

## AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO COMPETITIVO NA DIFERENCIAÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDOS PELA VACINA B19, NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA<sup>1</sup>

LUIF A. MATHIAS<sup>2</sup>, ALLASTAIR P. MACMILLAN<sup>3</sup>, I. GREISER-WILKE<sup>4</sup> e V. MOENNIG<sup>4</sup>

**ABSTRACT.**- Mathias L.A., MacMillan A.P., Greiser-Wilke I. & Moennig V. 1994. [Evaluation of a competitive enzyme immunoassay in the differentiation of antibodies induced by strain 19 vaccine, in the serodiagnosis of bovine brucellosis.] Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo na diferenciação de anticorpos induzidos pela vacina B19, no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 14(1):19-23. Depto Med. Veterinária Preventiva, FCAVJ-UNESP, Jaboticabal, SP 14870-000, Brazil.

A competitive enzyme immunoassay was evaluated using as conjugate monoclonal antibodies BM-38 and BM-40, prepared from mice immunized with *Brucella melitensis* 16 M. The competitive enzyme immunoassay was compared with the complement fixation test and an indirect enzyme immunoassay, regarding their efficiency and differential capacity to diagnose brucellosis in cattle vaccinated with *B. abortus* strain 19. Four hundred and twenty-one sera of vaccinated female calves, obtained between 15 days and 6 months after vaccination, were examined. The competitive enzyme immunoassay using conjugate BM-38 revealed a greater number of positive results (44,18%) than the complement fixation test (35,98%) and the competitive enzyme immunoassay using conjugate BM-40 (29,69%). This last test allowed a higher degree of differentiation than the others, since it revealed a lower number of reactors.

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

**SINOPSE.**- Foi avaliado o teste imunoenzimático competitivo, usando como conjugado os anticorpos monoclonais BM-38 e BM-40, preparados a partir da imunização de camundongos com *Brucella melitensis* 16 M, em comparação com a reação de fixação de complemento e com o teste imunoenzimático indireto, para diferenciar anticorpos da infecção natural dos induzidos pela vacina B19. Foram testados 421 soros de bezerras vacinadas com *B. abortus* amostra B19 e colhidos em intervalos de 15 dias a 6 meses após a vacinação. O teste competitivo usando o conjugado BM-38 apresentou menor capacidade de discriminação que o teste com o conjugado BM-40 (44,18% contra 29,69% de soros com títulos de anticorpos) e que a reação de fixação de complemento (44,18% contra 35,98%) e resultados próximos aos do teste imunoenzimático indireto (54,89% contra 56,17%), enquanto que o teste competitivo usando o conjugado BM-40 apresentou maior capacidade de discriminação do que os outros testes estudados, uma vez que acusou um menor número de reagentes: 28,9% contra 37,6% revelados pela reação de fixação de complemento, 29,69% contra 44,18% revelados pelo teste com o

conjugado BM-38 e 43,15% contra 56,85% revelados pelo teste imunoenzimático indireto.

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

### INTRODUÇÃO

As campanhas de combate à brucelose bovina têm como uma de suas principais armas o diagnóstico sorológico, que apresenta como vantagens a praticidade e um custo relativamente baixo. Em virtude dessas vantagens, diversas provas sorológicas têm sido utilizadas. Apesar disso, as provas sorológicas estão sujeitas a erros que podem levar tanto a resultados falso-positivos como falso-negativos, o que resulta em um empecilho no combate à enfermidade. A vacinação com a amostra B19 constitui-se numa das principais causas de resultados falso-positivos, erro esse a que a grande maioria dos testes já estudados com aquele propósito está sujeita. De acordo com Alton (1981), em torno de uma em cada 200 bezerras vacinadas mantém reações sorológicas persistentes por longos períodos.

Muitos testes sorológicos, inclusive testes imunoenzimáticos competitivos, já foram estudados com o propósito de diferenciar a reação sorológica induzida pela vacina da reação causada pela infecção. Chin et al. (1989) ava-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 12 de novembro de 1993.

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

<sup>3</sup> Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey KT15 3NB, United Kingdom.

<sup>4</sup> Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-3000 Hannover 1, Alemanha.

liaram um teste imunoenzimático competitivo, usando anticorpos monoclonais preparados por Bundesen et al. (1985), na discriminação entre animais infectados e animais vacinados com *B. abortus* amostra B19 e constataram que o teste apresentava limitado valor quando utilizado para testar soros provenientes do campo. Já Nielsen et al. (1989), usando um teste imunoenzimático competitivo realizado com anticorpos obtidos pela imunização de camundongos com *Yersinia enterocolitica* sorogrupo 09, preparados por Bundle et al. (1984), e empregando o antígeno cadeia O de *B. abortus*, concluíram ser possível diferenciar a resposta sorológica de bovinos naturalmente infectados da resposta sorológica induzida pela vacinação com *B. abortus* amostra B19.

Apesar do grande número de trabalhos de pesquisa com essa finalidade, dificilmente se pode afirmar que algum teste já desenvolvido seja capaz de diferenciar animais vacinados de animais infectados, havendo, dessa forma, necessidade de se estudar testes sorológicos que possam apresentar maior capacidade de diferenciação. Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo comparar os resultados revelados por um teste imunoenzimático competitivo, empregando anticorpos monoclonais preparados por Greiser-Wilke et al. (1985), com os resultados revelados pela reação de fixação de complemento e pelo teste imunoenzimático indireto, em soros de bovinos vacinados com *B. abortus* amostra B19.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Soros examinados

Foram testados, através do teste imunoenzimático competitivo usando os conjugados BM-38 e BM-40, 421 soros de bezerras vacinadas com uma dose padrão de *B. abortus* amostra B19. Os soros foram colhidos em intervalos de 15 dias a 6 meses após a vacinação. Desses soros, 391 foram também testados pela reação de fixação de complemento e 241 pelo teste imunoenzimático indireto.

### Teste imunoenzimático competitivo

O teste foi realizado conforme descrito por MacMillan et al. (1990). Os conjugados foram preparados com anticorpos monoclonais produzidos por dois clones de hibridomas, BM-38 e BM-40, resultantes da imunização de camundongos da linhagem BALB/C com *B. melitensis* amostra 16 M (Greiser-Wilke et al., 1985). Esses anticorpos monoclonais foram conjugados com peroxidase. O antígeno empregado no teste consistiu de lipopolissacáride (LPS) de *B. abortus* amostra 99, extraído pelo método água quente-fenol quente, descrito por Baker & Wilson (1965). A densidade ótica foi determinada em um aparelho Titertek Multiskan MCC/340.

### Teste imunoenzimático indireto

O teste foi realizado conforme descrito por Jeggo & Rothauer (1989). Utilizou-se um conjugado comercial constituído por IgG de coelho anti-IgG de bovino, conjugada com peroxidase (ICN Immunobiologicals, Israel). O antígeno empregado consistiu também no lipopolissacáride de *B. abortus* amostra 99 e a leitura da densidade ótica foi realizada no mesmo aparelho citado anteriormente.

### Reação de fixação de complemento

A reação de fixação de complemento foi realizada em microplacas, empregando-se 1,25 unidades de complemento e incubação a 37° C, por 30 minutos, nas duas fases da reação (Brinley-Morgan et al. 1978).

### Análise estatística

Para verificar se houve independência entre os resultados revelados pelas provas sorológicas, empregou-se o teste de  $\chi^2$ . Para se efetuar essa análise, os resultados das provas foram classificados em positivos ou negativos. No teste imunoenzimático competitivo, considerou-se como positivo qualquer título obtido e na reação de fixação de complemento considerou-se como positivo o soro com título a partir de 1/4.

### Cálculo da concordância

A concordância foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Positivos ambos os testes} + \text{negativos ambos os testes}}{\text{Total de soros}} \times 100$$

Os soros foram classificados em positivos ou negativos conforme o critério mencionado no item anterior.

## RESULTADOS

A maior parte dos soros de bovinos vacinados com *B. abortus* amostra B19 não apresentou título de anticorpos pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) usando o conjugado BM-38 ou pela reação de fixação de complemento (RFC). O TIEC revelou a presença de anticorpos em 167 (44,18%) soros, enquanto que a RFC detectou anticorpos em 136 (35,98%) dos 378 soros examinados. Dos 242 soros que não apresentaram título pela RFC, 35 (14,46%) apresentaram títulos pelo TIEC e dos 211 soros negativos por este teste, apenas quatro (1,9%) apresentaram títulos pela RFC (Quadro 1). Considerando-se como positivos para o TIEC os títulos a partir de 1/2 e para a RFC os títulos a partir de 1/4, observa-se uma concordância de 83,33% entre as duas provas. O teste de  $\chi^2$  revelou, com segurança de 99,5%, dependência entre os resultados revelados pelas duas provas ( $\chi^2 = 181,26$ , com 2 graus de liberdade).

Quadro 1. Número de soros de bovinos vacinados contra brucelose, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos anti-Brucella (recíproca da diluição) revelados pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) realizado com o conjugado BM-38, em comparação com os títulos revelados pela reação de fixação de complemento (RFC)

RFC	TIEC (BM-38)							Total
	0	2	4	8	16	32	64	
0	207	12	23	0	0	0	0	242
2	4	3	24	1	0	0	0	32
4	0	0	4	9	0	0	0	13
8	0	0	3	12	1	0	0	16
16	0	0	3	7	8	0	0	18
32	0	0	0	8	22	1	0	31
64	0	0	0	2	8	7	1	18
128	0	0	0	0	1	5	2	8
Total	211	15	57	39	40	13	3	378

De 391 soros de bovinos vacinados com a amostra B19, 113 (28,9%) apresentaram títulos de anticorpos contra *Brucella* pelo TIEC usando o conjugado BM-40 e 147 (37,6%) apresentaram títulos através da RFC. Dos 278 soros que não apresentaram qualquer título pelo TIEC, 35 (12,59%) apresentaram títulos pela RFC, ao passo que, dos 244 soros que não apresentaram título pela RFC, apenas um (0,41%) apresentou título, de 1/4, pelo TIEC (Quadro 2). Constatou-se uma concordância de 95,9% entre as duas provas. O teste de  $X^2$  também revelou dependência significativa entre os resultados dessas duas provas ( $X^2 = 316,48$ , com 2 GL).

Quadro 2. Número de soros de bovinos vacinados contra brucelose, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos anti-*Brucella* (recproca da diluição) revelados pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) realizado com o conjugado BM-40, em comparação com os títulos revelados pela reação de fixação de complemento (RFC)

RFC	TIEC (BM-40)						Total
	0	2	4	8	16	32	
0	243	1	0	0	0	0	244
2	29	4	5	0	0	0	38
4	2	1	7	1	0	0	11
8	2	1	10	5	0	0	18
16	2	0	5	8	4	0	19
32	0	0	10	12	13	0	35
64	0	0	4	10	3	1	18
128	0	0	1	4	1	2	8
Total	278	7	42	40	21	3	391

O TIEC usando o conjugado BM-38 revelou anticorpos em um maior número de soros de bovinos vacinados do que o mesmo teste usando o conjugado BM-40. De 421 soros, 186 (44,18%) apresentaram títulos de anticorpos quando testados com o conjugado BM-38 e 125 (29,69%) apresentaram títulos quando testados com o conjugado BM-40. Nenhum dos soros negativos com o conjugado BM-38 apresentou título com o conjugado BM-40, enquanto que dos 296 soros negativos com o conjugado BM-40, 61 apresentaram títulos, de até 1/8, quando testados com o conjugado BM-38 (Quadro 3). A concordância entre os dois testes, considerando-se como positivos os títulos a partir de 1/2, foi de 85,51%. Foi

Quadro 3. Número de soros de bovinos vacinados contra brucelose, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos anti-*Brucella* (recproca da diluição) revelados pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) realizado com o conjugado BM-38, em comparação com os títulos revelados pelo mesmo teste realizado com o conjugado BM-40

TIEC (BM-40)	TIEC (BM-38)						Total	
	0	2	4	8	16	32		64
0	235	19	40	2	0	0	0	296
2	0	0	4	2	1	0	0	7
4	0	0	18	23	11	2	0	54
8	0	0	0	16	12	9	0	37
16	0	0	0	1	18	4	1	24
32	0	0	0	0	0	1	2	3
Total	235	19	62	44	42	16	3	421

observada, através do teste de  $X^2$ , uma dependência entre os resultados revelados pelos dois testes ( $X^2 = 224,59$ , com 2 GL).

O teste imunoenzimático indireto (TIEI) apresentou 132 (56,17%) resultados positivos em 235 soros de bovinos vacinados contra brucelose. Destes mesmos soros, o TIEC usando o conjugado BM-38 revelou 129 (54,89%) com algum título de anticorpos. Dos 103 soros negativos pelo teste indireto, dez (9,71%) apresentaram títulos, de até 1/8, pelo teste competitivo, enquanto que dos 106 soros com resultados negativos por este último, 13 (12,26%) apresentaram resultados positivos pelo teste indireto (Quadro 4). Observou-se uma concordância de 90,21% entre as duas provas. O teste de  $X^2$  revelou dependência entre os resultados das duas provas ( $X^2 = 151,2$ , com 2 GL).

Quadro 4. Número de soros de bovinos vacinados contra brucelose, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos anti-*Brucella* (recproca da diluição) revelados pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) realizado com o conjugado BM-38, em comparação com os títulos revelados pelo teste imunoenzimático indireto (TIEI)

TIEI	TIEC (BM-38)						Total	
	0	2	4	8	16	32		64
Negativo	93	0	8	2	0	0	0	103
Positivo	13	4	17	36	42	17	3	132
Total	106	4	25	38	42	17	3	235

Enquanto o TIEI revelou resultados positivos em 137 (56,85%) de 241 soros de bovinos vacinados, o TIEC usando o conjugado BM-40 revelou títulos de anticorpos em 104 (43,15%). De 104 soros negativos pelo teste indireto, apenas quatro (3,85%) apresentaram títulos, de até 1/4, pelo teste competitivo, enquanto que dos 137 soros que não apresentaram título pelo teste competitivo, 37 (27,01%) apresentaram resultados positivos pelo teste indireto (Quadro 5). A concordância observada entre os dois testes foi de 82,99%. Observou-se dependência entre os resultados das duas provas ( $X^2 = 115,23$ , com 2 GL).

Quadro 5. Número de soros de bovinos vacinados contra brucelose, distribuídos de acordo com os títulos de anticorpos anti-*Brucella* (recproca da diluição) revelados pelo teste imunoenzimático competitivo (TIEC) realizado com o conjugado BM-40, em comparação com os títulos revelados pelo teste imunoenzimático indireto (TIEI)

TIEI	TIEC (BM-40)						Total	
	0	2	4	8	16	32		64
Negativo	100	1	3	0	0	0	0	104
Positivo	37	2	37	33	24	4		137
Total	137	3	40	33	24	4		241

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o teste imunoenzimático competitivo (TIEC) usando o conjugado BM-38 apontou um maior número de animais reagentes do que a reação de fixação de complemento -

RFC (Quadro 1), ao passo que o mesmo teste usando o conjugado BM-40 revelou menor número de animais reagentes do que a RFC (Quadro 2). Estes dados mostram que a elevada capacidade de detecção do teste competitivo usando o conjugado BM-38 atribuiu a esse teste menor poder de discriminação do que à RFC, enquanto que o TIEC usando o conjugado BM-40 demonstrou maior capacidade de discriminação dos títulos induzidos pela vacinação do que a RFC. Embora a RFC não seja capaz de diferenciar bovinos vacinados de bovinos infectados, esta prova apresenta maior especificidade que a maioria das provas rotineiramente usadas no diagnóstico da brucelose (Dohoo et al. 1986). O fato de o TIEC usando o conjugado BM-40 ter apresentado maior poder de discriminação, em soros de animais vacinados, significa que, apesar de esta prova não ter sido capaz de fornecer uma diferenciação desejada entre as duas situações, ela apresentou-se vantajosa, quanto a esse propósito, em relação à RFC. Estes resultados diferem um pouco dos achados de Sutherland (1985a), o qual verificou que o TIEC apresentou o mesmo desempenho da RFC, tendo este autor concluído que o TIEC apresenta as mesmas falhas das outras provas sorológicas, ao serem utilizadas no diagnóstico da brucelose em bovinos vacinados com a amostra B19. Da mesma forma, Sutherland & Den Hollander (1986) constataram que o teste competitivo apresentou pouca vantagem em relação à RFC, na diferenciação entre animais infectados e animais vacinados.

Comparando-se os resultados do TIEC com os resultados do teste imunoenzimático indireto (TIEI), ao se testarem soros de animais vacinados, verifica-se que o teste competitivo, usando o conjugado BM-38, indicou um número de animais com resultado positivo próximo ao indicado pelo teste indireto (Quadro 4), o qual, por sua elevada capacidade de detecção, costuma apresentar reduzida especificidade quando usado para testar animais vacinados (Cargill et al. 1988, Sutherland 1985b, Larsen et al. 1988). O TIEC usando o conjugado BM-40 revelou menor número de reagentes que o TIEI (Quadro 5), indicando para aquele teste maior poder de discriminação que o TIEI. Da mesma forma, Rylatt et al. (1985) deduziram que o TIEC demonstrou superioridade em relação ao TIEI, na discriminação entre animais imunizados e animais infectados.

Nielsen et al. (1989), empregando conjugado preparado com os anticorpos monoclonais YsT9-2 e o antígeno cadeia O de *B. abortus*, concluíram que o teste imunoenzimático competitivo era capaz de diferenciar bovinos infectados de bovinos vacinados com a amostra B19. Um aspecto importante a ser considerado na metodologia utilizada por aqueles autores é o fato de terem testado os soros na diluição 1/50. No presente trabalho, os soros foram testados a partir da diluição 1/2, o que explica o percentual relativamente elevado de animais reagentes, sendo que com o conjugado BM-38 os títulos mais elevados foram de 1/64 e com o conjugado BM-40 foram de 1/32. No entanto, ao se testarem, com os conjugados BM-38 e

BM-40, soros de bovinos comprovadamente infectados, é comum a observação de títulos de anticorpos inferiores a 1/50 (dados não apresentados). Isto significa que, em que pese o maior poder de discriminação do teste empregado por aqueles autores, ao se testarem soros, de bovinos infectados, na diluição 1/50 corre-se o risco de se obter uma proporção não desprezível de resultados falso-negativos.

Comparando-se os dois conjugados empregados no presente trabalho, observou-se que o TIEC usando conjugado preparado com os anticorpos monoclonais BM-40 apresentou maior poder de discriminação que o mesmo teste usando o conjugado BM-38. Diferenças também são observadas quando se comparam os resultados com aqueles obtidos por outros autores. Neste caso, é importante considerar as características dos anticorpos usados na preparação dos conjugados, uma vez que o comportamento do teste imunoenzimático competitivo depende da especificidade e da afinidade desses anticorpos.

## REFERÊNCIAS

- Alton G.G. 1981. The control of bovine brucellosis. Recent developments. *World An. Rev.* 39:17-24.
- Baker P.J. & Wilson J.B. 1965. Hypoferremia in mice and its application to the bioassay of endotoxin. *J. Bacteriol.* 90:903-910.
- Brinley-Morgan W.J., MacKinnon D.J., Gill K.P.W., Gower S.G.M. & Norris P.J.W. 1978. *Brucellosis Diagnosis: Standard Laboratory Techniques*. 2nd ed. Booklet 2084, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Weybridge. 53 p.
- Bundesen P.G., Wyatt D.M., Cottis L.E., Blake A.S., Massingham W.A., Fletcher W.A., Street G., Welch J.S. & Rylatt D.B. 1985. Monoclonal antibodies directed against *Brucella abortus* cell surface antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 8:245-260.
- Bundle D.R., Gidney M.A.J., Perry M.B., Duncan J.R. & Cherwonogrodzky J.W. 1984. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 09 0-antigens by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 46:389-393.
- Cargill C., Lee K. & Clarke I. 1988. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in a bovine brucellosis eradication program. *Aust. Vet. J.* 62:49-52.
- Chin J., Daniels J. & Bundesen P. 1989. Bovine brucellosis: evaluation of field sera by a competitive and superimposable ELISA utilizing a monoclonal antibody against *Brucella abortus* lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20:109-118.
- Dohoo I.R., Wright P.F., Ruckerbauer G.M., Samagh B.S., Robertson F.J. & Forber L.B. 1986. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Res.* 50:485-493.
- Greiser-Wilke I., Moennig V., Thon D. & Rauter K. 1985. Characterization of monoclonal antibodies against *Brucella melitensis*. *Zbl. Vet. Med. B* 32:616-627.
- Jeggo M.H. & Rothauer D. 1989. ELISA Kit for the Detection of Antibodies against *Brucella abortus*. International Atomic Energy Agency, Vienna. 25 p.
- Larsen J.W.A., Webber J.J. & Edwards L.D. 1988. A field outbreak of bovine brucellosis - comparison of CFT, ELISA and culture results. *Aust. Vet. J.* 65:30-31.
- 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.
- Nielsen K., Cherwonogrodzky J.W., Duncan J.R. & Bundle D.R. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am. J. Vet. Res.* 50:5-9.
- 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.* 8:261-271.
- Sutherland S. 1985a. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Brucella abortus* in cattle using monoclonal antibodies. *Aust. Vet. J.* 62:264-268.
- Sutherland S. 1985b. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for the detection of specific antibody in cattle vaccinated and challenged with *Brucella abortus*. *J. Clin. Microbiol.* 22:44-47.
- Sutherland S.S. & Den Hollander L. 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.