

Comparação de kits ELISA® comerciais para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*¹

Cíntia das C. Bernardo², Barbara R. de Avelar³, Mariana D.C. Ignacchiti³, Isabella V.F. Martins^{3*} e Maria J.S. Pereira⁴

ABSTRACT.- Bernardo C.C., Avelar B.R., Ignacchiti M.D.C., Martins I.V.F. & Pereira M.J.S. 2013. [Comparison of comercial® ELISA kits for antibodies in serum and milk with a fecal test in cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*.] Comparação de kits ELISA® comerciais para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(1):37-40. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário s/n, Cx. Postal 16, Alegre, ES 29500-000, Brazil. E-mail: ivfmartins@gmail.com

The fascioliasis is a disease caused by a trematode that affects the liver mainly of domestic ruminants and can also parasite man; its diagnosis is routinely done by coprological methods. The aim of this study was to compare commercial ELISA kits for antibodies in serum and milk with a coprological test in cattle naturally infected by *Fasciola hepatica*. We collected fecal, blood and milk samples from cattle in the municipality of Jerônimo Monteiro, southern Espírito Santo state. The fecal samples were processed by the fecal egg sedimentation for *F. hepatica*, which is used as a gold standard for analyzis. Blood (92) and milk (43) samples were processed according to the manufacturer instructions of the respective commercial ELISA kits tested. We used the McNemar chi-square for statistical comparison and calculated the sensitivity, specificity, predictive values, and kappa. The results showed that the frequency of positivity for the commercial serum ELISA kits ($\chi^2=34.02$) and milk ($\chi^2=19.04$) differed significantly ($p<0.0001$) compared with fecal egg sedimentation. The sensitivity of the kits was 100%, but possessed low specificity, 42.85 and 30% for serum and milk respectively. The coefficient kappa showed agreement for testing serum (0.33) and milk (0.21). The positive predictive value of the kits for serum and milk were respectively 44.61% and 38.23%, and negative predictive values were 100% for both tests. Despite the increased sensitivity of commercial ELISA kits and the difference in relation to the fecal egg sedimentation test for detection of *F. hepatica* positive animals, the choice of a diagnostic test should consider the effectiveness. When a herd is affected by parasitism, treatment is applied to all animals; so, the fecal egg sedimentation test for the diagnosis of disease in the field is most efficient, as the test is cheap and easy to perform.

INDEX TERMS: Fascioliasis, *Fasciola hepatica*, diseases of cattle, *in vivo* diagnostic, immunologic diagnostic.

¹ Recebido em 8 de agosto de 2012.

Aceito para publicação em 30 de outubro de 2012.

² Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG), Rua 235 esq. com a 1ª Avenida, s/n, Setor Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brasil. E-mail: ccb_cintia@yahoo.com.br

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alto Universitário s/n, Cx. Postal 16, Alegre, ES 29500000, Brasil. *Autor para correspondência: ivfmartins@gmail.com

⁴ Departamento de Parasitologia, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: m.salim@ufrrj.br

RESUMO.- A fasciolose é uma enfermidade causada por um trematoda que acomete o fígado principalmente de ruminantes domésticos, podendo parasitar o homem e seu diagnóstico é realizado rotineiramente por exames coproparasitológicos. O objetivo do presente estudo foi comparar kits comerciais de ELISA para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. Foram coletadas amostras de fezes (92) sangue (92) e leite (43) de bovinos provenientes de propriedades de gado leiteiro do município de Jerônimo

mo Monteiro, sul do Estado do Espírito Santo. As amostras de fezes coletadas foram processadas pela técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica*, utilizada como padrão ouro para as análises. Amostras de sangue e de leite foram processadas segundo a orientação do fabricante dos respectivos Kits ELISA comerciais testados. Utilizou-se o χ^2 de McNemar para comparação estatística e calcularam-se a sensibilidade e especificidade, valores preditivos e kappa. Os resultados obtidos mostraram que as frequências de positividade pelo uso dos kits ELISA comerciais de soro e de leite diferiram significativamente ($p < 0,0001$) em relação ao exame coproparasitológico. A sensibilidade dos Kits foi de 100%, porém possuíram baixa especificidade, 42,85 e 30% para o soro e leite respectivamente. O coeficiente de kappa mostrou concordância sofrível para os testes de soro (0,33) e de leite (0,21). Os valores preditivos positivos dos kits para soro e leite foram, respectivamente, 44,61 e 38,23% e, os valores preditivos negativos de 100% para ambos os testes. Apesar da maior sensibilidade dos kits ELISA comerciais e, destes apresentarem diferença em relação ao exame coproparasitológico na detecção dos animais positivos para *F. hepatica*, a escolha de um teste diagnóstico deve considerar o custo benefício. Quando se trata da presença de parasitismo em rebanhos, o tratamento é aplicado em todos os animais e, assim, o exame coproparasitológico para o diagnóstico da doença tem maior eficiência, já que é menos oneroso e de fácil execução.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Fasciolose, *Fasciola hepatica*, doenças de bovinos, diagnóstico *in vivo*, diagnóstico imunológico.

INTRODUÇÃO

A fasciolose é a helmintose de maior prevalência que acomete o fígado de ruminantes e a que possui maior morbidade (Mezo et al. 2010). Tradicionalmente, o diagnóstico da fasciolose é realizado por meio da detecção de ovos nas fezes ou pelo exame *post-mortem* (Molloy et al. 2005) e na prática várias técnicas com diferentes princípios são utilizados (Fairweather 2011). No entanto, exames coproparasitológicos podem ser aplicados somente após o período de pré-patência, além de que, animais infectados podem não ser detectados pelo teste, constituindo-se em fonte de infecção responsável pela manutenção da doença nos rebanhos (Sánchez-Andrade et al. 2000). Diante desta dificuldade foram desenvolvidos testes ELISA para detecção de anticorpos tanto em soro quanto em leite que são mais sensíveis permitindo um diagnóstico precoce (Reichel 2002, Salimi-Bejestani et al. 2005, Mezo et al. 2007, 2010, Salimi-Bejestani et al. 2007,) e assim mais úteis para a diminuição dos efeitos deletérios acarretados pela fasciolose.

Apesar de testes ELISA detectarem infecções mais precocemente do que o exame de fezes, anticorpos podem continuar circulantes mesmo após o sucesso do tratamento, portanto não indicando necessariamente uma infecção ativa (Fairweather 2011). Por outro lado, no Brasil, ainda não há kits ELISA comerciais disponíveis no mercado nacional, o que limita seu uso devido à necessidade de importação, inclusive pelo custo. Além disso, a avaliação da qualidade de uma técnica deve ser realizada em três níveis antes de

sua adoção. O primeiro deles diz respeito à eficácia que se refere aos resultados quando a técnica é utilizada em condições ideais. O segundo, à efetividade, que avalia os resultados quando em uso na rotina. Assim, uma técnica pode apresentar boa eficácia e baixa efetividade. O terceiro nível a ser considerado é a eficiência da técnica, que se refere aos efeitos produzidos em relação aos recursos e tempo gastos (Pereira 2008).

O objetivo do presente estudo foi de comparar kits comerciais de ELISA para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *F. hepatica*, considerando os aspectos operacionais e de custo.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto de 2010 a agosto de 2011 foram realizadas visitas em 40 propriedades leiteiras no município de Jerônimo Monteiro (latitude -20:47:20, longitude -41:23:42) (IBGE 2012), sul do estado do Espírito Santo, onde foram coletadas 577 amostras de fezes para realização de um inquérito epidemiológico como forma de avaliar as propriedades quanto a presença ou ausência de animais infectados por *Fasciola hepatica*. As amostras fecais foram acondicionadas em sacolas plásticas devidamente identificadas com o nome da propriedade e do animal coletado, sendo processadas segundo a técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* (Foreyt 2005). A partir dos resultados obtidos no inquérito, foram selecionados rebanhos em lactação, com pelo menos um animal positivo ao exame coproparasitológico. Nestes rebanhos, 20% das vacas em lactação foram selecionadas, por meio de sorteio, para coleta de fezes, sangue e leite, totalizando 92 amostras de cada material.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos *vacutainer*, sem anticoagulante e centrifugadas a 3500rpm por 5 minutos, para separação do soro. Os soros foram acondicionados em tubos *Eppendorfs* estéreis identificados de acordo com a origem da amostra. As amostras de leite foram coletadas em tubos *Falcon* estéreis, após o descarte do primeiro jato de leite da teta de cada animal. Todas as amostras foram encaminhadas em caixas isotérmicas ao laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (Hovet, CCA-UFES).

As amostras de soro e leites foram analisadas para detecção de anticorpos segundo instruções do fabricante. Das 92 amostras de leite coletadas, apenas 43 amostras de leite foram analisadas em função da disponibilidade do kit ELISA® comercial BIO K 211 (Empresa Bio-X, Bélgica). Dentre as amostras utilizadas no ELISA, 29 amostras de soro e 13 amostras de leite, foram de animais positivos para fasciolose segundo o exame de sedimentação fecal.

Para analisar a associação entre a proporção de animais positivos ao exame de fezes e aos kits ELISA® comerciais para amostras de soro e leite, o teste de χ^2 de McNemar foi utilizado, adotando-se o nível de significância de 5%. Os indicadores de validade (sensibilidade, especificidade e valores preditivos) e de reprodutibilidade (kappa) foram calculados utilizando-se como padrão ouro o exame coproparasitológico de sedimentação fecal (Foreyt 2005). Para os cálculos utilizou-se o programa estatístico BioEstat 5.0.

RESULTADOS

Os resultados das análises utilizando a técnica de sedimentação fecal e o kit ELISA comercial® para detecção de anticorpos no soro estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do kit Elisa comercial® para detecção de anticorpos no soro utilizando-se como padrão o exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (Foreyt, 2005)

ELISA para amostras de soro	Exame coproparasitológico		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	29 (31,52%)	36 (39,13%)	65 (70,65%)
Negativo	0 (0%)	27 (29,35%)	27 (29,35%)
Total	29 (31,52%)	63 (68,48%)	92 (100%)

* McNemar: 34,02 (p<0,0001); kappa: 0,33.

A frequência de fasciolose hepática foi de 70,65% no kit ELISA comercial® e de 31,52% no exame coproparasitológico diferindo significativamente (p<0,0001). A sensibilidade do kit comercial para amostras de soro bovino foi de 100%, porém a especificidade foi baixa, 42,85%. O valor preditivo positivo (VPP) do kit ELISA para detecção de anticorpos no soro foi de 44,61%, o valor preditivo negativo (VPN) de 100% e kappa igual a 0,33.

Os resultados das análises através da técnica de sedimentação fecal e do kit ELISA comercial® para detecção de anticorpos no leite estão apresentados no Quadro 2.

A frequência de fasciolose encontrada pelo kit ELISA® comercial para amostras de leite foi de 79,07% e pelo exame coproparasitológico foi de 30,23%, diferindo significativamente (p<0,0001). A sensibilidade e a especificidade do kit ELISA comercial® para detecção de anticorpos no leite foi de 100% e 30% respectivamente. O VPP para esse teste foi de 38,23%, o VPN de 100% e o coeficiente de kappa (0,21).

Quadro 2. Avaliação da validade e da reprodutibilidade do kit Elisa comercial® para detecção de anticorpos no leite utilizando-se como padrão o exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (Foreyt 2005)

ELISA para amostras de leite	Exame coproparasitológico		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	13 (30,23%)	21 (48,84%)	34 (79,07%)
Negativo	0 (0%)	9 (20,93%)	9 (20,93%)
Total	13 (30,23%)	30 (69,77%)	43 (100%)

* McNemar: 19,04 (p<0,0001); kappa: 0,21.

DISCUSSÃO

A diferença observada entre a proporção de animais positivos detectados por meio do ELISA nas amostras de soro) em comparação ao exame de sedimentação fecal provavelmente se deve ao fato de que entre uma e quatro semanas pós-infecção os anticorpos contra *F. hepatica* podem ser detectados (Mezo et al. 2010) e apenas após 70 dias da infecção é que os ovos do parasito começam a ser eliminados nas fezes (Reichel 2002).

A sensibilidade calculada para o kit ELISA para detecção de anticorpos no soro é semelhante às observadas por vários autores, mas a especificidade é muito diferente. Sensibilidade e especificidade acima de 90% foram relatadas por Sánchez-Andrade et al. (2000) e Molloy et al. (2005). Anderson et al. (1999), encontraram sensibilidade um pouco inferior, mas a especificidade (70%) foi bem supe-

rior a do presente estudo. As diferenças entre os resultados deste estudo e os relatados são decorrentes do padrão ouro utilizado por aqueles autores, que foi o exame *post-mortem*.

No presente estudo, a sensibilidade para o kit ELISA® comercial para detecção de anticorpos no leite foi maior que 95% encontrada por Reichel et al. (2005) que testaram o kit ELISA® comercial (Instituto Pourquier, França) para amostras de leite bovino, utilizando como padrão os resultados obtidos a partir do ELISA para amostras de soro, mas a especificidade foi muito inferior. As diferenças entre os resultados dos dois estudos podem ser explicadas pelos diferentes testes utilizados como padrão ouro. Salimi-Bejestani et al. (2007) também encontraram sensibilidade (92%) e especificidade (88%) altas no ELISA para amostras de leite utilizando, como padrão ouro, o ELISA para detecção de anticorpos no soro com amostras obtidas de animais provenientes de área endêmica para fasciolose.

Utilizando bovinos positivos ao exame coproparasitológico de sedimentação e flutuação, e amostras negativas provenientes de animais pertencentes a áreas não endêmicas para fasciolose, Molloy et al. (2005) encontraram valores de sensibilidade e especificidade para um kit ELISA® comercial (Instituto Pourquier, França) para amostras de leite, respectivamente de 97,7% e 99,3%. Contrariamente, no presente estudo utilizaram-se animais positivos e negativos ao exame coproparasitológico de sedimentação, porém provenientes de propriedades de área endêmica para fasciolose as quais sabidamente apresentaram pelo menos um animal positivo para fasciolose no rebanho.

Duscher et al. (2011) também avaliaram kits comerciais de ELISA para amostras de soro e leite e comparando os resultados com os encontrados ao exame coproparasitológico e ao ELISA® para detecção de coproantígenos. Os autores encontraram, em ambos casos, maior proporção de animais positivos no exame sorológico, resultado que discorda do presente estudo, que encontraram maior proporção no leite, apesar do número de amostras analisadas terem sido diferentes. Não há evidência de que o período de lactação do animal influencie na sensibilidade do ELISA para detecção de anticorpos no leite (Salimi-Bejestani et al. 2007).

Os valores preditivos são influenciados pela sensibilidade e especificidade das técnicas e também pela prevalência da enfermidade em estudo (Pereira 2008). No presente estudo o valor preditivo positivo baixo (38,23%) deve-se a baixa especificidade do ELISA. Para ambos os kits utilizados neste estudo, a baixa sensibilidade da técnica de sedimentação fecal (Foreyt 2005), explica as baixas especificidades, já que o VPP sofre influencia da prevalência e especificidade (Pereira 2008). Segundo Martins et al. (2008) a sensibilidade da técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* é de 59,8%.

Os valores dos coeficientes de kappa, para ambos kits ELISA testados, indicam uma concordância sofrível (Pereira 2008) entre essas técnicas e a técnica coproparasitológica, o que significa baixa reprodutibilidade das técnicas. Estes resultados podem ser atribuídos, também, a sensibilidade do exame de fezes utilizado, que é em torno de 60%. Apesar da alta sensibilidade do kit ELISA® comercial, mesmo após

o sucesso do tratamento da fasciolose bovina, os animais ainda persistem com altos níveis de imunoglobulinas circulantes, não diferenciando infecções ativas de precedentes (Ibarra et al. 1998). Assim, o exame coproparasitológico ainda é de extrema importância, principalmente do ponto de vista epidemiológico, já que exames imunológicos para detecção de anticorpos não podem diferenciar infecções ativas e passadas.

No Espírito Santo, a prevalência de condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate está em torno de 30% (Bernardo et al. 2011) o que resulta em preocupação dos criadores em diagnosticar os animais positivos precocemente, antes que haja danos ao fígado e principalmente para que seja possível evitar a contaminação ambiental evitando a continuidade do ciclo e conseqüentemente a infecção de novos animais. Neste sentido, o ELISA se mostrou mais sensível que o exame coproparasitológico, tendo o potencial de ser utilizado para diagnosticar e tratar infecções precoces, sendo essa sua grande vantagem. No entanto, uma análise de custo benefício deve ser realizada antes da adoção de uma técnica de diagnóstico. Isso equivale dizer que devem ser consideradas não somente a eficácia e efetividade da técnica, mas também sua eficiência.

CONCLUSÃO

Em áreas endêmicas, apesar da maior detecção de animais positivos para *Fasciola hepatica* por meio dos kits ELISA® comerciais testados, o exame coproparasitológico ainda é recomendado por apresentar maior eficiência, ou seja, é menos oneroso e de fácil execução, considerando-se que no nível de rebanho o tratamento antiparasitário é realizado em todos os animais.

Agradecimentos.- À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), projeto PROCAD 093/2007 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), órgãos financiadores das bolsas e dos recursos financeiros.

REFERÊNCIAS

- Anderson N., Wong T.T., Vo N.G., Bui K.L., Smooker P.M. & Spithill T.W. 1999. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 83:15-24.
- Bernardo C.C., Carneiro M.B., Avelar B.R., Donatele D.M., Martins I.V.F. & Pereira M.J.S. 2011. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 20(1):49-53.
- Duscher R., Duscher G., Hofer J., Tichy A., Prosl H. & Joachim A. 2011. *Fasciola hepatica* - Monitoring the milky way? The use of tank milk for liver fluke monitoring in dairy herds as base for treatment strategies. *Vet. Parasitol.* 178:273-278.
- Fairweather I. 2011. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet. Parasitol.* 180:133-143.
- Foreyt W.J. 2005. Diagnóstico parasitológico: colheita e envio de amostras, p.1-8. In: *Ibid.* (Ed.), *Parasitologia Veterinária: manual de referência.* 5ª edição. Roca, São Paulo 240p.
- Ibarra F., Montenegro N., Vera Y., Boulard C., Quiroz H., Flores J. & Ochoa P. 1998. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Vet. Parasitol.* 77:229-236.
- IBGE 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <<http://www.bngb.ibge.gov.br/menucateg.php?JOB=geocart&MOD=select&COD=3135>>
- Martins I.V.F., Bernardo C.C., Avelar B.R., Araújo I.B.B.A., Donatele D.M. & Nunes L.C. 2008. Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (Foreyt, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 17(1):110-112.
- Mezo M., González-Warleta M. & Ubeira F.M. 2007. The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J. Parasitol.* 93(1):65-72.
- Mezo M., González-Warleta M., Castro-Hermida J.A., Carro C. & Ubeira F.M. 2010. Kinetics of anti-*Fasciola* IgG antibodies in serum and milk from dairy cows during lactation, and in serum from calves after feeding colostrum from infected dams. *Vet. Parasitol.* 168:36-44.
- Molloy J.B., Anderson G.R., Fletcher T.I., Landmann J. & Knight B.C. 2005. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Vet. Parasitol.* 130:207-212.
- Pereira M.G. 2008. *Epidemiologia Teoria e Prática.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 596p.
- Reichel M.P. 2002. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Vet. Parasitol.* 1107:65-72.
- Reichel M.P., Vanhoff K. & Baxter B. 2005. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Vet. Parasitol.* 129:61-66.
- Salimi-Bejestani M.R., McGarry J.W., Felstea S., Ortiz P., Akca A. & Williams D.J. 2005. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res. Vet. Sci.* 78:177-181.
- Salimi-Bejestani M.R., Daniel R., Cripps P., Felstead S. & Williams D.J.L. 2007. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. *Vet. Parasitol.* 149:290-293.
- Sánchez-Andrade R., Paz-Silva A., Suárez J., Panadero R., Díez-Baños P. & Morondo P. 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 93:39-46.