AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE POLARIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA

LUIZ, João Paulo Mesquita[1]; SINNOTT, Francine Alves[1]; HIRSCHMANN[2], Lourdes; LANSINI, Walmor[3]; HARTLEBEN, Cláudia Pinho [1,2].

[1]Laboratório de Imunohistoquímica –Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Centro de Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
[2]Faculdade de Veterinária –Departamento de Veterinária Preventiva – UFPel
[3]Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul
joaopaulomesquita@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa, de evolução crônica causada por bactérias do gênero *Brucella* e acomete principalmente os sistemas reprodutivos e ósteo-articular de bovinos, suínos, ovinos, caprinos, cães, eqüinos e homem (ACHA, SZYFRES, 2001). Esta zoonose possui distribuição mundial e acarreta problemas sanitários importantes e grandes prejuízos econômicos (BRASIL, 2006).

Atualmente, a doença está em controle pelo ministério da agricultura-MAPA, sob denominação de "Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)". O programa foi instituído em 2001 pelo MAPA com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde comunitária e de promover a competitividade da pecuária nacional. Referente a brucelose, os animais positivos encontrados no rebanho devem ser encaminhados ao abate sanitário, após diagnóstico realizado por sorologia ou isolamento bacteriano (BRASIL, 2006).

O diagnóstico da brucelose preconizado pelo MAPA é realizado por sorologia, através da detecção de anticorpos no soro e/ou no leite dos bovinos (BRASIL, 2006). Os testes de diagnóstico atualmente preconizado pelo programa são: antígeno acidificado tamponado (AAT), teste de triagem em amostras de soro individuais; teste do anel no leite (TAL), teste de triagem de amostras de leite de populações bovinas em lactação; e 2-Mercaptoetanol (2 -ME), realizado em paralelo ao teste de aglutinação lenta em tubos, o qual pode diferenciar a classe de anticorpos presente na amostra, IgM e IgG. O teste 2-ME é o teste confirmatório realizado após a triagem de soros pelo AAT.

Apesar da especificidade do teste confirmatório 2-ME, este é laborioso, depende de profissionais treinados para avaliação da aglutinação das amostras, é demorado devido à necessidade de incubação das amostras por 48 horas, e necessita de equipamentos de proteção coletiva para sua execução, uma vez que o 2-mercaptoetanol é tóxico para humanos. Novas metodologias foram descritas para diagnóstico da brucelose bovina, entre elas a polarização da fluorescência (FPA) descrita por NIELSEN *et al*., 1998 e atualmente em utilização fora do Brasil para diagnóstico da doença (OIE, 2008). A metodologia de FPA possui vantagens em relação ao teste 2-ME, entre elas a automatização, utilizando máquina leitora de precisão para leitura de resultados, possibilidade de armazenamento de dados, e a vantagem da rapidez na execução do teste, o qual pode ser executado

em poucos minutos. Contudo, a utilização da metodologia de FPA ainda encontra-se em avaliação para implantação no Brasil.

Devido ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a especificidade e sensibilidade da metodologia FPA, quando comparada aos testes AAT e 2-ME, para o diagnóstico de brucelose bovina, buscando contribuir com subsídios para avaliação da possibilidade da implantação desta metodologia de diagnóstico.

2 METODOLOGIA

***Amostras de soro**: o*s soros utilizados foram coletados de animais submetidos a abate sanitário devido à confirmação por 2-ME (27 amostras) ou somente por teste AAT reagente (61 amostras). As amostras de sangue foram coletadas na linha de abate, conforme as normas de biossegurança (proteção individual e coletiva estabelecidas para esta doença). As amostras coletadas foram submetidas a centrifugação e coleta do soro sobrenadante, em capela de fluxo laminar, seguido de estoque a – 20 °C até o momento do uso. Soros controles negativos foram obtidos do banco de soros do Centro de Controle de Zoonoses.

Antígeno Acidificado Tamponado (AAT): amostras de soro provenientes de animais positivos neste teste foram novamente testados conforme padronizado pelo MAPA, 2006. Resumidamente, 30 µL de soro para reação com 30 µL de antígeno para AAT, constituído de suspensão do antígeno de *B. abortus* amostra 1119-3. O homogeneizado de soro em teste e antígeno foi agitado a 30 rpm durante 4 min. O mesmo volume de soro e antígenos foram utilizados para os soros controle negativo e positivo incluídos no teste. A leitura foi realizada em caixa de luz com fundo escuro e foi considerado positivo o soro capaz de aglutinar o antígeno.

2-Mercaptoetanol (2-ME) e Teste de aglutinação lenta em tubos (SAT): amostras de soro provenientes de animais positivos neste teste foram novamente testados conforme padronizado pelo MAPA, 2006. As amostras de soro as quais foram coletadas somente com resultados positivos no AAT foram também testadas em 2-ME. Resumidamente, as amostras de soro previamente coletadas foram descongeladas a 20 °C, diluídas em soluções de antígeno de *B. abortus* amostra 1119-3 na concentração de 0,045 %, nas diluições 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 para o SAT. Paralelamente, as mesmas diluições utilizadas no SAT foram realizadas em 0,1M de 2-ME e, após 30 min, adicionadas de uma suspensão de antígeno *B. abortus* amostra 1119-3 na concentração de 0,09 %. Soros controles, negativo e positivo, com títulos alto, médio e baixo foram incluídos para controle do teste. As amostras foram incubadas a 37 °C por 48 h e a leitura realizada utilizando luz indireta. Foi considerado título positivo a maior diluição de soro capaz de aglutinar a suspensão de antígeno no SAT e 2 -ME.

Teste de Polarização da Fluorescência (FPA): as amostras de soro reagentes e não reagentes nos testes AAT e 2-ME foram submetidas ao teste de FPA para comparação de reatividade e cálculo da especificidade e sensibilidade do teste. A técnica foi executada conforme *Samartino et.al,* 1999, considerando um ponto de corte de 94 unidades de polarização (mP) para negativos, 94 a 104 mP para suspeitos e superior a 104 mP para positivos, uma vez que o Brasil

utiliza vacina para brucelose bovina. Resumidamente, as amostras de soro foram diluídas 1:100 em tampão fosfato (PBS 0,2 M), e, após incubar por 5 min. a temperatura de 22 °C, submetidas a leitura em polarizador (DIACHEMIX), adicionadas de 10 µL de antígeno marcado (gentilmente cedido pelo Dr Klaus NIELSEN, Canadá), deixadas incubar por 2 min. e submetidas a leitura em polarizador. Soros controle positivo e negativo foram submetidos à FPA anteriormente a execução das amostras em teste.

Sensibilidade e Especificidade da FPA: a sensibilidade e especificidade do teste FPA foi calculada utilizando uma tabela 2x2; os dados foram catalogados no programa Excel 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teste FPA foi capaz de identificar 92,59 % das amostras dos animais primeiramente reagentes no 2-ME como positivas, contudo, das amostras não reagentes, 2 foram identificadas como suspeitas, na faixa de 94 a 104 mP.

Todas as amostras controle negativo apresentaram leituras inferiores a 70 mP, confirmando a calibração do equipamento polarizador.

Das amostras provenientes de animais positivos no AAT, 95,08% foram positivas no FPA e 93,44% quando testadas em 2-ME. Estes dados sugerem que a metodologia de FPA possui maior sensibilidade como teste confirmatório, quando comparado ao 2-ME, contudo, apresentou ser menos específico ao considerarmos o 2-ME como teste padrão.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho concluiu que a metodologia de FPA possui sensibilidade e especificidade adequadas como teste confirmatório para diagnóstico de brucelose bovina, quando comparado ao teste padrão 2-ME; sua execução é simples e pouco trabalhosa. Novas amostras devem ser submetidas a esta metodologia para avaliação, visando sua futura implantação como teste confirmatório de brucelose no Brasil.

5 REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001. p.28-56.

BRASIL – 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, 188p.

NIELSEN, K.; GALL, D.;A, LIN, M.; MASSANGILL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, B.; COATS, M.; HENNAGER, S.; DAJER, A.; NICOLETTI, P.;THOMAS, F.

Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 66, p. 321-329, 1998.

SAMARTINO, L., GREGORET, R., GALL, D., NIELSEN, K. Flourescense Polarization assay: Application to the diagnosis of bovina brucellosis in Argentina. **Journal of Immunassay,** 20 (3), 115-126. 1999.

World Organization for Animal Health (OIE). Brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008. http://www.oie.org