

PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Brucella ovis* EM OVINOS DO ESTADO DE SÃO PAULO¹

Marcia Marinho² e Luis Antonio Mathias³

ABSTRACT.- Marinho M. & Mathias L.A. 1996. [Investigation of antibodies to *Brucella ovis* in sheep of the State of São Paulo.] Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(2/3):45-48. Depto Med. Veterinária Preventiva, FCAVJ-Unesp, Jaboticabal, SP 14870-000, Brazil.

Eight hundred and fifty sheep sera from 18 herds, located in 15 municipalities of the State of São Paulo, were examined by complement fixation test, indirect enzyme immunoassay and gel diffusion test for antibodies to *Brucella ovis*. The combination of the serological test results and the clinical and epidemiological data suggest that none of the examined animals was infected. The complement fixation and the gel diffusion tests showed good specificity, but the indirect enzyme immunoassay showed false positive results in nine of the sera.

INDEX TERMS: *Brucella ovis*, serological diagnosis.

SINOPSE.- Foram examinados soros sanguíneos de 850 ovinos, pertencentes a 18 rebanhos situados em 15 municípios do Estado de São Paulo. Esses soros foram submetidos à reação de fixação de complemento, ao teste imunoenzimático indireto e à prova de imunodifusão em gel de ágar para a pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis*. A pesquisa de anticorpos e os dados clínicos e epidemiológicos sugerem que nenhum dos animais que fizeram parte do estudo estava infectado por aquela bactéria. A reação de fixação de complemento e a prova de imunodifusão em gel de ágar revelaram boa especificidade, mas o teste imunoenzimático indireto apresentou resultados falso-positivos em nove soros examinados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Brucella ovis*, diagnóstico sorológico.

INTRODUÇÃO

A infecção ovina por *Brucella ovis* causa uma enfermidade também conhecida como epididimite dos carneiros. O reconhecimento dessa bactéria como o agente etiológico da

infecção foi relatado inicialmente por Buddle & Boyes (1953), na Nova Zelândia. A partir de então, a epididimite dos carneiros tem sido constatada praticamente em todos os países do mundo onde a ovinocultura encontra lugar de destaque na exploração pecuária, com exceção da Grã-Bretanha (Spencer & Burgess 1984).

A presença de ovinos com anticorpos contra *B. ovis* também tem sido observada em outros países da América Latina, como é o caso do México (Ramos Rodriguez 1986) e do Chile (Tamoyo et al. 1989, Rojas et al. 1990).

No Brasil, essa infecção já foi diagnosticada no Rio Grande do Sul, através de observações clínicas, nos anos 60 (Mies Filho 1964, Ramos et al. 1967), tendo sido confirmada por Blobel et al. (1972). A ocorrência da infecção em ovinos do Rio Grande do Sul também tem sido constatada através de testes sorológicos (Magalhães Neto et al. 1991). Entretanto, são raros os estudos sobre a ocorrência da infecção em outras regiões do Brasil, não havendo qualquer trabalho a respeito da situação dessa enfermidade no rebanho ovino do Estado de São Paulo.

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* tem sido feito, predominantemente, através de testes sorológicos, sendo que outros autores recomendam que o histórico do rebanho e o quadro clínico também sejam levados em consideração ao se interpretar o resultado dos testes sorológicos.

Dentre as provas mais amplamente utilizadas no diagnóstico desta infecção, encontra-se a reação de fixação de complemento e o teste de imunodifusão em gel (Myers et

¹ Aceito para publicação em 28 de fevereiro de 1996.

² Médica Veterinária, aluna do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp-Campus de Jaboticabal, São Paulo.

³ Depto Medicina Veterinária Preventiva, (FCAV), Unesp-Campus de Jaboticabal, Rodov. Carlos Tonanni Km 5, Jaboticabal, SP 14870-000.

al. 1972, Jones et al. 1975). Além destas, também tem adquirido bastante destaque o teste imunoenzimático indireto (Rahaley et al. 1983, Cho & Niilo 1987, West et al. 1993).

Diante da inexistência de dados a respeito, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a frequência de reações sorológicas contra *Brucella ovis*, em ovinos de rebanhos do Estado de São Paulo, através da reação de fixação de complemento, do teste imunoenzimático indireto e da prova de imunodifusão em gel de ágar.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra obtida

Foram colhidas 850 amostras de sangue de ovinos adultos de diversas raças, procedentes de 18 rebanhos situados em 15 municípios do Estado de São Paulo (Avaré, Bauru, Botucatu, Colômbia, Dobrada, Itai, Jaboticabal, Jaú, Lavínia, Matão, Pontal, São Joaquim da Barra, São Manoel, Serra Azul e Severínia), no período de julho de 1992 a setembro de 1993, sendo 151 soros de animais machos e 699 de fêmeas.

Provas sorológicas

Preparação do antígeno. O antígeno de *B. ovis*, utilizado nas três provas sorológicas, foi preparado de acordo com as recomendações de Alton et al. (1988). Foi empregada a amostra 63/290, obtida junto ao Central Veterinary Laboratory (UK), sendo cultivada em *Brucella* ágar (Merck S.A., Brasil) acrescido de 10% de soro de coelho. A massa bacteriana foi autoclavada a 120°C por 20 minutos e o material centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante usado como antígeno.

Para a padronização, era feita uma titulação em bloco, testando-se, através das três provas empregadas no trabalho, várias diluições do antígeno contra várias diluições do soro controle positivo.

O antígeno obtido era dividido em alíquotas e conservado a -20°C até o momento do uso.

Preparação do soro hiperimune. Para a obtenção de um soro que pudesse ser empregado como controle positivo nos testes sorológicos, um carneiro adulto foi submetido a inoculação, por via intratesticular, com uma dose de 244×10^{10} UFC de *Brucella ovis*, em dose única.

Reação de fixação de complemento. Foi empregada a microtécnica, com incubação a quente nas duas fases da reação e uma dose de cinco unidades hemolíticas 50% de complemento, recomendada por Alton et al. (1988). Com o objetivo de inativar o complemento, os soros eram tratados a 58°C, em banho-maria, durante 30 minutos.

O antígeno foi preparado conforme descrito acima, com a diferença de que era ainda submetido a diálise em tampão fosfato pH 7,3, a fim de evitar a eventual ocorrência de efeito anticomplementar.

Prova de imunodifusão em gel de ágar. Empregou-se a técnica preconizada por Alton et al. (1988), com algumas modificações. Na preparação do gel, utilizou-se ágar Noble (Laboratórios Difco) a 1%, dissolvido em tampão borato e NaCl a 5%, acrescido de azida sódica na proporção final de 1/10.000. A solução do gel era colocada em uma placa de Petri de plástico, na quantidade suficiente para cobrir toda a superfície da mesma. Após o endurecimento do meio, eram feitas as cavidades. Na cavidade

central era colocado o antígeno e em duas das cavidades externas, situadas diametralmente opostas, era colocado o soro controle positivo. Nas outras quatro cavidades eram colocados os soros a serem testados. A incubação ocorria sob temperatura ambiente, em uma câmara úmida, sendo a leitura realizada após 24 e 48 horas de incubação.

Teste imunoenzimático indireto. O teste foi realizado, basicamente, conforme descrito por Jeggo & Rothauer (1989). Utilizou-se um conjugado comercial, constituído por IgG de coelho anti-IgG de ovino, conjugada com peroxidase (Dacopatts, Dinamarca). O substrato utilizado foi o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e como cromógeno utilizou-se a OPD (Ortofenilendiamina, Sigma Chemical Company, USA). Para interromper a reação, após a ação da enzima sobre o substrato, empregou-se ácido cítrico 0,25 N. A leitura da densidade óptica era em um aparelho Titertek Uniskan, em comprimento de onda de 450 nm. Considerava-se como positivo o soro que apresentasse densidade óptica superior a duas vezes a média das densidades ópticas observadas no controle negativo.

Análise estatística. Os resultados das provas sorológicas foram comparados entre si através do teste de X^2 .

RESULTADOS

Dos 850 soros de ovinos examinados, apenas dois apresentaram título, de 1/2, na reação de fixação de complemento, título este muito baixo para que os animais possam ser considerados como infectados por *B. ovis*. Estes dois soros eram oriundos do município de Jaboticabal. Outros sete soros, do município de São Joaquim da Barra, apresentaram atividade anticomplementar, o que impediu a determinação do título sorológico através da fixação de complemento (Quadro 1).

Os dados do Quadro 2 mostram que nove (1,96%) dos ovinos examinados apresentaram resultado positivo no teste imunoenzimático indireto. Estes resultados positivos foram observados nos municípios de Avaré (1), Itai (1), Jaú (1), Lavínia (2) e São Manoel (4).

Nenhum dos 850 ovinos examinados apresentou resultado positivo ao teste de imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico da infecção por *B. ovis* (Quadro 2).

Dos 151 carneiros abrangidos pelo estudo, nenhum apresentou sintomatologia compatível com a enfermidade.

Os nove soros com resultado positivo no teste imunoenzimático apresentaram resultado negativo na fixação de complemento e os dois soros com título 1/2 nesta prova apresentaram resultado negativo no teste imunoenzimático. O teste de X^2 revelou haver independência entre os resultados obtidos através destas duas provas ($X^2 = 0,0202025$, com 1 grau de liberdade).

Os resultados da reação de fixação de complemento foram bastante semelhantes aos da prova de imunodifusão em gel de ágar, principalmente quando se considera que o título de 1/2 observado na fixação de complemento não tem significado. Dessa forma, todos os soros apresentaram resultado negativo em ambos os testes.

Quadro 1. Número de soros de ovinos do Estado de São Paulo, 1993, distribuídos conforme o município de origem e os títulos de anticorpos obtidos contra *Brucella ovis* através da reação de complemento

Município	Nº de animais testados	Título de anticorpos					Ac ^a
		N	1/2	1/4	1/8	1/16	
Avaré	75	75	0	0	0	0	0
Bauru	40	40	0	0	0	0	0
Botucatu	31	31	0	0	0	0	0
Colômbia	32	32	0	0	0	0	0
Dobrada	34	34	0	0	0	0	0
Itaí	57	57	0	0	0	0	0
Jaboticabal	140	138	2	0	0	0	0
Jauú	61	61	0	0	0	0	0
Lavinia	72	72	0	0	0	0	0
Matão	24	24	0	0	0	0	0
Pontal	36	36	0	0	0	0	0
S. Joaquim da Barra	49	42	0	0	0	0	7
São Manoel	125	125	0	0	0	0	0
Serra Azul	61	61	0	0	0	0	0
Severínia	13	13	0	0	0	0	0
Total	850	841	2	0	0	0	7

^aAc = Atividade anticomplementar.

Quadro 2. Número de soros de ovinos do Estado de São Paulo, 1993, distribuídos conforme o município de origem e os resultados do teste imunoenzimático indireto (TIEI) e a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) obtidos contra antígeno de *Brucella ovis*

Município	Nº de soros testados	Nº de soros reagentes	
		TIEI	IDGA
Avaré	75	1	0
Bauru	40	0	0
Botucatu	31	0	0
Colômbia	32	0	0
Dobrada	34	0	0
Itaí	57	1	0
Jaboticabal	140	0	0
Jauú	61	1	0
Lavinia	72	2	0
Matão	24	0	0
Pontal	36	0	0
S. Joaquim da Barra	49	0	0
São Manoel	125	4	0
Serra Azul	61	0	0
Severínia	13	0	0
Total	850	9	0

Ao se comparar o teste imunoenzimático com o teste de imunodifusão, nota-se uma divergência de resultados, pois os nove soros com resultados positivos no primeiro teste apresentaram resultados negativos no segundo.

DISCUSSÃO

Embora o teste imunoenzimático indireto tenha revelado alguns resultados positivos, quando se utiliza a combina-

ção entre os resultados dos três testes sorológicos e a manifestação de sintomatologia por parte dos animais, chega-se à conclusão que nenhum dos animais examinados estava infectado por *B. ovis*. Estes resultados diferem de pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul (Magalhães Neto et al. 1991) e dos dados obtidos em outros países da América Latina, como, por exemplo, no México (Ramos Rodriguez 1986) e no Chile (Tamoyo et al. 1989, Rojas et al. 1990).

Os dados obtidos mostram que a epididimite dos carneiros não é um problema sanitário importante no rebanho do Estado de São Paulo e que, justamente por estar esta exploração em fase de crescimento, é importante que se adotem medidas sanitárias rigorosas, como por exemplo o exame clínico e sorológico de qualquer animal introduzido nos plantéis, de modo a se evitar a introdução e a propagação da enfermidade nos rebanhos ovinos.

No presente trabalho, observou-se que nenhum animal apresentou resultado positivo nas provas de fixação de imunodifusão em gel de ágar, embora nove animais tenham apresentado resultado positivo no teste imunoenzimático. Estes resultados são compatíveis com o fato de o teste imunoenzimático indireto apresentar uma capacidade de detecção superior à reação de fixação de complemento (Rahaley et al. 1983, Spencer & Burgess 1984, Worthington et al. 1984, 1985, Lee et al. 1985, Cho & Niilo 1987, West et al. 1993) e à prova de imunodifusão (Worthington et al. 1984). No entanto, quando se analisa a combinação dos resultados dos diversos testes, além da eventual manifestação de sintomas clínicos e histórico de sintomatologia nos rebanhos estudados, se deduz pela ausência de infecção entre os animais examinados. Obviamente não se pode desprezar a observação feita por vários autores de que os testes sorológicos, principalmente a reação de fixação de complemento quando utilizada na fase crônica, podem ser incapazes de detectar a infecção. Entretanto, contribuiu para que se chegasse à conclusão de que os resultados positivos revelados pelo teste imunoenzimático são, na verdade, resultados falso-positivos, o fato de o teste, da maneira como foi realizado e com o aparelho usado para a leitura da densidade óptica, ter proporcionado resultados irregulares e inconstantes, com vários dos soros aos quais foi atribuído um resultado positivo tendo apresentado densidades ópticas ora pouco abaixo ora pouco acima do limiar de positividade.

Esse desempenho do teste imunoenzimático indireto constituiu-se em um dado surpreendente, pois está em desacordo com a grande maioria dos trabalhos já publicados sobre o assunto, sendo esse teste recomendado por West & Bruce (1991) em adição à reação de fixação de complemento e ao exame clínico nos programas de erradicação da brucelose ovina. Também Walker et al. (1985) haviam observado que o diagnóstico pelo teste imunoenzimático associado à palpação do aparelho genital, com posterior eliminação dos infectados, propiciam bons resultados no controle da enfermidade.

O teste de imunodifusão em gel de ágar também é frequentemente empregado no diagnóstico sorológico da

brucelose causada por *B. ovis*, sendo considerada de mais fácil execução que a reação de fixação de complemento (Myers et al. 1972, Jones et al. 1975). No presente estudo, estes dois testes praticamente apresentaram uma concordância de 100%, embora essa comparação tenha sido prejudicada pela inexistência de animais reagentes.

Dos resultados deste trabalho se observou que a reação de fixação de complemento, em que pesem suas desvantagens, relacionadas principalmente com o fato de ser mais trabalhosa e exigir a disponibilidade constante de reagentes altamente lábeis, foi a prova que apresentou resultados mais regulares e mais constantes, que não deixavam margens de dúvida na interpretação e leitura do resultado final. Deve-se fazer uma ressalva a respeito de não se ter encontrado nenhum reagente, o que não permitiu a avaliação da sensibilidade do teste empregado em nossas condições. Apesar disto, e em conformidade com o procedimento estipulado por autores de países com elevada prevalência de infecção por *B. ovis* (West & Bruere 1983), pode-se recomendar o emprego da reação de fixação de complemento, associada a um rigoroso exame clínico do animal e a uma análise epidemiológica sobre o rebanho, para o diagnóstico sorológico daquela enfermidade.

REFERÊNCIAS

- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 190 p.
- Blobel H., Fernandes J.C.T., Mies Filho A., Ramos A.A. & Trein E.J. 1972. Estudos sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. Pesq. Agropec. Bras. 7:1-4.
- Bundle M.B. & Boyes B.W. 1953. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. Aust. Vet. J. 29:145-159.
- Cho H.J. & Niilo L. 1987. Diagnostic sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Can. J. Vet. Res. 51:99-103.
- Jeggo M.H. & Rothauer D. 1989. Elisa kit for the detection of antibodies against *Brucella abortus*. Atomic Energy Agency, Vienna. 25 p.
- Jones L.M., Dubray G. & Marly J. 1975. Comparison of diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams. Ann. Rech Vét. 6:11-22.
- Lee K., Cargill C. & Atkinson H. 1985. Evaluation of an enzyme linked-immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Aust. Vet. J. 62:91-93.
- Magalhães Neto A., Dacrose O., Cruz F.W., Ferreira J., Martins S.R. & Gil-Turnes C. 1991. Prevalência de brucelose ovina em carneiros de 50 rebanhos do Rio Grande do Sul. 16º Congr. Bras. Microbiologia, Santos, 1991. Revta Microbiol. 22 (Supl.) 1:198. (Resumo)
- Mies Filho, A. 1964. Epididimite ovina no Rio Grande do Sul. Anais III Conf. Soc. Vet. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 29-30.
- Myers D.M., Jones L.M. & Varela-Diaz V.M. 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. Appl. Microbiol. 23:894-902.
- Rahaley R.S., Dennis S.M. & Smeltzer M.S. 1983. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. Vet. Rec. 113:467-470.
- Ramos A.A., Mies Filho A., Schenck J.A.P., Vasconcelos L.D., Prado O.T.G., Fernandes J.C.T. & Blobel H. 1967. Epididymitis in rams. A clinical survey in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Pesq. Agropec. Bras. 1:211-213.
- Ramos Rodriguez H. G. 1986. Determinación de anticuerpos contra *Brucella ovis* en suero de ovinos mediante fijación del complemento y precipitación en ágar. Veterinaria, Mexico, 17:344.
- Rojas X., Alonso O., Rosenfeld C., Uribe C., Fernandes V. & Tadich N. 1990. Brucelosis ovina. Situación actual en explotaciones pequeñas de una comuna del sur de Chile. Arch. Med. Vet. 22:55-63.
- Spencer T.L. & Burgess G.W. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. Res. Vet. Sci. 36:194-198.
- Tamoyo R., Valentin H. & Schoebitz R. 1989. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* en ovinos de la X Región de Chile. Arch. Med. Vet. 21:22-28.
- Walker R.L., Leamaster B.R., Stellflug J.N. & Biberstein E.L. 1985. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep: field trial. Am. J. Vet. Res. 46: 642-646.
- West D.M. & Bruere A.N. 1983. The *Brucella ovis* complement fixation. N. Z. Vet. J. 31:124-126.
- West D.M. & Bruce R.A. 1991. Observations on the eradication of *Brucella ovis* infection from a ram flock. N. Z. Vet. J. 39:29-31.
- West D.M., Stafford K.J., Alley M.R., Badcoe L.M., Hilbink F. & Compton C.W.R. 1993. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. N. Z. Vet. J. 41:82-86.
- Worthington R.W., Weddell W. & Penrose M.E. 1984. A comparison of three serological tests for the diagnosis of *B. ovis* infection in rams. N. Z. Vet. J. 32:58-60.
- Worthington R.W., Stevenson B.J. & Lisle G.W. 1985. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. N. Z. Vet. J. 33:84-86.