

**RENATA RIBAS ZACARIAS**

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ELISA (ENZYME LINKED  
IMMUNOSORBENT ASSAY) E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE  
IMUNODIFUSÃO DUPLA EM ÁGAR-GEL PARA O DIAGNÓSTICO DE  
BRUCELOSE CANINA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Paraná  
para obtenção do grau de Bacharel.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Ida Cristina Gubert

Co-orientadores: Dr. Carlos Chávez Olórtegui

Dr. Jorge Victor B. Agottani

**CURITIBA  
JANEIRO-2000**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó Beatriz de Quadros Ribas, a minha mãe Sônia Maria de Quadros Ribas , e em especial a minha irmã, amiga e companheira, Fernanda Ribas Zacarias.

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Dr. Jorge Victor Bacilla Agottani e Dr. Carlos Chávez Olortegui pela amizade e co-orientação deste trabalho.**

**Ao Prof.º Juarez Gabardo pela orientação na parte estatística.**

**Ao Profº Edison Luís Prisco Farias pelas fotos.**

**Aos técnicos em computação, Paulo Henrique Zaramela e Acyr Tedeschi, pela colaboração e carinho que sempre tiveram comigo.**

**Em especial a minha orientadora, Prof.ª Ida Cristina Gubert, pela amizade, compreensão e dedicação durante todo o período em que trabalhamos juntas.**

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Histórico.....	1
1.2 Etiologia.....	2
1.3 Transmissão.....	3
1.4 Patologia.....	3
1.5 Sintomatologia.....	4
1.6 Epidemiologia/Prevalência.....	5
1.7 Profilaxia.....	6
1.8 Tratamento.....	6
1.9 Diagnóstico.....	7
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
4.1 Preparação do antígeno.....	9
4.1.1 Preparo do inóculo.....	9
4.1.2 Inoculação de meio de cultura no fermentador.....	10
4.1.3 Colheita.....	11
4.1.4 Centrifugação.....	11
4.2 Método de imunodifusão dupla em ágar-gel.....	12
4.2.1 Preparação da placa para imunodifusão.....	12
4.2.2 O teste.....	13
4.2.3 Leitura do teste.....	14
4.2.4 Interpretação do teste.....	14
4.3 Método de ELISA indireto.....	15
4.3.1 IgGs anti-cão conjugadas a Peroxidase.....	16
4.3.2 Determinação da concentração de proteínas.....	16
4.3.3 Preparação dos reagentes para ELISA.....	16

4.3.4	ELISA indireto para detectar anticorpos anti- <i>B.canis</i> .....	18
4.3.5	Cálculo do <i>cut off</i> .....	19
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
5.1	Reatividade dos soros amostrais.....	20
5.2	Cálculo da sensibilidade.....	22
5.3	Cálculo da especificidade.....	23
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>26</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A história da brucelose é marcada por três etapas. A primeira, desde Hipócrates, que distinguia os diferentes tipos febris em certas febres prolongadas, irregulares, acompanhadas de suores profusos e outros sintomas, alguns perfeitamente enquadráveis como brucelose (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

Dalton conta que Hipócrates referiu-se à existência, no verão e no outono, de febres do tipo contínuo, mas não violentas, acometendo pessoas que ficavam indispostas durante muito tempo, porém não gravemente doentes, embora as recaídas fossem freqüentes. Convém salientar que a brucelose é mais freqüente no verão, conforme mostram estudos epidemiológicos (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

Durante a Guerra da Criméia, em 1854, apareceram diversos casos da doença que acabaram por chamar a atenção de muitos clínicos. Nessa época, vários médicos publicaram observações sobre brucelose, concedendo-lhe diversas denominações (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

Na época, várias hipóteses foram levantadas sobre a etiologia da doença, até que esta começou a castigar demais a população civil na base naval inglesa de Malta. Então, em 1886 iniciou-se a segunda etapa, com Sir David Bruce, que isolou do baço de soldados mortos com a febre, uma bactéria, a qual denominou de *Micrococcus melitensis* e a doença de "febre de Malta". Posteriormente, a transmissão na ilha de Malta foi associada à ingestão de leite de cabras (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

Dez anos depois (1897), Bang, veterinário dinamarquês e Stribolt isolaram, em abortos de vacas, uma bactéria considerada o agente causador de aborto infeccioso bovino (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

Apenas em 1918, Alice Evans, notável bacteriologista americana, demonstrou a estreita relação entre os microorganismos isolados por Sir David Bruce e por Bang,

dando início à terceira etapa da história da brucelose (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

Em 1920, Meyer & Shaw, propuseram reunir o agente causador da “febre de Malta”, do aborto infeccioso bovino e do aborto porcino (o qual também já havia sido descrito na época) , em um único gênero, sob o nome de *Brucella*, em homenagem a Sir David Bruce. A proposição foi logo aceita e o termo se generalizou para designar a doença em humanos e animais (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

## 1.2 Etiologia

A brucelose é uma doença endêmica e séria em muitas partes do mundo, causada por bactérias do gênero *Brucella* e com 6 espécies atualmente reconhecidas, sendo todas igualmente patogênicas: *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae* (CARTER, 1988), cujos reservatórios naturais são, respectivamente, bovinos, caprinos, suínos, ovinos, cães e ratos selvagens.

Este gênero é constituído por cocobacilos pequenos (cerca de 0,4 por 0,6  $\mu\text{m}$ ), imóveis, não esporulados, gram-negativos, aeróbios e parasitas intracelulares facultativos com predileção pelo sistema retículo endotelial, além do trato reprodutivo e outros órgãos como fígado, baço e medula óssea (CARTER, 1988 e PELCZAR, REID & CHAN, 1980).

A bactéria *Brucella canis* foi identificada pela primeira vez, por Carmichael em 1966, como agente etiológico de aborto infeccioso em cães da raça *Beagle* (FLORES DE CASTRO & CARMICHAEL, 1980 e MARCH, 1998). Além da infecção por *Brucella canis*, os cães também podem contaminar-se esporadicamente com *B.abortus* e *B.suis*, pois animais que habitualmente albergam uma determinada espécie de brucelã podem se infectar por outra (CARTER, 1988).

### 1.3 Transmissão

A brucelose canina é facilmente transmitida mediante o contato íntimo entre os animais (PICKERILL & CARMICHAEL, 1972) através do leite, colostro, descargas vaginais, fetos abortados, placenta, sêmen, urina, além da transmissão por aerossóis.

Entre os cães, as fêmeas podem se infectar, durante o acasalamento, com o sêmen de machos infectados ou então através do contato com a urina contaminada de outros animais. Os filhotes podem contrair a doença por transmissão congênita, ou ainda, através do colostro e do leite. Machos adultos são menos susceptíveis à doença, mas podem se infectar ao entrarem em contato com secreções vaginais de fêmeas contaminadas, ou urina de ambos os sexos.

A inexistência de uma vacina, bem como os padrões de viagens adotados por alguns proprietários de canis, que comumente enviam seus animais a quilômetros de distância para obter o cruzamento desejado, são outros fatores que podem contribuir para a disseminação da doença entre os cães (MOORE & GUPTA, 1970).

Fazendeiros, veterinários, criadores e outros, que mantêm contato com animais domésticos formam um grupo de risco ocupacional, e podem se infectar por contato direto ou indireto com gotículas de material contaminado (STANIER, DOUDORF & ADELBERG, 1969 e CARTER, 1988).

### 1.4 Patologia

As brucelas são parasitas intracelulares do sistema retículo-endotelial (ou fagocítico-mononuclear). Ao atingirem, através das vias linfáticas, o linfonodo mais próximo da porta de entrada, as bactérias são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos, podendo ser destruídas. As que sobrevivem, entretanto, multiplicam-se no interior destas células, provocam bacteremia e em seguida localizam-se nas células do sistema fagocítico-mononuclear dos nódulos linfáticos, baço, fígado, medula óssea e de outros órgãos. Em certas ocasiões estes focos granulomatosos ou nódulos podem

formar abscessos. A hipersensibilidade a elementos dos microorganismos brucela, incluindo endotoxinas, pode participar da patogênese (CARTER, 1988; STANIER, DOUDORF & ADELBERG, 1969 e CASTRO, 1991)

### **1.5 Sintomatologia**

As manifestações mais freqüentes da doença nas fêmeas são o insucesso reprodutivo e o aborto entre o 45º e 55º dias de gestação; seguindo-se ao aborto há um corrimento marrom-amarelado a marrom-escuro que persiste por uma a seis semanas. Outro possível resultado da infecção da cadela é a reabsorção dos fetos ou o nascimento de proles de baixo peso com morte prematura. É interessante notar que as brucelas multiplicam-se intensamente no útero de animais domésticos prenhes, porque o eritritol do feto e da placenta estimula a proliferação local das mesmas (CARTER, 1988; VARGAS, LAZZARI & DUTRA, 1996; CASTRO, 1991 e FLORES DE CASTRO & CARMICHAEL, 1980)

Prostatite, epididimite e orquite podem levar à atrofia testicular em machos com espermatogênese diminuída ou até mesmo esterilidade irreversível (CARTER, 1988 e CORNELL RESEARCH LABORATORY FOR DISEASES, 1976). Também pode ocorrer a formação de uma dermatite escrotal secundária resultante da lambedura do animal sobre a pele dolorosa com epididimite e orquite (MULLER, KIRK & SCOTT, 1985).

Outros sintomas comuns são fraqueza, fadiga, linfadenopatia generalizada, dores musculares e articulares, além de infecções ósseas que podem levar a osteomielites e espondilites (CARTER, 1988 e CORNELL RESEARCH LABORATORY FOR DISEASES, 1976).

Ao estágio agudo, que pode durar semanas ou meses segue-se, freqüentemente, um estágio crônico de longa duração, caracterizado por sinais do mesmo tipo, porém atenuados, provavelmente decorrentes da hipersensibilidade (STANIER, DORDORF & ADELBERG, 1969).

A infecção por *Brucella spp.* no homem caracteriza-se comumente por uma doença febril aguda, que cura em duas ou quatro semanas, ou uma doença de curso prolongado com surtos febris, mal-estar geral, forte dor de cabeça, dores musculares e esplenomegalia discreta (TRABULSI, 1991 e STANIER, DOUDORFF & ADELBERG, 1969). Neste caso, a maioria dos pacientes se recupera em um ou dois anos, mesmo sem tratamento (CARTER, 1988).

## 1.6 Epidemiologia/ Prevalência

Sendo a brucelose uma zoonose, sua epidemiologia está intimamente relacionada à infecção animal, ou seja a disseminação da doença pode se dar pelo contato entre os animais; e este contato pode ser direto ou não, como por exemplo através da ingestão de alimentos contaminados, como leite ou carne.

As brucelas podem sobreviver no solo por 40 a 60 dias, no leite a 10°C por 10 dias, e em certos queijos por até 2 meses (CASTRO, 1991).

A infecção por *Brucella canis* tem sido encontrada em vários países. A prevalência é variável segundo a região e o método diagnóstico empregado (ACHA & SZYFRES, 1989). Alguns levantamentos sorológicos revelaram percentuais de 1 a 6% nos Estados Unidos, 25% no Peru (GREENE & GEORGE, 1984), e 11,8% em cães de rua no México (FLORES DE CASTRO *et al.*, 1977). No Brasil, na região de Campinas, GERMANO *et al.* (1987) detectou 5,4% de cães infectados, na região metropolitana de Salvador foi detectado um índice de apenas 0,22% de soropositividade (PEREIRA, DA-SILVA & DA-ROCHA, 1976) e nos estados do Paraná e Minas Gerais foi verificada uma incidência de 16% de cães soropositivos (ZACARIAS *et al.*, 1999).

## 1.7 Profilaxia

Algumas medidas são fundamentais para se evitar a disseminação da brucelose entre a população humana, como: evitar a ingestão de alimentos crus de origem animal, adotar as medidas higiênicas comuns na profilaxia de qualquer doença contagiosa e orientar os indivíduos que constituem grupo de risco ocupacional sobre cuidados básicos que se deve ter durante o manuseio de animais ou seus produtos, como por exemplo o uso de luvas e máscaras (PACHECO & THIAGO DE MELLO, 1956).

Em rebanhos de interesse econômico a brucelose é controlada e, em alguns países até erradicada, através da imunização das fêmeas com uma vacina atenuada; todavia para *Brucella canis* ainda não existe uma vacina disponível (WILFERT, 1976; ERASMUS & ERASMUS, 1987 e ALTON *et al.*, 1980). Este fato reforça a necessidade da adoção de medidas sanitárias adequadas nos locais de criação dos animais.

## 1.8 Tratamento

O tratamento da brucelose canina é dispendioso, prolongado e o sucesso da terapia é incerto (AMARAL, 1999). Diversos protocolos à base de antibióticos têm sido utilizados, mas a localização intracelular das bactérias dificulta a resolução da infecção (STANIER, DOUDORF & ADELBERG, 1969 e AMARAL, 1999).

Embora o microorganismo demonstre sensibilidade *in vitro* às tetraciclinas, estreptomicina, ampicilina e sulfonamidas, as recidivas são comuns quando uma droga específica é usada individualmente por um período de tempo. A taxa mais elevada de sucesso foi obtida com minociclina oral combinada à estreptomicina parenteral (MULLER, KIRK & SCOTT, 1985).

Como o tratamento nem sempre é eficiente, os cães acometidos devem ser removidos de programas de criação e castrados, isolados ou sacrificados. Apenas cães livres de brucelose devem ser admitidos nos canis de criação.

## 1.9 Diagnóstico

O diagnóstico da brucelose pode ser microbiológico ou sorológico. Em razão das dificuldades de aplicação dos métodos bacteriológicos e pelo fato de as brucelas não serem isoladas nos períodos afebris e, às vezes, nem mesmo nos períodos febris, inúmeros foram os métodos sorológicos desenvolvidos objetivando buscar a demonstração de anticorpos no soro sanguíneo e lácteo, no leite, plasma seminal e muco vaginal.

O método pioneiro de soroaglutinação tornou-se o padrão para o diagnóstico da brucelose mas outros mais se seguiram como fixação do complemento, soroaglutinação rápida em lâmina, aglutinação em tubos com 2-mercaptoetanol (2-ME), Coombs indireto e soroaglutinação em placas (CASTRO, 1991; BADAHSH, CARMICHAEL & DOUGLAS, 1982; CARMICHAEL & JOUBERT, 1987 e YOUNG, 1991).

No entanto, todos eles apresentam aplicação limitada, seja pela impossibilidade de utilização a campo, por problemas de reação cruzada com outros microorganismos, pela impossibilidade de detectar baixos títulos de anticorpos em animais cronicamente infectados, ou ainda por não permitirem identificar animais doentes antes de seis semanas de infecção (BADAHSH, CARMICHAEL & DOUGLAS, 1982; CARMICHAEL & JOUBERT, 1987; YOUNG, 1991 e GEORGE & CARMICHAEL, 1978).

Assim, o diagnóstico definitivo de brucelose baseia-se no teste de aglutinação e no isolamento e cultivo do microorganismo a partir de material infectado (GEORGE & CARMICHAEL, 1978). Uma reação de aglutinação positiva, mais o teste de mercaptoetanol indica infecção. A aglutinação em lâmina é confiável quando negativa, mas as amostras positivas devem ser confirmadas pelo teste em tubos (CARTER, 1988 e CASTRO, 1991).

## 2. JUSTIFICATIVA

Dadas as dificuldades de isolamento e crescimento da bactéria em meios artificiais e das aplicações limitadas dos métodos sorológicos atualmente disponíveis, o diagnóstico nem sempre é buscado e a doença persiste entre os animais, resultando em perdas econômicas para criadores de animais domésticos e risco à saúde humana e animal (FERNANDES *et al.*, 1981).

Desde sua introdução por ENGVALL & PERLAMANN (1972), o método de ELISA tem se mostrado extremamente versátil, permitindo pesquisar a presença de anticorpos para uma ampla variedade de antígenos, com especificidade e sensibilidade superiores a muitos dos outros métodos em uso rotineiro (YOUNG, 1991; THEAKSTON *et al.*, 1977; DAHOO, WRIGHT & RUCKERBAUER, 1986; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.* e ARAJ & KAUFAMAN, 1989).

Neste sentido, é proposta do presente trabalho desenvolver o método de ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose canina como uma alternativa simples, segura e de baixo custo (YOUNG, 1991) para o diagnóstico e detecção precoce de animais infectados, resultando em benefícios e economia para os criadores e proprietários de animais de estimação.

## 3. OBJETIVOS

- desenvolver o método de ELISA para o diagnóstico da brucelose canina;
- estudar comparativamente os resultados obtidos pelo método de ELISA com o método comumente utilizado de imunodifusão dupla a fim de verificar a eficácia, a sensibilidade e a especificidade do teste imunoenzimático para o diagnóstico de brucelose canina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 421 soros foram analisados pelos métodos de ELISA indireto e imunodifusão dupla em ágar-gel. As amostras foram obtidas a partir de sangue total colhido por venopunção, de cães do Canil Municipal de Curitiba e de canis particulares, compreendendo amostras dos Estados do Paraná e de Minas Gerais. Após a coagulação sangüínea, os soros foram separados e centrifugados por 10 minutos, a 2000rpm, tantas vezes quantas necessárias fossem para a remoção do botão de hemáceas, e armazenados em temperatura de congelamento (-20°C), até sua utilização.

### 4.1 Preparação do antígeno

O antígeno, constituído de proteínas e lipopolissacarídeos extraídos da bactéria *B. ovis*, amostra *Reo 198*, foi preparado pelo Dr. Jorge Victor Bacila Agottani, do TECPAR, conforme preconizado pela OMS.

O agente *B. ovis* foi utilizado como antígeno no presente estudo em função da disponibilidade do agente isolado e de sua homologia com *B. canis*. (HOYER & McCULLOUGH, 1968).

#### 4.1.1 Preparo do inóculo

O organismo *Brucella ovis*, amostra REO-198, foi semeado em 4 a 6 placas contendo ágar N-Z AMINE e incubado a 37°C por aproximadamente 30 horas.

A partir de uma dessas placas foram semeados 8 tubos (3 cm x 20 cm), cada um repicado para sua respectiva placa de *Petry* com meio sólido. Os tubos foram utilizados para o inóculo e as placas representaram o controle para cada um deles, onde avaliou-se a dissociação e provável contaminação.

Os tubos e as placas foram incubados a 37°C por 48 e 96 horas respectivamente; após esse período as amostras foram armazenadas em temperatura de 4°C.

As placas correspondentes aos tubos foram observadas com lupa para detectar eventuais contaminações e posteriormente preenchidas com cristal violeta para revelar possíveis dissociações, já que as colônias rugosas adquirem tonalidades de roxo ou púrpura e as colônias lisas não são coradas. Quando existe variação significativa nas condições de cultivo no fermentador pode ocorrer dissociação, havendo modificação da cadeia polissacarídica da membrana.

Os cultivos dos tubos correspondentes às placas que não apresentaram alterações foram suspensos com solução salina 0.85% peptonada a 0.1%. Por fim, a suspensão, representando o inóculo, foi passada para um frasco conectado ao fermentador.

#### **4.1.2 Inoculação de meio de cultura no fermentador**

Antes da introdução do inóculo no fermentador foi realizado o teste de esterilidade do sistema. Geralmente são colocados 4 litros de meio de cultivo no frasco de modo a cobrir o agitador. O sistema foi ativado (aeração e temperatura) e mantido por 48 horas para verificar, após dois dias, se houve contaminação.

Desde que isento de contaminação, o inóculo foi passado ao fermentador. A partir deste momento até a última colheita, as condições de aeração, agitação, temperatura e adição de antiespumante foram constantemente vigiadas e adequadas conforme a necessidade.

A partir daqui, seguiu-se o seguinte protocolo:

Tempo (horas)	Ar (litros/minuto)	Agitação (rpm)
0 – 48	6	300
48 – 96	6	300
96 – 120	8	400
120 – 144	10 – 12	500

#### 4.1.3 Colheita

No total realizaram-se três bateladas. Após a introdução do inóculo mais sete litros de meio de cultivo foram introduzidos e a primeira colheita foi feita após 48 horas.

Nesta colheita foram retirados 10 litros, deixando um litro para dar seqüência à multiplicação celular, agregando-se novos 10 litros de meio de cultivo. Este passo repetiu-se após a segunda colheita.

Na terceira colheita foram retirados onze litros para seu subsequente processamento.

#### 4.1.4 Centrifugação

Após a colheita do fermentador foi feita a centrifugação a 2.750 g durante 40 minutos, posteriormente descartou-se o sobrenadante para adição de solução salina *tope sorensen*, pH 7,2, na proporção de 1:10. Após homogeneizado e centrifugado, estas operações foram repetidas por mais duas vezes.

Concluída esta etapa o material foi inativado por autoclavação a 121°C por 20 minutos. Após o resfriamento, o material foi centrifugado a 15.000g por 15 minutos.

O sobrenadante foi filtrado e em seguida congelado a -20°C durante a noite. Este congelamento teve por finalidade separar os lipídeos.

No dia seguinte, após o descongelamento, o sobrenadante foi centrifugado novamente a 15.000g durante 15 minutos.

O sobrenadante foi dialisado para purificação do antígeno, contra uma solução *tope sorensen* de pH 7,2, durante três dias, trocando-se a solução diariamente. Para cada 100 ml da solução de antígeno foram utilizados quatro litros de solução *tope sorensen*.

Do volume restante de antígeno, frascos estéreis próprios para a liofilização foram envasados com 1 ml da solução. A liofilização durou 48 horas e quando concluída, o antígeno foi titulado e comparado com um antígeno padrão.

As técnicas acima descritas para produção do antígeno em questão são semelhantes às relatadas na literatura por MORENO *et al.*, 1979 e GAMAZO *et al.*, 1989.

## **4.2 Método de imunodifusão dupla em ágar-gel**

Este é o método rotineiramente utilizado, onde soro e antígeno são colocados em orifícios da placa após a solidificação do ágar, de modo que antígeno e anticorpo (quando existentes no soro) migram por atração de cargas formando um complexo (antígeno-anticorpo) que se insolubiliza em sua maior parte resultando numa banda de precipitação visível no ágar.

### **4.2.1 Preparação da placa para imunodifusão**

#### **Preparo do tampão borato:**

- Ácido bórico ————— 1,86 g
- Cloreto de potássio ——— 7,25 g
- Água destilada ————— 950,00 ml

Agitou-se para dissolução e ajuste do pH em 8,3 com hidróxido de sódio 0,2 M e em seguida o volume foi completado para 1 litro, com água destilada.

#### **Preparo do gel de ágar:**

- Agarose ————— 1 g
- Tampão borato ——— 5 ml
- Sol. NaCl 5% ————— 93 ml

Após adição de azida sódica a 1% a solução foi colocada para fervura sobre placa de aquecimento com agitador até obtenção de um gel translúcido e homogêneo. Foram dispensados 5 ml do ágar ainda quente sobre cada placa de vidro de 5cm de diâmetro, limpa e sem ranhura, assegurando a espessura do gel entre 3 e 4 mm.

As placas foram mantidas 15 min. em temperatura ambiente e posteriormente 30 min. em geladeira para solidificação do gel de ágar. Os cortes no gel foram feitos com uma roseta, contendo 7 perfuradores - 1 central e 6 periféricos, com 6 mm de diâmetro e distância entre eles de 2,5 mm. O excesso de ágar dos orifícios foi retirado a vácuo ou com agulha encurvada.

#### **4.2.2 O teste**

Os frascos com antígeno e soro, após retirados do freezer (-20°C), foram mantidos em banho de gelo. O soro controle foi colocado em 2 orifícios periféricos opostos entre si, os soros a testar nos 4 orifícios periféricos restantes e o antígeno no orifício central (Figura 1). Um volume de 50 $\mu$ l de soro e de antígeno foi adicionado a cada orifício correspondente. Em seguida as placas foram tampadas e incubadas em câmara úmida e temperatura ambiente (20°C a 25°C).

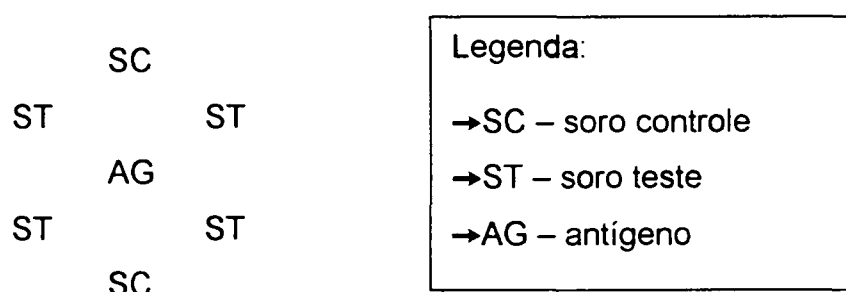


Figura 1: Disposição dos soros e antígeno na placa.

#### 4.2.3 Leitura do teste

As leituras foram realizadas após 48 horas de incubação, utilizando sistema de iluminação com luz indireta e fundo preto. O soro controle positivo foi utilizado como base para leitura do teste. A ausência de uma linha de precipitação nítida entre o soro positivo e o antígeno invalida o teste, que deve ser repetido.

#### 4.2.4 Interpretação do teste

A reação positiva é indicada por uma linha de precipitação entre o orifício do soro teste e o orifício do antígeno, e apresenta continuidade com a linha de precipitação do soro controle positivo (Figura 2).

A reação fraca positiva apresenta no final da linha de precipitação do soro controle positivo uma curva no orifício do soro teste mas não forma uma linha completa entre o antígeno e o soro teste.

A reação negativa não apresenta linha de precipitação entre o soro teste e o antígeno, ou apresenta uma linha de precipitação não contínua com a do soro controle positivo, ou ainda, a linha esta muito próxima ao orifício do soro teste.

A reação inespecífica apresenta linha de precipitação sem identidade com o soro controle.

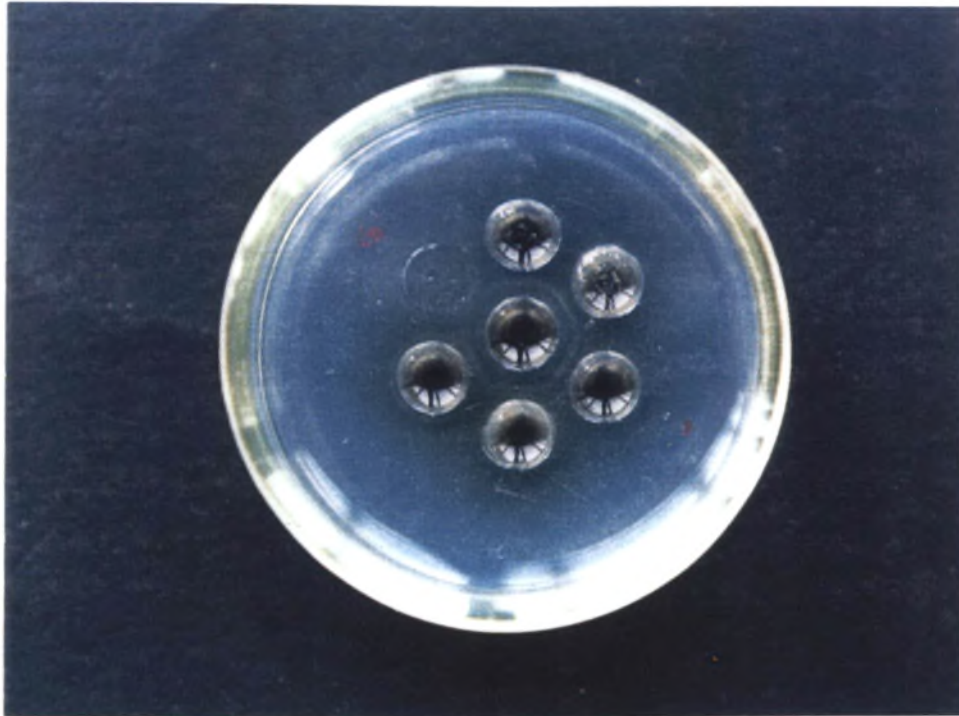


Figura 2: Placa de imunodifusão dupla em ágar-gel com bandas de precipitação indicando reações positivas.

#### **4.3 Método de ELISA indireto**

Este método, por sua formatação, baseia-se na detecção de anticorpos, o que permite sua utilização no diagnóstico de doenças infecciosas. Os resultados são obtidos a partir de uma reação de cor gerada pela enzima ligada ao anticorpo anti-IgG de cão ou conjugado anti-cão.

### 4.3.1 IgGs anti-cão conjugadas a Peroxidase

Peroxidase (HRP tipo IV; Sigma) é normalmente obtida de sementes de *horseradish* (*Radicula armoracia*; rábano silvestre), planta que produz esta enzima de forma altamente ativa e estável.

As Imunoglobulinas do isotipo IgG policlonais, separadas por cromatografia de afinidade em Proteína A-Sepharose, provenientes do soro de carneiros imunizados com IgG de cão são conjugadas à peroxidase, conforme método descrito por NAKAME & KAWOI, 1974 e os conjugados são diluídos em 1:2 em glicerol e estocados a -20°C.

### 4.3.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas do antígeno foi determinada pela absorvância a 660 nm, de acordo com o método descrito por LOWRY *et al.* (1951), sendo a soro albumina bovina usada como padrão.

### 4.3.3 Preparação dos reagentes para ELISA

**Preparo do *Coating buffer* (tampão carbonato 0,5M):**

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ————— 1,59 g
  - NaHCO<sub>3</sub> ————— 2,93 g
  - H<sub>2</sub>O destilada ————— qsp 1 litro
  - pH 9,6 ou
  - solução A = 1,1 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para 0,2 litros
  - solução B = 4,2 g NaHCO<sub>3</sub> para 1 litro
- Acertar o pH adicionando A em B.

**Preparo da solução de lavagem:**

- NaCl ————— 9,0 g
- Tween 20 ————— 0,5 ml
- H<sub>2</sub>O destilada ——— qsp 1 litro

Adicionar Tween 20 após dissolver o sal.

**Preparo do PBS 0,05M com 0,15M NaCl – pH 7.4:**

→ solução A:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ——— 7,1 g ou
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O ——— 10,82 g
- NaCl ————— 88 g
- H<sub>2</sub>O destilada ——— qsp 1 litro

→ solução B:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ————— 1,4 g
- NaCl ————— 18 g
- H<sub>2</sub>O destilada ——— qsp 1 litro

Acertar o pH adicionando B em A.

**Preparo da solução de bloqueio:**

→ caseína a 2% em PBS

Aquecer para facilitar a dissolução.

**Preparo do tampão de incubação:**

- caseína ————— 0,25 g
- Tween 20 ————— 0,05 ml

Diluição em 100 ml de PBS.

**Preparo do tampão citrato:**

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 7,1 g
- ácido cítrico ----- 5,19 g
- pH = 5.0 ou
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O ----- 10,82 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O ----- 13,40 g
- H<sub>2</sub>O destilada ----- qsp 1 litro.

**4.3.4 ELISA indireto para detectar anticorpos anti-*B.canis***

Placas Corning, de poliestireno, com 96 poços e fundo plano (Figura 3) foram sensibilizadas com 100µl (volume padrão) de uma solução de 250 ng/orifício de antígeno de *B.ovis* em tampão carbonato e incubadas em estufa por três horas ou em geladeira (4°C) *overnight*. Após esta fase as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem e bloqueadas com solução de bloqueio.

Como fonte de primeiro anticorpo foram usados os soros caninos amostrais diluídos em tampão de incubação (TI), conforme a diluição desejada do soro (1:1000). Os soros foram colocados em duplicatas em toda a placa com exceção da coluna 1, denominada de coluna branca.

As imunoglobulinas heterólogas anti-IgG de cão, conjugadas com a enzima peroxidase e diluídas a 1:4000 em tampão de incubação, constituíram o segundo anticorpo adicionado à placa.

Após incubação e lavagem a atividade enzimática foi revelada usando-se a solução de ortofenilenodiamino (OPD) como substrato (0,33 mg/ml em tampão citrato na presença de água oxigenada); após 15 minutos de incubação no escuro, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico 1:20.

As leituras da absorbância foram feitas a 492 nm em um leitor de ELISA *Titertek Multiscan*.

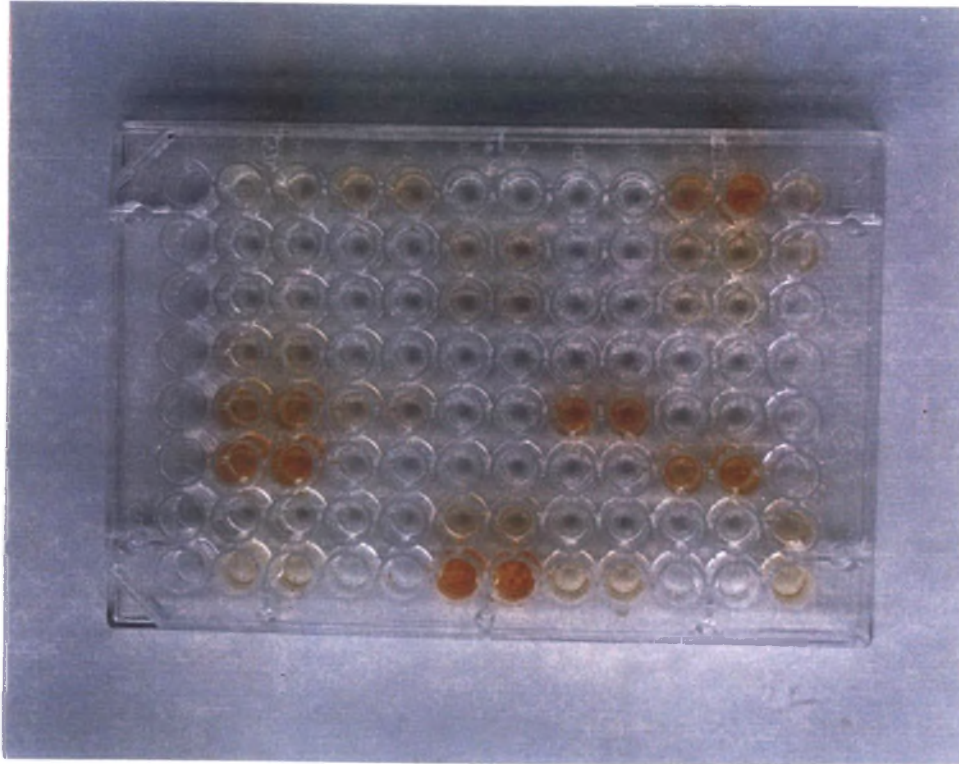


Figura 3: Placa de ELISA mostrando reações de cor (amarela) que indicam reações positivas.

#### 4.3.5 Cálculo do *cut off*

O valor do *cut off* representa o ponto médio para que um soro venha a ser considerado positivo ou negativo para *Brucella canis*. Quando um soro teste apresenta um valor de absorvância acima do determinado no *cut off* considera-se o resultado positivo, mas se o resultado estiver abaixo do valor do *cut off* então o animal é considerado negativo para *B.canis*.

O *cut off* ou ponto de corte foi calculado a partir da média e do desvio padrão, sendo que para a determinação destes valores foram considerados os resultados apresentados pelos 421 soros testados pelo método de Elisa indireto, obedecendo a seguinte fórmula:

$$\text{Cut off} = X + 2 (\text{DP})$$

$$\text{Cut off} = 0,128 + 2 (0,139)$$

$$\text{Cut off} = 0,406$$

Legenda:

→ X - média

→ DP – desvio padrão

Após estabelecido o ponto de corte, todos os soros testados pelo método em questão foram enquadrados em dois grupos em relação à brucelose canina: positivos (leitura superior ao ponto de corte) e negativos ( a leitura inferior ao ponto de corte).

Posteriormente os resultados obtidos através de ambos os métodos diagnósticos (ELISA e imunodifusão) foram confrontados para então ser determinada a sensibilidade e especificidade do método em desenvolvimento.

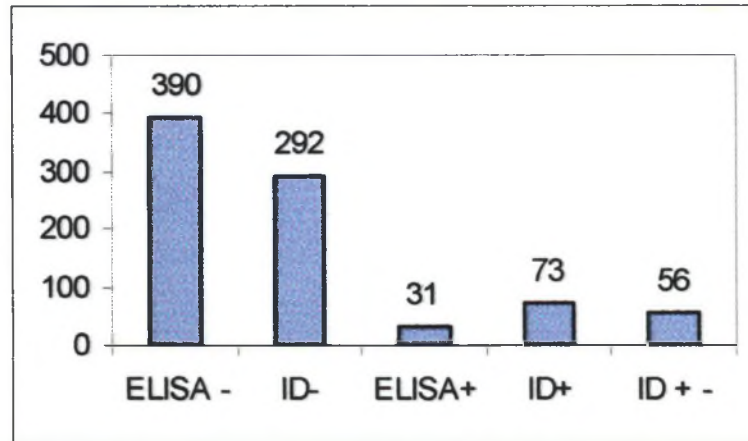
## 5.RESULTADOS

### 5.1 Reatividade dos soros amostrais

Quatrocentos e vinte e um soros de cães de rua e de canis particulares foram estudados pelos métodos de imunodifusão dupla e ELISA.

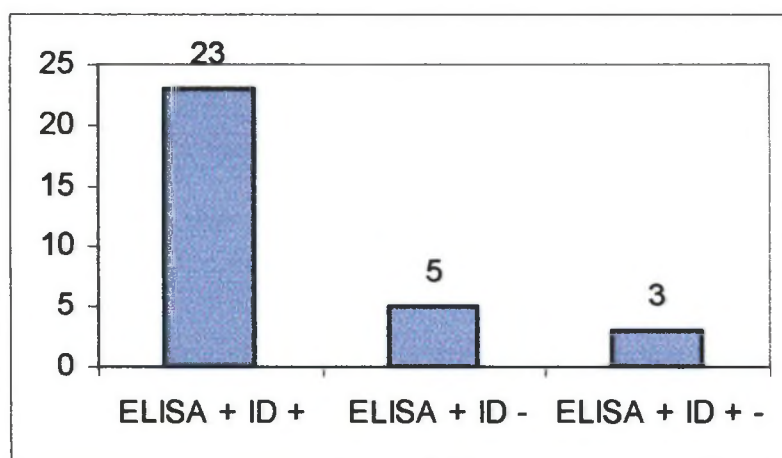
O gráfico 1 mostra que do total de 421 soros estudados, 31 ( 7,36%) soros apresentaram resultados positivos pelo método de ELISA , enquanto que pelo método de imunodifusão dupla ( ID) 73 soros (17,34%) apresentaram-se positivos para brucelose canina e 56 soros ( 13,30%) apresentaram reação fracamente positiva (+-).

**Gráfico 1: Padrão de reatividade dos soros caninos frente aos métodos de ELISA e Imunodifusão dupla**



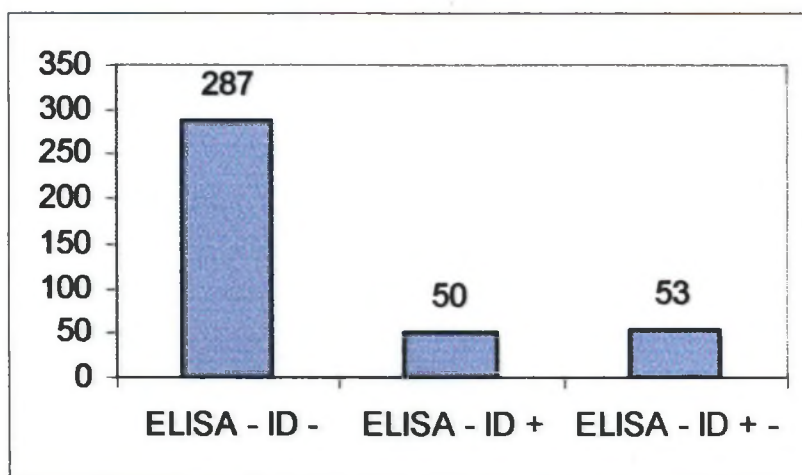
O gráfico 2 mostra que dos 31 soros positivos em ELISA 23 (74,19%) apresentaram reação positiva também em ID, enquanto que 5 soros positivos (16,13%) em ELISA apresentaram resultados negativos em ID, e 3 soros positivos (9,68%) em ELISA mostraram reações fracamente positivas por ID.

**Gráfico 2: Padrão de reatividade dos soros positivos em ELISA frente ao método de Imunodifusão dupla em ágar-gel**



O gráfico 3 mostra o padrão de reação dos 390 soros negativos segundo o método de ELISA indireto, frente ao método de imunodifusão dupla em ágar-gel. Os resultados obtidos mostram um índice de concordância entre os métodos de 73,59%.

**Gráfico 3: Padrão de reatividade dos soros negativos em ELISA frente ao método de imunodifusão dupla em ágar-gel.**



## 5.2 Cálculo da sensibilidade:

A sensibilidade foi calculada a partir de uma comparação dos resultados obtidos frente ao teste de ELISA indireto e imunodifusão dupla. Nota-se que o valor encontrado para sensibilidade do teste de ELISA em relação ao método rotineiramente utilizado foi inferior a 50%.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c} \cdot 100$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{23}{23 + 50} \cdot 100$$

$$\text{Sensibilidade} = 31,51\%$$

Legenda:

→ a – número de soros positivos em ELISA e em imunodifusão.

→ c – número de soros negativos em ELISA e positivos em imunodifusão.

### 5.3 Cálculo da especificidade

Assim como a sensibilidade, a especificidade também foi calculada a partir de uma comparação dos resultados obtidos frente ao teste de ELISA e de imunodifusão. Nota-se que o valor encontrado para especificidade do método de ELISA em relação ao de imunodifusão dupla foi próximo a 100%.

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{d + b} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{287}{5 + 287} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = 98,29\%$$

Legenda:

→ d – número de soros negativos em ELISA e em imunodifusão.

→ b – número de soros positivos em ELISA e negativos em imunodifusão.

## 6. DISCUSSÃO

Analisando-se os resultados apresentados no gráfico 1 observa-se que o método de ELISA identificou apenas 31 soros positivos para brucelose, enquanto o método de imunodifusão dupla acusou 73 soros positivos. Ainda através do gráfico 1 pode-se observar que o índice de soros não reagentes foi superior no método de ELISA (390) em relação ao método de ID (292).

Estes resultados podem ser explicados pelo maior grau de sensibilidade e especificidade do método de ELISA, no qual não aparecem reações fraco-positivas, pois a avidéz com que os anticorpos se ligam ao antígeno fixado na fase sólida não permite a presença de complexos inespecíficos, que são eliminados nas etapas da lavagem pela ligação menos ávida aos antígenos.

Os resultados apresentados no gráfico 2, referentes ao estudo comparativo dos soros com reação positiva em ELISA submetidos ao método de imunodifusão dupla indicam que dos 31 soros positivos em ELISA, 21 se mostraram também positivos em ID, mas observou-se 5 soros positivos em ELISA e negativos em ID e 3 soros positivos em ELISA e fraco-positivos em ID. Estes resultados aparentemente contraditórios podem ser melhor compreendidos quando se analisa a eficácia e característica dos diferentes métodos. O método de ELISA é capaz de identificar antígenos ou anticorpos em uma reação em proporções muito menores do que o método de imunodifusão dupla (entre  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$   $\mu\text{g}$  contra 3 e 20  $\mu\text{g}$ , respectivamente), o que permite concluir que nos 5 soros negativos em ID e nos 3 soros fracamente positivos em ID, mas com resultados positivos por ELISA, a provável pequena quantidade de anticorpos presentes não é detectada pelo método menos sensível de imunodifusão dupla, sendo percebida pelo método de ELISA.

Por outro lado, no gráfico 3 estão apresentados os resultados dos soros negativos por ELISA testados também por ID, e observa-se que 50 soros se mostraram negativos em ELISA e positivos em imunodifusão e 53 soros apresentaram reações fracamente positivas em ID e negativas em ELISA. Estes resultados podem ser explicados com base nas reações inespecíficas comuns nos métodos imunológicos

menos sensíveis, como ID, e na estanqueidade da reação, pois no método de ELISA, estes complexos inespecíficos, pela fraca ligação à fase sólida são eliminados na lavagem, permanecendo apenas os complexos antígeno-anticorpo ligados à fase sólida, e aqueles anticorpos que se ligam mais avidamente a seus antígenos.

Vários fatores podem justificar a sensibilidade inferior a 50% do método de ELISA encontrada neste trabalho. Primeiramente o antígeno pode não estar purificado adequadamente, o que não interferiria com a mesma intensidade na imunodifusão pois este é um método menos refinado, que não exige um grau superior de pureza dos antígenos ou anticorpos.

Outro fator, poderia ser a maneira como os epítomos importantes do antígeno são apresentados nos diferentes métodos, mais uma vez justificando a menor sensibilidade do método de ELISA.

Finalmente, a utilização de antígeno de *B. ovis*, ao invés de *B. canis*, por razões explicadas anteriormente ( Material e Métodos).

Por outro lado, a especificidade do método de ELISA em relação ao método de imunodifusão atingiu quase 100%. Este valor baseia-se na porcentagem de soros negativos em imunodifusão que reagiram da mesma forma frente ao método de ELISA.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos com este trabalho indicam a possibilidade de o método de ELISA vir a ser utilizado como um método eficiente e preciso para o diagnóstico de brucelose canina.

Os resultados obtidos confirmam a maior sensibilidade e especificidade do método de ELISA frente ao método de imunodifusão na identificação de soros positivos para brucelose canina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N.; SZIFRES, B. In: VARGAS, A.C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; *et al.* Brucelose Canina: Relato de Caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 305-308, 1996.
- ALTON, G.G.; CORNER, L.A.; PLACKETT, P. Vaccination of Pregnant Cows With Low Doses of *B.abortus* strain 19 vaccine. **Australian Veterinary Journal**; 56: 369-372, 1980.
- AMARAL, M.C. Brucelose Canina: Cuidados na Reprodução. **Cinofilia Total**, Curitiba, p. 3-6, Ago. 1999.
- ARAJ, G.F.; KAUFAMAN, A.F. Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G (IgG), IgM and IgA to *Brucella melitensis* major outer membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis. **J. Clin. Microbiol.**, 27: 1909-1912, 1989.
- BADAKHSH, F.F.; CARMICHAEL, L.E.; DOUGLAS, J.A. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 286-289, Feb. 1982.
- CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M<sup>-</sup>) organism as antigen. **The Cornell Veterinarian**, v. 77, n. 1, p. 3-12, 1987.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária**. 1. ed. São Paulo : Livraria Roca Ltda, 1988. p.180-185.

- CASTRO, A.F.P. Brucella. In: TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo, Rio de Janeiro : Livraria Atheneu, 1991. p. 141-142.
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; FONSECA, S.C.G.; CAMPOLINA, D. *et al.* ELISA for detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, Oxford, 12: 1646-1656, 1994.
- CORNELL RESEARCH LABORATORY FOR DISEASES. Clinical signs of canine brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n.11, p. 1172, Sept. 1976
- DAHOO, I.R.; WRIGHT, P.F.; RUCKERBAUER, G.S. A Comparison of Five Serological Tests for Bovine Brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, 50: 485-493, 1986.
- ENGVALL, E.; PERLAMANN, P. Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA. **J. Immunol**, 109: 129-135, 1972.
- ERASMUS, J.A.; ERASMUS, M.C. The use of a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in the control of bovine brucellosis. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 58, n. 2, p. 71-75, 1987.
- FERNANDES, J.C.T.; WALD, V.B.; JOBIM, G.B. Alguns aspectos da brucelose canina. **A Hora Veterinária**, Ano 1, n. 4, nov/dez. 1981.
- FLORES DE CASTRO, R.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis. In: KIRK, R.W. **Current Veterinary Therapy Animal Practice**. cap. 7, p. 1404-1305, 1980.

- FLORES DE CASTRO, R.; SUAREZ, F.; RAMIREZ-PFFIFFER, C.; *et al.* In: VARGAS, A.C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; *et al.* Brucelose Canina: Relato de Caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 305-308, 1996.
- GAMAZO, C.; WINTER, A.J.; MORYÓN, I. *et al.* Comparative Analyses of Proteins Extracted by Hot Saline or Released Spontaneously into outer Membrane Bleds from Field Strains of *brucella ovis* and *brucella melitensis*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 5, p. 1419-1426, 1989.
- GEORGE, L.W.; CARMICHAEL, L.E. Development of a Rose Bengall stained plate-test for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. **The Cornell Veterinarian**, 68 (4), p. 530-543, 1978.
- GERMANO, P.M.L.; VASCONCELLOS, S.A.; ISHIZUKA, M.M.; *et al.* In: VARGAS, A.C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; *et al.* Brucelose Canina: Relato de Caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 305-308, 1996.
- GREENE, C.E.; GEORGE, L.W. In: VARGAS, A.C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; *et al.* Brucelose Canina: Relato de Caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 305-308, 1996.
- HOYER, B.H.; McCULLOUGH, N.B. Homologies of Deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, Canine Abortion Organisms and other *Brucella* species. **Journal of Bacteriology**, v. 96, n. 5, p. 1783-1790, Nov. 1968.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chemistry**, 193: 265-275, 1951.
- MARCH, L. Have dogs tested for brucellosis before breeding. Via Internet: [http://www.cvm.uiuc.edu/ceps/petcolumns/canine\\_brucellosis.html](http://www.cvm.uiuc.edu/ceps/petcolumns/canine_brucellosis.html), Set. 1998.

- MOORE, J.A.; GUPTA, B.N. Epizootiology, Diagnosis and Control of *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1737-1740, 15 June 1970.
- MORENO, E.; PITT, M.W.; JONES, L.M. *et al.* Purification and Characterization of Smooth and Rough Lipopolysaccharidae from *brucella abortus*. **J. Bacteriol.**, 138: 361-369, 1979.
- MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. **Dermatologia dos Pequenos Animais**. São Paulo : Manole Ltda, 3. ed., 1985. p. 293.
- NAKANE, P.K.; KAWOI, A. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. **J. Histochem. Cytochem.**, 22: 1084-1091, 1974.
- PACHECO, G.; THIAGO DE MELLO, M. **Brucelose**. Rio de Janeiro : Serviço gráfico do Instituto brasileiro de geografia e estatística, 1956.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo : McGraw-hill do Brasil, v. 2, 1980. p. 704-708.
- PEREIRA-FILHO, M.; DA-SILVA, J.A.H.; DA-ROCHA, J.V.N. *et al.* Estudo da incidência da Brucelose canina da zona metropolitana de Salvador. **Boletim do Instituto Biologico da Bahia**, Salvador, v. 15, n. 1, p. 63-66, 1976.
- PICKERILL, P.A.; CARMICHAEL, L.E. Canine Brucellosis: Control programas in commercial kennels and effect on reproduction. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.160, n. 12, p. 1607-1615, 15 June, 1972.

- STANIER, R.J.; DOUDORF, M.; ADELBERG, E.A. **Mundo dos Micróbios**. Ed. Edgard Blücher Ltda., 1969. p. 668-670.
- THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M.J.; REID, H.A. Micro ELISA for detecting and assaying snake venom and venom antibody. **Lancet**, 2: 639-641, 1977.
- VARGAS, A.C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V. *et al.* Brucelose Canina: Relato de Caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 305-308, 1996.
- WILFERT, C. In Zinsser. **Microbiology**. 16 ed. Joklik and Willet, Chap. 46, Appleton-Century Crofts., 1976. p. 624-631.
- YOUNG, E.J. Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. **Reviews of Infectious Diseases**, 13: 359-372, 1991.
- ZACARIAS, R.R. *et al.* Estudo da Prevalência de Brucelose Canina em Cães de Rua e de Canis Particularés pelo Método de imunodifusão Dupla. **Anais do VII Evento de Iniciação Científica da UFPR**, p. 481, Set. 1999.