

COMPARAÇÃO DE CONJUGADOS NO TESTE IMUNOENZIMÁTICO COMPETITIVO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA¹

LUIS A. MATHIAS² e ALLASTAIR P. MACMILLAN³

ABSTRACT.- Mathias L.A., & MacMillan A.P. 1995. [**Comparison of conjugates in the competitive enzyme immunoassay for the serological diagnostic of bovine brucellosis.**] Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 15(4):101-105. Depto Med. Preventiva, FCAVJ-Unesp, Jaboticabal, SP 14870-000, Brazil.

The purpose of this study was to evaluate the competitive enzyme immunoassay used for the serological diagnosis of bovine brucellosis, comparing the results obtained using a conjugate prepared with monoclonal antibody and a conjugate prepared with policlonal sera. The results were also compared with those obtained by a microtechnique of complement fixation. Two hundred and seventy-three sera from herds with a history of brucellosis, 205 sera from herds free of brucellosis and without vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and 122 sera from herds without history of infection or vaccination were tested. Among sera from infected herds, the complement fixation test revealed antibody titres in 28.51%, the enzyme immunoassay using monoclonal conjugate in 39.19% and the enzyme immunoassay using policlonal conjugate revealed antibody titres in 37.0% of the sera. The agreement between complement fixation and the enzyme immunoassay using policlonal conjugate was 94.38% and the agreement between both of the enzyme immunoassays was 97.89%. Among the sera from vaccinated herds, the agreement between the complement fixation test and the enzyme immunoassay using policlonal conjugate was 69.39%, and the agreement between the enzyme immunoassays was 90.73%. The complement fixation test did not reveal any antibody titre in 67.86% of the sera from vaccinated herds, the enzyme immunoassay using policlonal conjugate did not reveal titres in 51.22% and the enzyme immunoassay with monoclonal conjugate did not reveal antibody titres in 41.95% of the sera from vaccinated herds. All the 122 sera from herds without infection or vaccination were negative to the three serological tests.

INDEX TERMS: Bovine brucellosis, serological diagnosis, competitive enzyme immunoassay.

SINOPSE.- O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento do teste imunoenzimático competitivo quando aplicado ao diagnóstico sorológico da brucelose bovina, comparando-se o desempenho do teste ao usar um conjugado preparado com anticorpos monoclonais e um conjugado preparado com soro policlonal. Os resultados foram também comparados com aqueles obtidos através de uma microtécnica de fixação de complemento. Foram examinados 273 soros provenientes de rebanhos com histórico de brucelose, 205 soros provenientes de rebanhos sem problemas de infecção e que adotam a vacinação das bezerras com *Brucella abortus* amostra B 19 e 122 soros de bovinos procedentes de rebanhos sem histórico de brucelose e que não adotam a vacinação. Nos soros de rebanhos com histórico de

infecção, a reação de fixação de complemento revelou títulos de anticorpos em 28, 51%, o teste imunoenzimático com o conjugado monoclonal revelou títulos em 39,19% e o teste imunoenzimático com o conjugado policlonal revelou títulos em 37,0% dos soros examinados, observando-se uma concordância de 94,38% entre a fixação de complemento e o teste imunoenzimático usando o conjugado policlonal e de 97,89% entre os dois testes imunoenzimáticos. Nos soros de rebanhos vacinados, a concordância entre a fixação de complemento e o teste imunoenzimático com o conjugado policlonal foi de 69,39%, enquanto que a concordância entre os testes imunoenzimáticos foi de 90,73%. Neste caso, a reação de fixação de complemento não revelou qualquer título em 67,86% dos soros examinados, o teste com o conjugado policlonal não revelou títulos em 51,22% dos soros, ao passo que o teste com o conjugado monoclonal não revelou título em 41,95% dos soros. Os 122 soros de rebanhos sem histórico de infecção e vacinação apresentaram resultados negativos nos três testes realizados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose bovina, diagnóstico sorológico, teste imunoenzimático competitivo.

¹Aceito para publicação em 24 de julho de 1995.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal, Rodovia Carlos Tonanni Km 5, Jaboticabal, SP 14870-000.

³Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey KT15 3NB, United Kingdom.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma enfermidade cujas conseqüências econômicas para a produção pecuária, além dos reflexos na área de saúde pública, tem motivado, na grande maioria dos países, a adoção de medidas destinadas a sua erradicação ou, pelo menos, a diminuição de suas taxas de ocorrência. Um dos pilares nos quais se baseiam estas campanhas sanitárias consiste na disponibilidade de métodos de diagnóstico que sejam ao mesmo tempo confiáveis e de execução relativamente simples, além de outras características importantes, como, por exemplo, os recursos necessários para sua realização.

Esta importância do diagnóstico para o êxito das campanhas de combate à brucelose tem incentivado o desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas sorológicas voltadas para aquele objetivo. Uma das provas classicamente empregadas no diagnóstico sorológico da brucelose é a reação de fixação de complemento, cujo valor como instrumento de auxílio para a execução de programas de controle de brucelose tem sido comprovado em vários países. Um dos problemas que se observam com o emprego da reação de fixação de complemento é a diversidade de técnicas utilizadas nos diferentes países, o que dificulta a padronização do teste e a comparação entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios. Mais recentemente, difundiu-se bastante o uso de microtécnicas, que apresentam a vantagem de tornar a prova mais rápida e mais econômica.

Os testes imunoenzimáticos, por sua elevada capacidade de detecção e execução relativamente fácil, surgiram como provas potencialmente capazes de assumir posição de destaque como ferramentas de apoio às medidas de defesa sanitária. Com o avanço tecnológico, foi possível a preparação de anticorpos monoclonais contra *Brucella*, que tem sido usados no teste imunoenzimático competitivo. Esta prova, quando empregada no diagnóstico sorológico da brucelose, apresenta boa sensibilidade e boa especificidade (Mathias et al. 1993). Entretanto, a utilização de anticorpos monoclonais pode ser um fator limitante para o emprego dessa técnica por parte de laboratórios que não disponham de recursos para a obtenção dos mesmos. Por isso, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o comportamento do teste imunoenzimático competitivo usando conjugado preparado com soro policlonal, quando aplicado ao diagnóstico sorológico da brucelose bovina, comparando-se seus resultados com aqueles obtidos através do mesmo teste usando conjugado preparado com anticorpos monoclonais e com aqueles obtidos através da reação de fixação de complemento.

MATERIAL E MÉTODOS

Soro

Foram examinados 273 soros de bovinos provenientes de rebanhos com histórico de ocorrência de brucelose, 205 soros provenientes de rebanhos sem problema de infecção e que adotam a vacinação das bezerras com *B. abortus* amostra B 19 e 122

soros de bovinos procedentes de rebanhos sem histórico de brucelose e que não adotam a vacinação.

Reação de fixação de complemento

Foi empregada a microtécnica recomendada por Alton et al. (1988). O complemento consistiu de soro de cobaia, sendo empregadas 5 unidades hemolíticas 50%. Como antígeno, utilizou-se uma suspensão de célula total de *B. abortus* amostra 1119/3. Este antígeno foi produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Todos os reagentes utilizados foram padronizados de acordo com a técnica acima citada.

Teste imunoenzimático competitivo

O teste foi realizado conforme descrito por MacMillan et al. (1990). Foram empregadas microplacas de poliestireno, de fundo em "U" (Nunc, Dinamarca). Como antígeno, foi empregado LPS (lipopolysaccharide) de *B. abortus* amostra 99, produzido de acordo com o método descrito por Baker & Wilson (1965). O cromógeno utilizado foi a OPD (O-phenylenediamine) e como substrato utilizou-se o período de hidrogênio.

Conjugados

Anticorpos monoclonais secretados pelo clone de hibridomas BM-40, preparado por Greiser-Wilker et al. (1985), conjugados com peroxidase, foram utilizados como conjugado.

Também foi empregado um conjugado preparado com soro de um bovino com título elevado de anticorpos contra *Brucella*. Após precipitação com sulfato de amônio, esse soro foi conjugado com peroxidase.

Para a preparação do conjugado, utilizou-se a técnica descrita por Wilson & Nakane (1978).

Análise estatística

Para verificar se houve independência entre os resultados das provas sorológicas, utilizou-se o teste de χ^2 . Foram considerados como positivos os soros que apresentavam títulos de anticorpos maiores ou iguais a 1:4.

Concordância

A concordância entre os testes foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Soros positivos + negativos, em ambos os testes}}{\text{Total de soros testados}} \times 100$$

RESULTADOS

Rebanhos com histórico de brucelose

O Quadro 1 apresenta os resultados revelados pelo teste imunoenzimático competitivo empregando o conjugado preparado com soro policlonal, em comparação com os resultados revelados pela reação de fixação de complemento, em soros de animais provenientes de rebanhos com histórico de brucelose. Observa-se que o primeiro teste revelou títulos de anticorpos maiores ou iguais a 1/4 em 82 (32,93%) dos soros, enquanto que o segundo teste revelou os mesmos títulos em 71 (28,51%). Constata-se, por-

Quadro 1. Número de soros de bovinos procedentes de rebanhos com histórico de brucelose, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos contra *Brucella*, revelados pela reação de fixação de complemento (RFC) e pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) empregando conjugado preparado com soro policlonal

RFC	TIEC								Total
	N	4	8	16	32	64	128	>256	
N	165	5	-	2	-	-	-	-	172
2	1	4	1	-	-	-	-	-	6
4	1	2	2	-	-	-	-	-	5
8	-	4	2	-	-	-	-	-	6
16	-	1	2	4	1	-	-	-	8
32	-	-	1	3	4	-	-	-	8
64	-	-	-	-	3	5	-	-	8
128	-	-	-	-	2	1	9	2	14
>256	-	-	-	-	-	1	11	10	22
Total	167	16	8	9	10	7	20	12	249

N = nenhum título.

$$\text{Concordância} = \frac{70 + 165}{249} \times 100 = 94,38\%$$

tanto, que o teste imunoenzimático apresentou capacidade de detecção ligeiramente superior à reação de fixação de complemento, nessas circunstâncias, embora, para a grande maioria dos soros, os resultados revelados pelas duas provas não tenham apresentado muitas discrepâncias, resultando em uma concordância de 94,38% entre as duas provas. O teste de X^2 revelou, com segurança de 99,5%, dependência entre os resultados revelados pelas duas provas ($X^2 = 193,88$, com 1 grau de liberdade).

A comparação entre os resultados revelados pelo teste imunoenzimático usando o conjugado preparado com soro policlonal e os resultados obtidos empregando-se o conjugado preparado com os anticorpos monoclonais BM-40 encontra-se no Quadro 2. Neste caso, observa-se um concordância ainda maior, de 97,80%. O teste com o conjugado policlonal revelou títulos de anticorpos em 101 (37,00%) soros, enquanto que o teste com o conjugado monoclonal revelou títulos de anticorpos em 107 (39,19%) dos 273 soros examinados. É interessante observar que todos os soros negativos com o conjugado monoclonal também apresentaram resultado negativo com o conjugado policlonal, enquanto que de 172 soros negativos com o conjugado policlonal, 6 apresentaram títulos, de 1/4, ao serem testados com o conjugado monoclonal. Para a grande maioria dos soros, os títulos obtidos com os dois conjugados foram os mesmos ou então apresentaram diferença de apenas uma diluição (Quadro 2). O teste de X^2 também revelou dependência significativa entre os resultados dessas duas provas ($X^2 = 248,67$, com 1 GL).

Rebanhos vacinados com *B. abortus* amostra B 19

Quando empregado em bovinos procedentes de rebanhos que adotam a vacinação contra brucelose com

Quadro 2. Número de soros de bovinos procedentes de rebanhos com histórico de brucelose, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos contra *Brucella*, revelados pelo teste de imunoenzimático competitivo (TIEC) empregando o conjugado BM-40 e pelo mesmo teste empregado conjugando preparado com soro policlonal

TIEC BM-40	TIEC (Poli)								Total
	N	4	8	16	32	64	128	>256	
N	166	-	-	-	-	-	-	-	166
4	6	11	-	-	-	-	-	-	17
8	-	6	3	3	-	-	-	-	12
16	-	2	5	2	-	-	-	-	9
32	-	-	1	5	2	-	-	-	8
64	-	-	-	-	8	3	1	-	12
128	-	-	-	-	1	10	10	1	22
>256	-	-	-	-	1	-	12	14	27
Total	172	19	9	10	12	13	23	15	273

N = nenhum título.

$$\text{Concordância} = \frac{101 + 166}{273} \times 100 = 97,89\%$$

B. abortus amostra B 19, o teste imunoenzimático competitivo usando o conjugado policlonal não revelou título de anticorpos em 101 (51,53%) de 196 soros, enquanto que a reação de fixação de complemento não revelou título em 133 (67,86%) desses soros. Dos 133 soros negativos pela reação de fixação de complemento, 41 apresentaram algum título no teste imunoenzimático, enquanto que dos 101 soros negativos pelo teste imunoenzimático apenas 9 apresentaram algum título pela reação de fixação de complemento (Quadro 3). A concordância entre os dois testes, nesse caso, foi de 69,39% e o teste de X^2 revelou, com 99,5% de confiança, haver dependência entre os resultados das duas provas ($X^2 = 44,67$, com 1 GL).

O Quadro 4 mostra que a concordância entre o teste imunoenzimático ao se usar cada um dos dois conjugados, de 90,73%, foi maior que a observada ao se comparar o teste imunoenzimático com a reação de fixação de complemento. O teste imunoenzimático com o conjugado policlonal não revelou títulos de anticorpos em 105 (51,22%) de 205 soros, ao passo que o teste com o conjugado BM-40 não revelou títulos de anticorpos em 86 (41,95%) dos 205 soros. Nenhum dos 86 soros negativos com o conjugado BM-40 apresentou títulos com o conjugado policlonal, enquanto que dos 105 soros negativos com este conjugado, 19 apresentaram títulos com o conjugado BM-40, embora esses títulos não tenham ultrapassado 1/4. O teste de X^2 revelou dependência entre os resultados das duas provas ($X^2 = 141,09$, com 1 GL).

Rebanhos com histórico de infecção e de vacinação

Os 122 soros testados apresentaram resultados nos três testes realizados, o que significa uma concordância de 100% entre os testes.

Quadro 3. Número de soros de bovinos procedentes de rebanhos vacinados com *Brucella abortus* amostra B 19, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos contra *Brucella*, revelados pela reação de fixação de complemento (RFC) e pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) empregando conjugado preparado com soro policlonal

RFC	TIEC (Poli)				Total
	N	4	8	16	
N	92	40	1	-	133
2	4	10	-	-	14
4	5	21	1	-	27
8	-	9	8	-	17
16	-	2	1	-	3
32	-	-	1	1	2
Total	101	82	12	1	196

N = nenhum título.

$$\text{Concordância} = \frac{44 + 92}{196} \times 100 = 69,39\%$$

Quadro 4. Número de soros de bovinos procedentes de rebanhos vacinados com amostra B 19, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos contra *Brucella*, revelados pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) empregando o conjugado BM-40 e pelo mesmo teste empregando conjugado preparado com soro policlonal

TIEC BM-40	TIEC (Poli)				Total
	N	4	8	16	
N	86	-	-	-	86
4	19	79	-	-	98
8	-	8	12	-	20
16	-	-	-	1	1
Total	105	87	12	1	205

N = nenhum título.

$$\text{Concordância} = \frac{100 + 86}{205} \times 100 = 90,73\%$$

DISCUSSÃO

Ao se compararem os resultados revelados pelo teste imunoenzimático competitivo empregando o conjunto preparado com soro policlonal com os resultados revelados pela reação de fixação de complemento em soros de animais provenientes de rebanhos com histórico de brucelose (Quadro 1), observa-se que o teste enzimático detectou títulos de anticorpos em 32,93% dos soros, enquanto que a reação de fixação de complemento detectou anticorpos em 28,51%, demonstrando que o teste imunoenzimático apresentou capacidade de detecção ligeiramente superior. A maior capacidade de detecção desse teste permitiu que sete soros negativos pela reação de fixação de comple-

mento apresentassem algum título ao teste imunoenzimático, apesar de que dois soros negativos nesse teste apresentaram títulos na reação de fixação de complemento. Essa maior capacidade de detecção do teste imunoenzimático competitivo em relação à fixação de complemento também foi observada por Mathias (1991) ao utilizar no teste imunoenzimático um conjugado preparado com os anticorpos monoclonais BM-40. Outros autores observaram menor sensibilidade para o teste imunoenzimático competitivo quando comparado com a fixação de complemento (Rylatt et al. 1985, Yong & Edwards 1989), enquanto Sutherland & Den Hollander (1986) verificaram que os resultados apresentados por esses dois testes foram semelhantes. A razão para esta disparidade observada entre os diversos trabalhos publicados estaria relacionada, além das diferenças entre as populações animais estudadas, principalmente com as características dos anticorpos monoclonais empregados na preparação do conjugado.

Quando se comparam os resultados revelados pelo teste imunoenzimático competitivo usando cada um dos dois conjugados (Quadro 2), observa-se que a concordância, de 97,89%, foi maior que a observada entre o teste competitivo com o conjugado policlonal e a reação de fixação de complemento. Observa-se também que o teste com o conjugado BM-40 apresentou capacidade de detecção ligeiramente maior, 39,19%, que a apresentada pelo teste imunoenzimático com o conjugado policlonal. Essa maior capacidade de detecção permitiu que o teste com o conjugado BM-40 revelasse a presença de títulos de anticorpos, embora baixos, em seis soros que haviam apresentado resultados negativos com o conjugado policlonal. Um aspecto que merece ser destacado ao se fazer essa comparação é que 77,29% dos soros apresentaram exatamente os mesmos títulos em ambos os testes, além do que a maioria dos demais apresentou diferença de apenas uma diluição entre os dois títulos, o que se refletiu na concordância relativamente alta observada entre os dois testes.

Ao serem testados soros procedentes de rebanhos que empregavam a vacinação com *B. abortus* amostra B 19, o teste imunoenzimático competitivo também apresentou maior capacidade de detecção do que a reação de fixação de complemento. Em consequência disto, aquele teste apresentou menor poder de discriminação que a fixação de complemento, uma vez que acusou maior proporção de reagentes entre os animais vacinados, o que por sua vez implicaria em menor especificidade do teste imunoenzimático. Nesta situação, foi observada a menor concordância entre todas as comparações efetuadas no presente trabalho (69,39%) (Quadro 3). Esta menor especificidade do teste imunoenzimático competitivo em relação à fixação de complemento está em desacordo com os resultados obtidos por Mathias et al. (1994), que observaram maior poder de discriminação de títulos de anticorpos resultantes da vacinação, por parte do teste imunoenzimático competitivo usando o conjugado BM-40, embora, ao usar conjugado preparado com outros anticorpos mono-

clonais, tenha observado menor poder de discriminação do teste imunoenzimático. Já Sutherland (1985) verificou que o teste competitivo apresentou o mesmo desempenho que a fixação de complemento, ao serem testados soros de animais vacinados, tendo esse autor concluído que o teste imunoenzimático competitivo apresenta as mesmas falhas que as outras provas sorológicas, ao serem utilizados no diagnóstico da brucelose em bovinos vacinados com a amostra B 19. Essas discrepâncias entre os achados dos diversos autores estão, provavelmente, associadas às diferenças nas características dos anticorpos usados na preparação do conjugado.

A concordância entre os testes imunoenzimáticos usando cada um dos dois conjugados, quando se testaram soros de animais procedentes de rebanhos vacinados, foi de 90,73% (Quadro 4), superior portanto à observada entre o teste competitivo com o conjugado policlonal e a reação de fixação de complemento.

Os testes realizados em rebanhos sem histórico de brucelose foram todos negativos. No entanto, é necessário considerar que o número de animais testados é relativamente pequeno, número este que está associado à dificuldade em se encontrar rebanhos que não adotam a vacinação e que ao mesmo tempo estejam livres da enfermidade.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o teste imunoenzimático competitivo usando o conjugado preparado com soro policlonal apresentou capacidade de detecção comparável à da reação de fixação de complemento e à do teste imunoenzimático usando o conjugado preparado com os anticorpos monoclonais BM-40. Por isto, poderia se constituir em uma alternativa para ser usado como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina, principalmente se associado a outros testes, em laboratórios que não possam dispor de um conjugado preparado com anticorpos monoclonais que tenham sido devidamente avaliados para aquela finalidade.

REFERÊNCIAS

- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 190p.
- Baker P.J. & Wilson J.B. 1965. Hypoferremia in mice and its application to the bioassay of endotoxin. J. Bacteriol. 90 (1): 903-910.
- Greiser-Wilke I., Moennig V., Thon D. & Rauter K. 1985. Characterization of monoclonal antibodies against *Brucella melitensis*. Zbl. Vet. Med. B 32: 616-627.
- MacMillan A.P., Greiser-Wilke I., Moennig V. & Mathias L.A. 1990. A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 97: 83-85.
- Mathias L.A., MacMillan A.P., Greiser-Wilke I. & Moennig V. 1994. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo na diferenciação de anticorpos induzidos pela vacina B 19, no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Pesq. Vet. Bras. 14(1): 19-23.
- Mathias L.A. 1991. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Tese de Livre-Docência, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal, São Paulo. 152p.
- Mathias L.A., MacMillan A.P., Greiser-Wilke I. & Moennig V. 1993. Sensitivity and specificity of a competitive enzyme immunoassay in the serodiagnosis of bovine brucellosis. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 30: 205-209.
- Rylatt D.B., Wyatt D.M. & Bundesen P.G. 1985. A competitive enzyme immunoassay for the detection of bovine antibodies to *Brucella abortus* using monoclonal antibodies. Vet. Immunol. Immunopathol. 8: 261-71.
- Sutherland S. 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Brucella abortus* in cattle using monoclonal antibodies. Aust. Vet. J. 62(8): 264-268.
- Sutherland S.S. & Den Hollander I. 1986. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies and a complement fixation test for cattle vaccinated and infected with *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 12: 55-64.
- Wilson M.B. & Nakane P.K. 1978. Immunochemical Techniques, p. 215-224. In: Knapp W., Holubar H. & Wick G. (ed.) Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Elsevier, Amsterdam.
- Yong W.K. & Edwards L.D. 1989. Evaluation of three LPS-specific monoclonal antibodies for the immunodiagnosis of bovine brucellosis. Res. Vet. Sci. 46: 413-415.