel immunodiffusion, ELISA, ovine brucellosis, 2-mercaptoethanol.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa crônica comum a diversas espécies animais. O agente etiológico da brucelose ovina é *Brucella ovis*,

produz doença clínica ou subclínica crônica em ovinos caracterizada por epididimite e subsequente diminuição de fertilidade em carneiros; em ovelhas, causa abortos ocasionais. A existência de outras bactérias causadoras de epididimite clínica

*Trabalho redigido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, junto ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP. Apoio financeiro da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão - UNESP - Botucatu

dificulta o diagnóstico clínico apenas por palpação testicular (BLASCO, 1990).

Métodos clínicos e bacteriológicos não são adequados para a detecção da doença em um número muito grande de ovinos, porque ambos métodos falham ao detectar todos animais infectados. Vários métodos sorológicos tem sido usados para detectar anticorpos contra *B. ovis* incluindo imunodifusão em gel de agar (ID), fixação de complemento (FC), hemaglutinação indireta (HI), imunofluorescência indireta e ELISA (VIGLIOCCO *et al.*, 1997).

A ID é considerada de alta sensibilidade e especificidade (HILBINK *et al.*, 1993). O tratamento dos soros com solução de 2-mercaptoetanol (2-ME) tem como função inibir as reações inespecíficas decorrentes de IgM, melhorando a especificidade da prova sem perda de sensibilidade, sendo indicado no diagnóstico de soroaglutinação rápida (SAR) em cartão para brucelose canina (CARMICHAEL, 1969).

A prova de ELISA supera em sensibilidade e especificidade as provas citadas anteriormente e permite o processamento de um grande número de amostras simultaneamente. Adicionalmente, a hemólise e a anticomplementariedade do soro não afetam a reação (EISTEN, 1999).

Segundo GIL TURNES (1998), as infecções causadas por *B. ovis* estão amplamente disseminadas no Rio Grande do Sul e nos países dos quais se importam reprodutores. Mesmo não se tendo informação sobre a prevalência da doença em outros estados brasileiros, sendo o Rio Grande do Sul um estado importador e exportador de reprodutores, deve-se exigir a realização de testes de brucelose ovina. Estas comprovações salientam a importância de estabelecer rotinas de detecção da doença nos reprodutores comercializados no Estado.

O objetivo do presente trabalho foi comparar as provas de ELISA e Imunodifusão em Gel de Agar em soros de ovinos de cabanhas da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, que registraram seus animais na Associação Paulista dos Criadores de Ovinos (ASPACO), correlacionando os resultados obtidos com o quadro clínico dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: foram colhidas, no total, 1.033 amostras de soro sanguíneo de ovinos, tanto machos como fêmeas, em 11 cabanhas, da região centro-oeste, cadastradas na ASPACO, envolvendo os municípios de Botucatu, Jaú, Bauru e Avaré.

Prova de Imunodifusão em Gel de Agar (ID S/2-ME): os soros foram submetidos à ID seguindo a técnica do Instituto Tecnológico do Paraná, a preparação do agar gel realizada de acordo com ALTON (1976).

Tabela 1 - Resultados comparativos obtidos na prova de ID S/2-ME frente à ID C/2-ME, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2001-2003.

ID C/2-ME	ID S/2-ME			Total de amostras
	POS	NEG	SUSP	
POS	11	0	0	11
NEG	110	871	38	1.019
SUS	3	0	0	3
TOTAL	124	871	38	1.033

Tabela 2 - Resultados comparativos obtidos na prova de ID S/2-ME frente ao ELISA, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2001-2003.

ELISA	ID S/2-ME			Total de amostras
	POS	NEG	SUSP	
POS	0	0	0	0
NEG	117	820	35	972
SUS	7	51	3	61
TOTAL	124	871	38	1.033

Tabela 3 - Resultados comparativos obtidos na ID C/2-ME frente ao ELISA, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2001-2003. Total de amostras.

ELISA	ID C/2-ME			Total de amostras
	POS	NEG	SUSP	
POS	0	0	0	0
NEG	11	958	3	972
SUS	0	61	0	61
TOTAL	11	1.019	3	1.033

Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar Modificada (ID C/2-ME): para a prova de ID C/2-ME, os soros foram tratados com 2-ME, segundo LISLE E CARMICHAEL (1974). Todos os soros foram submetidos ao tratamento com 0,2 M de 2-mercaptoetanol (1,41 mL de 2-mercaptoetanol para 100 mL de água destilada). Dessa forma, à quantidade de 100µL de soro foi adicionada 100µL da solução de 2-ME 0,2 M, permanecendo em reação durante 30 minutos, após o qual 35µL dos soros tratados foram submetidos à ID e interpretados de forma idêntica ao item anterior.

ELISA: para o teste de ELISA, utilizou-se o CHEKIT- *Brucella ovis* test, da Bommeli Diagnostics, fornecido pela INTERVET e realizado de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Em todos os testes foram utilizados soros sabidamente positivos e negativos como controle de reação de cada prova.

Todas as amostras colhidas foram submetidas à prova de soroaglutinação em placa com antígeno acidificado tamponado corado por Rosa Bengala (TAAT), para o descarte de uma possível infecção por *B. abortus*.

As provas foram realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada às Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP/Botucatu, São Paulo.

RESULTADOS

Todos os 1.033 soros submetidos à prova de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado, resultaram negativos ao teste.

Dentre as amostras testadas ao teste de IDS/2-ME somente 11 resultaram igualmente positivas e 3 suspeitas, sendo as demais consideradas negativas ao teste de IDC/2-ME. Todas amostras negativas a IDS/2-ME resultaram igualmente negativas na IDC/2-ME, enquanto que as suspeitas na IDS/2-ME resultaram negativas na IDC/2-ME.

Das amostras positivas na IDS/2-ME, 117 foram negativas e 7 suspeitas ao teste de ELISA. Das amostras suspeitas à IDS/2-ME, 35 foram negativas e 3 suspeitas ao teste de ELISA. Dentre as amostras negativas na IDS/2-ME, 820 foram igualmente negativas e 51 foram suspeitas ao teste de ELISA.

Para as amostras que resultaram positivas ao teste de IDC/2-ME todas resultaram negativas ao teste de ELISA. Das amostras suspeitas na IDC/2-ME, 3 foram negativas ao teste de ELISA. Dentre as amostras negativas ao teste de IDC/2-ME, 958 foram também negativas enquanto que 61 resultaram suspeitas ao teste de ELISA.

DISCUSSÃO

Neste estudo não se observou nenhum animal reagente à prova de TAAT, resultados concordantes ao nosso estudo foram observados por MARINHO & MATHIAS (1996), que estudando ovinos do Estado de São Paulo não observaram animais reagentes.

Observou-se neste estudo 12% de positividade ao teste de IDS/2-ME, resultado discordante quando comparado ao elevado percentual observado por BERMUDEZ *et al.* (1978), no RS, que relataram 43,5% de positividade em carneiros e 32,8% em rufiões, e por SILVA *et al.* (2001), os quais analisando 30 rebanhos em 13 municípios do Rio Grande do Norte, obtiveram um percentual de 34% de animais positivos à ID.

Contrariamente, MARINHO & MATHIAS (1996), ao avaliarem 850 soros de ovinos do Estado de São Paulo, não observaram nenhum animal reagente à ID. Esta diferença pode ser decorrente da diferença no antígeno, uma vez que os autores utilizaram uma amostra 63/290 de *B. ovis*.

Resultados discrepantes foram observados quando os soros foram submetidos ao tratamento com 2-ME. O percentual de positividade dos soros, após o tratamento resultou em 1,1%.

No Brasil não se tem informação sobre estudos de ID de soros ovinos tratados com 2-ME.

Resultados discrepantes também foram observados por MORAES (2000), que estudando a prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães da microrregião da serra de Botucatu, observou 202 (18,84) animais reagentes ao teste de ID, porém ao submeterem estes soros ao tratamento com 2-ME apenas 9 (0,84%), resultaram também, reagentes ao teste.

Segundo KEID (2001), estas diferenças na porcentagem de positivos entre as provas de IDS/2-ME e IDC/2-ME podem ser conseqüências de reações inespecíficas, pois os LPS de várias bactérias gram negativas podem apresentar reação cruzada com *B. canis*, o mesmo podendo ocorrer para *B. ovis*.

Em relação aos resultados observados no teste de ELISA, observou-se que não houve animais reagentes que pudessem ser considerados positivos ao teste, embora 6% dos animais tenham apresentado densidade óptica considerada como animais suspeitos. MARINHO & MATHIAS (1996), relatam ter encontrado reações falso positivas ao teste de ELISA no estudo realizado pelos autores.

Quando analisados os resultados das provas de IDS/2-ME com IDC/2-ME, observou-se que 11/124 animais resultaram positivos em ambas as provas, porém 110 dos positivos na IDS/2-ME foram classificados como negativos na IDC/2-ME. Isto poderia ser atribuído a ação do 2-ME responsável por degradar as moléculas de IgM, por outro lado, poderia também ser decorrente de menor sensibilidade da IDC/2-ME, aspecto citado por KEID (2001). A redução da sensibilidade pode ser decorrente da diluição do soro quando tratado com 2-ME. Embora CARMICHAEL (1990), considere que o tratamento com 2-ME não altere a sensibilidade da técnica de aglutinação, não se pode aferir o mesmo com relação a ID uma vez que o limiar de detecção deste método é três vezes superior ao da aglutinação detectando um mínimo de 30 gramas de anticorpos/mL frente à aglutinação que detecta 10,05 grama/mL (MATUKUMA & RICHTZENHAIN, 1997).

Dos resultados da IDS/2-ME comparados com os do ELISA, observou-se que o ELISA detectou 7 animais que resultaram positivos e suspeitos à IDS/2-

ME. Porém, 51 dos negativos na ID S/2-ME foram suspeitos ao teste de ELISA, aspecto que poderia ser explicado pela elevada sensibilidade do teste.

Comparando-se o ELISA com a ID C/2-ME, notou-se que a ID C/2-ME não detectou nenhum dos soros dos animais reagentes ao teste de ELISA.

A ID C/2-ME não foi capaz de detectar os animais reagentes ao teste de ELISA. Uma vez que as reações no ELISA foram somente suspeitas, não se pode afirmar que os animais sejam positivos, porém se considerarmos a recomendação da OIE (2000), da utilização de ELISA e ID para melhorar a sensibilidade dos testes, os melhores resultados, foram observados com a IDS/2-ME e ELISA. Resultados positivos na ID S/2-ME e suspeitos no ELISA ou mesmo suspeitos em ambos os testes, sugerem no mínimo a necessidade de reteste dos animais ou utilização de técnicas mais específicas e sensíveis, aspecto já citado por MAC MILLAN (1990).

Segundo a OIE (2000), o ELISA apresenta maior sensibilidade que a ID ou FC, porém em função de alguns resultados ELISA negativos e ID positivos, a combinação da ID com ELISA resultaria em sensibilidade ótima.

Desta forma a associação da IDS/2-ME ao ELISA apresentou melhores resultados, detectando 7 animais positivos e três suspeitos ao ELISA, contrariamente à ID C/2-ME que não apresentou concordância de resultados positivos comparativamente ao ELISA. Estes resultados são reforçados pela recomendação da OIE (2000) da utilização da associação da ID com ELISA para aumentar a sensibilidade do teste.

As discrepância de resultados observados nas técnicas sorológicas, associadas à ausência de sintomatologia clínica nos animais, impossibilita a caracterização da enfermidade de forma eficiente e demonstra a necessidade de desenvolvimento de testes diagnósticos eficazes, que possibilitem o real diagnóstico da enfermidade.

CONCLUSÕES

- 1) A ID C/2-ME não foi capaz de detectar os animais reagentes ao teste de ELISA.
- 2) A IDS/2-ME apresentou percentual de positividade elevado não concordantes com o teste de ELISA e com a ID C/2-ME.
- 3) A IDS/2-ME detectou animais suspeitos no ELISA.
- 4) As reações positivas e suspeitas observadas, não apresentaram associação com sintomatologia clínica dos animais.
- 5) A aplicação associada da IDS/2-ME ao ELISA deve ser incentivada para o diagnóstico da brucelose ovina por possibilitar resultados mais confiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTON, G.G.; Jones, L.M.; Pietz, D.E. Las técnicas de laboratorio en la brucellosis. *World Health Organ. Monogr. Ser.*, v.55, p.156-160, 1976.
- BERMÚDEZ, J.; RIETZ CORREA, F.; BARRUDA, J.; CUENCA, N.; ERREICO, F. Controle da brucelose ovina em um estabelecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 16., 1978, Salvador. *Anais*. Salvador: 1978. p.23.
- BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. (Eds.). *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.351-378.
- CARMICHAEL, L.E. Canine Brucellosis: isolation, diagnosis, transmission. *Proc. Annu. Meet. U.S. Livest. Sanit. Assoc.*, v.71, p.517-527, 1969.
- CARMICHAEL, L.E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. (Eds.). *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.335-350.
- EISTEN, S.M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epidemitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Arch. Med. Vet.*, v.31, n.1, 1999.
- GIL TURNES, C. Brucelose ovina. In: CORREA, R.F., SCHILD, A.L., MENDEZ, M.C. (Eds.). *Doenças de ruminantes e equinos*. Pelotas: Editora da Universidade Federal de Pelotas, 1998. p.161-169.
- HILBINK, F.; WRIGHT, M.; ROSS, G. Use of the double gel diffusion test and enzyme-linked immunosorbente assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. *N. Z. Vet. J.*, v.41, p.111-115, 1993.
- KEID, L.B. *Diagnóstico da brucelose canina por Brucella canis. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais: imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de ágar com emprego do 2-mercaptoetanol, cultivo e PCR*. São Paulo: 2001. 96p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. São Paulo].
- LISLE, W.G. & CARMICHAEL, L.E. A plate Agglutination Test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.35, n.7, p.905-909, 1974.
- MAC MILLAN, A. Conventional serologic tests. In: NILSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.154-300.
- MARINHO, M. & MATHIAS, L.A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.16, p.45-48, 1996.
- MATUKUMA, C.A. & RICHTZENHAIN, L.J. Testes sorológicos na clínica de pequenos animais. *Rev. Clínica Vet.*, São Paulo, v.2, n.8, p.20-23, 1997.
- MORAES, C.C.G. *Prevalência de anticorpos anti-brucella canis em cães da Microregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo*. Botucatu: 2000. 81p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista, Botucatu.]
- OIE, Manual of Standards diagnostic tests and vaccines, 2000. *Ovine epididymitis (Brucella ovis)*. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00062.htm. Acesso em: 4. jul. 2003.

SILVA, J.B.A.; SILVA, J.S.; COSTA, E.S.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Ocorrência de brucelose ovina causada por *B. ovis* pelo método de imunodifusão em ágar gel em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001, Gramado. *Anais*. Gramado: 2001. p.168.

VIGLIOCCO, A.M.; SILVA PAULO, P.S.; MESTRE, J.; BRIONES, G.C.; DRAGHI, G.; TOSSI, M.; NIELSEN, K. Development and

validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, v.54, p.357-368, 1997.

Recebido em 13/3/04

Aceito em 6/5/04