

# ELISA PROTEÍNA-G PARA O DIAGNÓSTICO DE AGALAXIA CONTAGIOSA EM PEQUENOS RUMINANTES

CAMPOS, A.C.<sup>1</sup>; TELES, J.A.A.<sup>2</sup>; AZEVEDO, E.O.<sup>2</sup>; NASCIMENTO, E.R.<sup>3</sup>  
OLIVEIRA, M.M.M.<sup>1</sup>; NASCIMENTO, S.A.<sup>1</sup>; CASTRO, R.S.<sup>1\*</sup>

## RESUMO

Ensaio imunoenzimático indireto utilizando antígeno total (ELISA-Gt) e sonificado (ELISA-Gs) de *Mycoplasma agalactiae* e conjugado de proteína-G foi padronizado para detecção de anticorpos em caprinos. A padronização da técnica foi realizada utilizando soros caprinos com e sem sinais clínicos de agalaxia contagiosa. Quarenta e seis soros caprinos coletados com intervalo de 45 dias, obtidos em rebanho infectado com sinais clínicos e 40 soros caprinos de rebanhos livres da infecção foram utilizados para avaliação da técnica. A presença de *M. agalactiae* no rebanho foi confirmada por cultivo de leite em meio Hayflick modificado. Não houve diferença significativa entre os valores da razão positivo/negativo (P/N) dos soros controles quando utilizado antígeno total ou sonificado. A sensibilidade relativa do ELISA-Gt e ELISA-Gs foi de 77,27% e 88,63%, respectivamente, enquanto a especificidade foi de 95,24% para ambos. Pesquisa de anticorpos no rebanho infectado revelou aumento significativo dos percentuais de densidade óptica (DO) em soros caprinos, coletados com intervalo de 45 dias. Conclui-se que os ELISA podem ser úteis para identificação de rebanhos acometidos por agalaxia contagiosa de pequenos ruminantes, com uma relativa vantagem para o ELISA-Gs.

**Palavras-chave:** caprinos, *Mycoplasma* spp, sorologia, diagnóstico.

## INTRODUÇÃO

*Mycoplasma agalactiae* é o principal agente da Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC), enfermidade mundialmente disseminada, caracterizada por mastite, agalaxia, poliartrite e ceratoconjutivite. *M. capricolum* subesp. *capricolum*, *M. mycoides* subesp. *mycoides* LC, *M. putrefaciens* e *M. arginini* também podem estar envolvidos (CORRALES et al., 2007).

No Brasil, ACOG foi identificada nos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco, com morbidade de até 100% e mortalidade em animais jovens e adultos em torno de 90% e 5%, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006).

O diagnóstico baseia-se no isolamento do *M. agalactiae* ou na pesquisa de anticorpos. Pela consistência dos resultados os ELISA têm sido amplamente utilizados (PÉPIN et al., 2003; FUSCO et al., 2007).

A proteína-G possui grande afinidade com imunoglobulinas G (IgG) de caprinos e ovinos (AKERSTROM et al., 1985), sua aplicação possibilita a realização simultânea do teste para as duas espécies, com redução de reações falso-positivas como descrito por Lambert et. al. (1998).

No Brasil não existe uma rotina de diagnóstico sorológico para ACOG, o que impede o avanço do controle da enfermidade. Neste sentido, objetivo u-se

---

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos - Recife - Pernambuco - CEP 52171-900

<sup>2</sup> Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Campina Grande. Cx postal 64 - Patos - Paraíba - CEP 58700-970

<sup>3</sup> Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense- Rua Vital Brasil, 64, Santa Rosa, Niterói- Rio de Janeiro - CEP: 24320-340

\* Autor para correspondência: rscastro@ufrpe.br

padronizar um ELISA indireto com proteína-G para detecção de anticorpos anti-*M. agalactiae* em caprinos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para produção do antígeno, *M. agalactiae* cultivado e identificado conforme Azevedo et al. (2006), foi lavado e ressuspenso (antígeno total). Parte deste produto foi submetida à sonicação (antígeno sonicado). A concentração protéica foi determinada pelo método Sedmak e Grossberg (1977).

Para os ELISA-Gt (antígeno total) e ELISA-Gs (antígeno sonicado), utilizou-se conjugado de proteína G-peroxidase e peróxido de hidrogênio adicionado de TMB como substrato. Soros caprinos de rebanhos infectados e não infectados, confirmados por isolamento foram utilizados, incluindo soros de um rebanho afetado por ACOC, não tratado, submetido a dois testes com intervalo de 45 dias. Para determinar a especificidade do teste, soros de coelhos hiperimunizados contra *M. capricolum*, *M. arginini*, *M. putrefaciens* e *M. agalactiae*, foram utilizados.

O resultado de cada soro testado foi expresso de acordo com Castro et al. (1999). Para estimativa preliminar do ponto de corte considerou-se a média dos percentuais de 40 caprinos negativos mais três desvios-padrão (CASTRO, 1998). A repetibilidade do teste foi avaliada conforme recomendações da OIE (2006). Os ELISA foram avaliados considerando seus valores intrínsecos (sensibilidade e especificidade), e o indicador de concordância ajustado ( $Kappa=k$ ) (PEREIRA, 1999), com base no teste de 86 soros caprinos de rebanhos com e sem ACOC.

## 3 RESULTADOS

Utilizando as concentrações de 0,12 µg/ml do antígeno total e de 0,13 µg/ml do sonicado, equivalentes a diluição 1/400, com os soros diluídos 1/100, obteve-se uma intensa discriminação dos positivos e negativos, com razão P/N de 46,2 e 42,8 respectivamente. O ponto de corte preliminarmente estimado foi de 7,66% para o ELISA-Gt e de 5,9% para o ELISA-Gs. O ELISA-Gt apresentou coeficiente de variação interplacas de 4,2% e o ELISA-Gs de 5,1%.

Os ELISA quando testados frente aos soros hiperimunes de coelhos contra *M. agalactiae*, *M. arginini*, *M. capricolum*, *M. putrefaciens* apresentaram reações positivas nos três primeiros e reação negativa para *M. putrefaciens*.

Os resultados dos soros caprinos testados pelos ELISA estão apresentados nas tabelas 1 e 2, com os respectivos parâmetros empregados na avaliação dos testes.

Tabela 1 - Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gt em comparação com o isolamento de *M. agalactiae*.

Teste	<i>M. agalactiae</i> *			
	Positivo	Negativo	Total	
ELISA-Gt	Positivo	34	2	36
	Negativo	10	40	50
Total	44	42	86	

\* Verdadeiros positivos = 44 amostras de animais positivos no cultivo; Verdadeiros negativos = 2 amostras de animais negativos ao cultivo e 40 de rebanhos livres. Sensibilidade = 77,27%; Especificidade = 95,24%;  $Kappa = 0,72$  (boa concordância).

Tabela 2 - Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gs em comparação com o isolamento de *M. agalactiae*.

Teste		<i>M. agalactiae</i> *		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA-Gs	Positivo	39	2	41
	Negativo	5	40	45
Total		44	42	86

\* Verdadeiros positivos = 44 amostras de animais positivos no cultivo; Verdadeiros negativos = 2 amostras de animais negativos ao cultivo e 40 de rebanhos livres. Sensibilidade = 88,63%; Especificidade = 95,24%; *Kappa* = 0,84 (ótima concordância).

Os resultados dos testes aplicados às amostras de soros do rebanho afetado por ACOC colhidas com intervalo de 45 dias em paralelo ao isolamento de *M. agalactiae* estão representados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gt em comparação com o isolamento de *M. agalactiae* de um surto de agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, com intervalo de 45 dias.

Teste		<i>M. agalactiae</i> * (1 <sup>a</sup> Coleta)		<i>M. agalactiae</i> (2 <sup>a</sup> Coleta)	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
ELISA-Gt	Positivo	11	2	21	2
	Negativo	10	0	0	0
Total		21	2	21	2

\* Isolamento de amostras de leite.

Tabela 4 - Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gs em comparação com o isolamento de *M. agalactiae* de um surto de agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, com intervalo de 45 dias.

Teste		<i>M. agalactiae</i> * (1 <sup>a</sup> Coleta)		<i>M. agalactiae</i> * (2 <sup>a</sup> Coleta)	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
ELISA-Gs	Positivo	16	2	21	2
	Negativo	5	0	0	0
Total		21	2	21	2

\* Isolamento de amostras de leite.

Os valores dos percentuais das DO no período de monitoramento do rebanho estão representados nas figuras 1 e 2. Observa-se um aumento das leituras na segunda coleta em todos os animais, quando comparados com a primeira.

Figura 1. Percentuais das DO de caprinos testados no ELISA-Gt, entre duas coletas intervaladas de 45 dias.

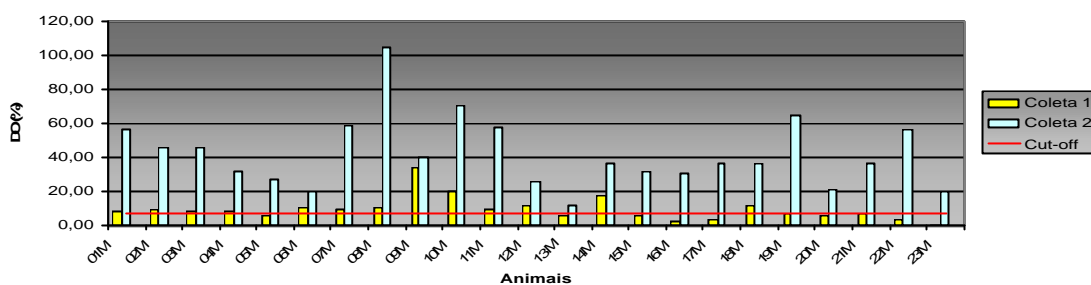
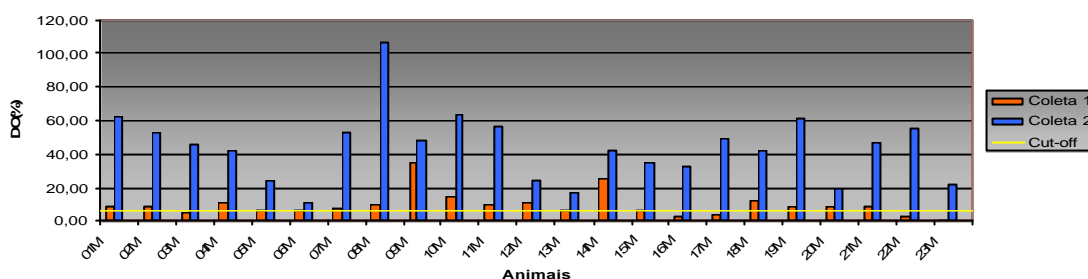


Figura 2. Percentuais das DO de caprinos testados no ELISA-Gs, entre duas coletas intervaladas de 45 dias.



#### 4 DISCUSSÃO

As concentrações dos antígenos utilizadas neste trabalho foram inferiores as relatadas, por Fusco et al. (2007), mantendo-se adequados padrões para diferenciação entre soros positivos e negativos, com maior economia dos reagentes.

Resultados discordantes aos obtidos neste trabalho foram relatados por Dawo e Mohan (2007), em um ELISA para o diagnóstico de *M. crocodyli*. Os autores encontraram resultados inconsistentes na discriminação entre positivos e negativos ao compararem o antígeno total com o sonicado.

Os ELISA-Gt e ELISA-Gs demonstraram alta repetibilidade, com coeficiente de variação inferior ao limite de 20% recomendado pela OIE, o que é altamente desejável na padronização de um método diagnóstico (OIE, 2006).

Por sua grande afinidade com as IgG de caprinos e ovinos (AKERSTROM et al., 1985), a utilização da proteína-G em um ELISA para o diagnóstico de ACOC, permitirá o teste de caprinos e ovinos simultaneamente, com redução de reações falso-positivas (LAMBERT et al., 1998).

Comparando os resultados dos ELISA com os apresentados por Pépin et al. (2003) verifica-se uma semelhança em termos de especificidade, mas com divergência quanto a sensibilidade.

Resultados positivos obtidos nos ELISA quando soros de coelhos hiperimunizados contra *M. arginini* e *M. capricolum* foram testados, sugerem a presença de proteínas homólogas entre estas espécies e *M. agalactiae*, mesmo sendo distantes filogeneticamente (WOUBIT et al., 2007). Resultado negativo do soro contra *M. putrefaciens* precisa ser melhor investigado. Do ponto de vista clínico-epidemiológico, este achado não interfere significativamente no diagnóstico, visto que estes microrganismos podem estar associados em casos de ACOC (CORRALES et al., 2007). A presença de reações cruzadas poderá ser resolvida a partir da produção de antígenos

purificados e utilização de proteínas recombinantes (WOUBIT et al., 2007; ALBERTI et al., 2008).

Resultados discordantes entre sorologia e isolamento podem ser justificados pelas limitações de ambas as técnicas. Este fenômeno pôde ser observado no rebanho utilizado para avaliação dos ELISA. Nesta propriedade, as coletas foram realizadas no início da infecção quando ainda não havia sido utilizado antibiótico para o tratamento da enfermidade, o que poderia ter influenciado os resultados dos cultivos.

Resultados negativos nos ELISA na primeira coleta, provavelmente deveram-se aos animais que ainda não tinham se infectado ou que não possuíam níveis de anticorpos suficientes para serem detectados.

Na segunda coleta, 100% dos animais foram positivos aos dois ELISA, com elevação significativa dos percentuais de DO. Aumento dos valores de DO tem sido observados após imunização (GRECO et al., 2002; DE la FE et al., 2007). Estes achados justificam a necessidade de monitoramento dos rebanhos para definição do perfil sorológico dos animais, contribuindo para o entendimento da dinâmica epidemiológica da doença.

Como a padronização do ELISA-Gt e ELISA-Gs foi baseada na utilização de um pequeno número de animais, recomenda-se a aplicação destes testes em um maior número de amostras de caprinos pertencentes a rebanhos infectados e não infectados por *M. agalactiae*.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, considera-se que os ELISA padronizados podem ser úteis para a identificação de infecções por *M. agalactiae* em rebanhos caprinos, com maior sensibilidade relativa e nível de concordância do ELISA-Gs quando comparado ao ELISA-Gt.

## 6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de PIBIC e Mestrado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI, A.; ROBINO, P.; CHESSA, B.; ROSATI, S.; ADDIS, M. F.; MERCIER, P.; MANNELLI, A.; CUBEDDU, T.; PROFITI, M.; BANDINO, E.; THIERY, R.; PITTAU, M. Characterisation of *Mycoplasma capricolum* P60 surface lipoprotein and its evaluation in a recombinant ELISA. **Vet. Microbiol.**, v.128, p.81–89, 2008.
- AKERSTRÖM, B.; BRODIN, T.; REIS, K.; BJÖRCK, L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **J. Immunol.**, v.135, n.4, p.2589-2592, 1985.
- AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; TABOSA, I.M.; NASCIMENTO, E.R.; FARIAS, A.A.; CASTRO, R.S.; CAMPOS, C.A.M. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats in Brazil. Epidemiologic findings. **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.
- AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.M.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.D.; RODRIGUES, A.R.O.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 576-581, 2006.

CASTRO, R.S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios filogenéticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas.** 1998. 132p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M., GOUVEIA, A.M.G. A labelled avidin- biotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis vírus in goats sera. **Vet. Res. Commun.**, v.23, p.512-522, 1999.

CORRALES, J.C.; ESNAL, A.; DE LA FE, C.; SANCHEZ, A.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Rum. Res.** v. 68, p. 154–166, 2007.

DAWO, F.; MOHAN, K. Development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to *Mycoplasma crocodyli* infection in crocodiles (*Crocodylus niloticus*). **Vet. Microbiol.**, v. 119, p. 283–289, 2007.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; SAAVEDRA, P.; TOLA, S.; POVEDA, C.; POVEDA, J.B. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. **Vaccine.**, v. 25, n. 12, p. 2340-2345, 2007.

FUSCO, M.; CORONA, L.; ONNI, T.; MARRAS, E.; LONGHEU, C.; IDINI, G. ; TOLA, S. Development of a sensitive and specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on recombinant antigens for rapid detection of antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in sheep. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 4, p. 420–425, 2007.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; BUONAVOGLIA, D.; ALIBERTI, A.; FASANELLA, A. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **New Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 17-20, 2002.

LAMBERT, M.; CALAMEL, M.; DUFOUR, P.; CABASSE, E.; VITU, C.; PÉPIN, M. Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 10, p. 326-330, 1998.

NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; PLATENIK, M.O.; AZEVEDO, E.O.; TABOSA, I.M.; ALCÂNTARA, M.D.B.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, M.G.F. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 45-46, 2002.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2006. Disponível em: <http://www.oie.int>, acesso: fev/2007.

PÉPIN, M.; DUFOUR, P.; LAMBERT, M.; AUBERT, M.; VALOGNES, A.; ROTIS, T.; VAN de WIELE, A.; BERGONIER, D. Comparison of three enzyme-immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, p. 281-285, 2003.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: teoria e prática.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999, 596p.

SEDMAK, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Anal. Biochem.**, v.79, p. 544-552, 1977.

WOUBIT, S.; MANSO-SILVÁN, L.; LORENZON, S.; GAURIVAUD, P.; POUMARAT, F.; PELLET, M-P.; SINGH, V.P.; THIAUCOURT, F. A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: Application to the diagnosis of contagious agalactia. **Mol. Cell. Probes**, v. 21, p. 391–399, 2007.