

# APLICAÇÃO DO TESTE DE ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*m. paratuberculosis* EM UM REBANHO BOVINO LEITEIRO, DO ESTADO DE SÃO PAULO, SOB MONITORAMENTO SANITÁRIO

\*DIB<sup>1</sup>, C.C.; DEL FAVA<sup>2</sup>, E.; BALDASSI<sup>3</sup>, L.; ARCARO<sup>4</sup>, J.R.P.; POZZI<sup>4</sup>, C.R.; ROXO<sup>5</sup>, E.

## RESUMO:

Amostras de soro sanguíneo, colhidas com a finalidade de realizar exames de monitoramento para Brucelose, de um rebanho bovino leiteiro, localizado no Estado de São Paulo, livre de Tuberculose bovina e sem sintomatologia clínica da Doença de Johne, mas com grande ocorrência de reações inespecíficas ao teste de tuberculina, foram utilizadas para averiguar a ocorrência de anticorpos anti-*M. paratuberculosis* por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA). O rebanho é monitorado semestralmente e as 75 amostras utilizadas, provenientes de 36 animais, foram obtidas nos meses de agosto de 2004, fevereiro de 2005 e março de 2006. Comparando-se os resultados obtidos nos testes de ELISA com os resultados do Teste cervical comparativo (TCC), recomendado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, e realizado na mesma ocasião de coleta das amostras de soro, observou-se uma tendência de variação entre ambos ( $r=0,2304$ ) significativa ( $p=0,0467$ ), porém não assumiu variação linear. Assim, pareceu haver uma correlação entre a infecção por micobactérias ambientais, avaliada pela resposta ao PPD Aviário e a detecção de anticorpos anti-*M. paratuberculosis* nos animais analisados, contudo o ponto de corte da reação estabelecida pelos protocolos de teste permitiu avaliar a especificidade do teste de ELISA em 97% (grau de confiança de 95%).

Palavras-chave: *Mycobacterium*, paratuberculosis, ELISA, bovino

## 1. INTRODUÇÃO

A paratuberculose ou Doença de Johne é uma doença infecciosa de curso crônico, que pode produzir nos ruminantes adultos, diarreia, emaciação e lesões intestinais. Também conhecida como síndrome da má absorção intestinal é causada pela proliferação do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e por infiltração mononuclear. Como consequência, ocorre perda de proteínas devido à enterite, observando-se uma diminuição marcante do peso do animal enfermo (Senasa, 2000).

---

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Genética e Reprodução Animal, <sup>4</sup> CAPTA Bovinos de Leite, Instituto de Zootecnia. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Rua Heitor Penteado, 56. CEP13460-000 Nova Odessa, SP, Brasil. E-mail: corsi@iz.sp.gov.br.

<sup>3</sup>Laboratório de Anatomia Patológica, <sup>5</sup>Laboratório de Tuberculose Bovina, Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, SP, Brasil.

A resposta imune gerada pela infecção dos animais por *Mycobacterium paratuberculosis* pode causar interferências nas provas de intradermorreação tuberculínica, levando a resultados falso-positivos, e podendo determinar o abate obrigatório desnecessário de animais sadios (Ferreira et al. 2005). Propriedades alergênicas do *M. paratuberculosis* e do *M. avium* são estreitamente relacionadas e a tuberculina aviária pode ser usada para o diagnóstico da doença de John, assim, os resultados dos testes comparativos não refletem necessariamente a real incidência de infecção por *M. avium*, pois a sensibilização pode estar relacionada a outras micobactérias ambientais (Worthington 1967). Apesar disto, estudos epidemiológicos envolvendo a ocorrência de reações inespecíficas no diagnóstico da tuberculose bovina, e suas possíveis causas, raramente são encontrados.

A pesquisa de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* através do emprego de um kit comercial visou avaliar o desempenho diagnóstico deste nas condições do Estado de São Paulo a fim de verificar sua especificidade e a possibilidade de reação cruzada pela infecção com micobactérias ambientais e, assim, possibilitar a implantação de mais um recurso diagnóstico para fins de vigilância epidemiológica na avaliação sanitária de bovinos tanto autóctones para fins de exportação, como daqueles importados de regiões de risco.

Tendo em vista a disseminação da paratuberculose em todo o mundo, a grande quantidade de animais e seus subprodutos importados de países norte-americanos e europeus nas décadas passadas, e a inexistência de informações consistentes sobre a situação da paratuberculose nos rebanhos brasileiros, e sua possível relação com o desenvolvimento de reações inespecíficas ao teste da tuberculina, este trabalho foi delineado com o objetivo de avaliar a presença de anticorpos anti-*M. paratuberculosis* em amostras de soro colhidas em monitoramentos sanitários de doenças reprodutivas e comparar estes resultados com os obtidos no teste de tuberculina comparativo, em um rebanho leiteiro do Estado de São Paulo, livre de Tuberculose, mas com alta frequência de reações inespecíficas aos testes tuberculínicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 75 amostras de soro, provenientes de 36 animais, colhidas semestralmente para realização de exames sanitários de monitoramento de Brucelose, e dados dos testes tuberculínicos obtidos por meio da medição da

prega da pele antes e após a aplicação das tuberculinas aviária e bovina, durante a realização do teste cervical comparativo (TCC) de rotina, em um rebanho bovino leiteiro livre de Tuberculose, rigorosamente monitorado para as principais doenças, mas no qual freqüentemente se observa a ocorrência de reações inespecíficas no TCC, porém sem relato de manifestações clínicas que sugerissem doença de Johnne.

As amostras foram avaliadas por meio do teste ELISA HerdChek<sup>1</sup>, devidamente autorizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, para verificação da ocorrência de anticorpos anti-*M. paratuberculosis*, comparando os resultados à resposta do teste cervical comparativo – TCC. Resultados maiores que 0.250 em valores de A/P (amostra em relação ao positivo) são considerados como positivos pelo fabricante.

A avaliação estatística dos resultados obtidos no presente trabalho foi processada através do teste exato de Fisher para análise de contingência e pelo coeficiente de correlação de Pearson (Siegel 1975), calculados pelo Programa GraphPad InStat versão 3.01.

### 3. RESULTADOS

Foram analisadas pela técnica de ELISA, 75 amostras de soros sanguíneos obtidas de 36 animais correspondentes aos períodos de agosto de 2004, fevereiro de 2005 e março de 2006, das quais apenas duas amostras foram positivas para anticorpos anti-*M. paratuberculosis*, sendo que os animais não reagiram ao PPD aviário. Entre os 8 animais reagentes ao PPD aviário, nenhum apresentou valor de A/P maior que 0.250, considerado positivo (Tabela I).

No teste de correlação de Pearson, assumindo uma distribuição normal, observou-se uma tendência de variação entre a resposta ao teste de ELISA para diagnóstico de paratuberculose e a resposta ao PPD aviário no Teste Cervical Comparativo ( $r=0,2304$ ) significativa ( $p=0,0467$ ), que porém não assumiu variação linear.

TABELA I

Resposta ao teste de ELISA para diagnóstico de paratuberculose e ao Teste cervical comparativo em bovinos. São Paulo, 2006.

Número do animal	A/P	PPD A	PPD B	PPD B - PPD A	Resultado do TCC
1	0,390	0,20	0,00	-0,2	Negativo
2	0,021	0,40	0,00	-0,4	Negativo
3	-0,036	0,90	0,60	-0,3	Negativo
4	0,045	0,60	0,70	0,1	Negativo
5	0,079	0,30	0,10	-0,2	Negativo

<sup>1</sup> IDEXX

6	0,045	1,50	0,30	-1,2	Negativo
7	-0,083	0,60	0,80	0,2	Negativo
8	0,030	2,40	0,60	-1,8	Negativo
9	0,033	2,40	0,80	0,8	Negativo
10	-0,050	0,90	0,90	0,0	Negativo
11	0,087	0,40	0,30	-0,1	Negativo
12	0,012	1,30	1,90	0,6	Negativo
13	-0,045	2,20	1,00	-1,2	Negativo
14	-0,009	1,00	0,50	-0,5	Negativo
15	0,050	0,10	0,30	0,2	Negativo
16	0,047	0,00	0,80	0,8	Negativo
17	0,122	0,40	0,00	-0,7	Negativo
18	0,042	0,00	0,00	0,0	Negativo
19	0,077	0,20	0,20	0,0	Negativo
20	0,051	0,30	0,00	-0,3	Negativo
21	0,056	0,90	0,00	-0,9	Negativo
22	0,071	0,30	0,90	0,6	Negativo
23	0,084	0,30	0,00	-0,3	Negativo
24	0,037	0,10	0,40	0,3	Negativo
25	0,119	4,60	7,30	2,7	Inconclusivo
26	0,056	0,40	0,50	0,1	Negativo
27	0,173	3,00	3,40	0,4	Negativo
28	0,150	0,40	0,10	-0,3	Negativo
29	0,068	2,70	0,30	-2,4	Negativo
30	0,053	1,10	2,50	1,4	Negativo
31	0,101	6,10	2,80	-3,3	Negativo
32	0,080	0,30	0,00	-0,3	Negativo
33	0,006	0,50	0,00	-0,5	Negativo
34	0,045	2,50	4,10	1,6	Negativo
35	0,080	0,00	0,20	0,2	Negativo
36	0,138	3,10	0,00	-3,1	Negativo
37	-0,053	4,60	2,40	-2,2	Negativo
38	0,116	3,60	0,80	-2,8	Negativo
39	-0,065	1,70	1,10	-0,6	Negativo
40	0,027	1,40	0,30	-1,1	Negativo
41	0,224	6,00	1,90	-4,1	Negativo
42	0,000	1,00	0,00	-1,0	Negativo
43	0,039	3,20	0,80	-2,4	Negativo
44	0,045	2,20	0,00	-2,2	Negativo
45	0,120	2,70	0,00	-2,7	Negativo
46	0,131	2,50	0,20	-2,3	Negativo
47	0,339	0,30	0,80	0,5	Negativo
48	0,118	2,10	0,50	-1,6	Negativo
49	0,039	2,10	0,70	-1,4	Negativo
50	0,163	4,90	1,00	-3,9	Negativo
51	0,077	1,50	0,00	-1,5	Negativo
52	0,104	2,70	0,40	-2,3	Negativo

53	0,148	0,00	0,10	0,1	Negativo
54	0,068	0,40	0,60	0,2	Negativo
55	0,073	0,70	0,20	-0,5	Negativo
56	0,118	2,70	2,60	-0,1	Negativo
57	0,082	2,30	2,20	-0,1	Negativo
58	0,079	3,60	1,00	-2,6	Negativo
59	0,078	2,00	1,80	-0,2	Negativo
60	0,108	3,10	1,20	-1,9	Negativo
61	0,063	1,50	0,50	-1,0	Negativo
62	0,119	4,80	3,20	-1,6	Negativo
63	0,136	3,80	3,50	-0,3	Negativo
64	0,098	0,00	1,10	1,1	Negativo
65	0,094	3,80	0,20	-3,6	Negativo
66	0,082	5,30	0,20	-5,1	Negativo
67	0,127	3,90	0,50	-3,4	Negativo
68	0,106	2,00	0,70	-1,3	Negativo
69	0,190	3,60	3,00	-0,6	Negativo
70	0,071	3,00	0,20	-2,80	Negativo
71	-0,037	2,50	0,20	-2,30	Negativo
72	0,122	3,90	3,00	-0,90	Negativo
73	0,132	2,00	0,90	-1,10	Negativo
74	0,028	0,90	0,10	-0,80	Negativo
75	0,190	8,60	5,00	-3,60	Negativo

A/P.: amostra em relação ao positivo

PPD A: aumento da espessura da pele em milímetros determinada pelo PPD aviário

PPD B: aumento da espessura da pele em milímetros determinada pelo PPD bovino

TCC: Teste Cervical Comparativo

No teste exato de Fisher não houve associação significativa entre a resposta ao teste de ELISA e a resposta ao PPD aviário ( $p=1,000$ ), porém o teste do ELISA apresentou especificidade de 97% relativa ao PPD aviário (Tabela II).

TABELA II

Número de animais reagentes e não reagentes ao PPD aviário em relação ao resultado positivo ou negativo ao teste de ELISA para diagnóstico de paratuberculose em bovinos. São Paulo, 2006.

	PPDA+	PPDA-	Total
ELISA+	0	2	2
ELISA-	8	65	73

#### 4 DISCUSSÃO

A tendência de variação entre a resposta ao teste de ELISA para diagnóstico de paratuberculose e a resposta ao PPD aviário significativa no teste de correlação de Pearson é indicativo de exposição do rebanho estudado a micobactérias atípicas que podem causar reações cruzadas, tanto nos testes de tuberculina, como nos testes sorológicos.

O *Mycobacterium paratuberculosis* tem muitos antígenos em comum com as micobactérias ambientais como o *Mycobacterium avium*.

Embora seja considerado o teste mais sensível e específico entre os testes sorológicos, o ELISA de adsorção com *M. phlei* tem uma sensibilidade de cerca de 45% a 50% o que pode ser considerada baixa para um teste de triagem. A sensibilidade do ELISA teste é afetada pelo estágio de infecção medido pelos sinais clínicos e nível de disseminação de *M. paratuberculosis* (Collins 1996). A ocorrência de apenas dois animais positivos ao ELISA poderia ter sido subestimada tendo em vista sua baixa sensibilidade. Mesmo assim, o animal que apresentou resultado positivo em 2004, não revelou aumento ou permanência do valor acima do ponto de corte estabelecido, nos exames seguintes, sendo classificado como negativo. Segundo Chiodini (1996), na paratuberculose a presença de imunidade humoral geralmente implica em aumento da proliferação bacteriana e diminuição da resposta imune mediada por células já que esta relação inversa existe entre imunidade humoral e celular. Esta observação não foi realizada neste estudo, já que não ocorreu aumento da resposta imune humoral e a relação inversa entre as respostas imunológicas não foi constatada pelo teste de correlação de Pearson. Ainda se considerássemos os animais infectados, os valores obtidos no teste de ELISA estariam dentro da faixa S/P de 0,25-0,39, e seriam interpretados segundo Collins (2002), como “fraco-positivos”, onde a explicação e recomendação dada seria de que estes valores representam baixos níveis, embora acima do valor de ponto de corte e que nestas circunstâncias os animais podem permanecer com boa saúde por outra lactação e são de limitado risco de infecção ao rebanho, contanto que seu colostro, leite e esterco sejam mantidos longe dos bezerros.

Os dois animais pertencem a um rebanho fechado, e com controle de trânsito. Além de monitorado semestralmente para tuberculose, nunca foram observados casos clínicos e suspeitos de paratuberculose. Embora os bezerros sejam alimentados com colostro e leite até os dois meses de idade, são separados das mães até seis horas após o nascimento, e permanecem divididos por categorias durante sua vida produtiva, o que dificulta o contato de animais jovens com os animais mais velhos, diminuindo o risco de infecção. A investigação

de micobactérias por meio do exame de fezes também nunca foi realizada neste rebanho. Por ser a primeira vez que se investiga a ocorrência de anticorpos anti-*M. paratuberculosis* a associação dos testes de ELISA e de cultura de fezes, poderia aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

A especificidade do teste de ELISA empregada é considerada 99% segundo o fabricante. Neste estudo a especificidade do teste de ELISA foi de 97% em relação à resposta ao PPD aviário, assegurando uma alta taxa de animais verdadeiramente negativos. Ainda assim, devido aos fatores de risco inerentes ao rebanho já discutidos, a ocorrência de resultados falso-positivos ao teste de ELISA deve ser considerada. A presença de micobactérias atípicas no ambiente pode fazer com que haja interferência nos testes diagnósticos. Norby et al. (2005), utilizaram amostras do solo e da água para o isolamento de micobactérias atípicas em 6 rebanhos bovinos de corte com alta soroprevalência para paratuberculose no ELISA teste e isolamento de várias espécies de micobactérias atípicas das fezes, e 3 rebanhos próximos sem uma alta soroprevalência prévia. Do total 17,5% e 0,03% das amostras ambientais foram positivas para micobactérias atípicas destes rebanhos com alta e baixa soroprevalência, respectivamente, que levou a conclusão que as micobactérias atípicas podem ser ingeridas pelos bovinos e possivelmente causar reações cruzadas nos testes de anticorpos para *Mycobacterium paratuberculosis*.

## 5 CONCLUSÃO

Assim, conclui-se que embora tenham sido encontrados soros reagentes ao teste de ELISA, provenientes de dois animais, tendo em vista a diminuição destes valores nos resultados posteriores de um animal, e os fatores de risco relacionados ao manejo do rebanho, a confirmação do diagnóstico deve ser realizada pela associação de outros testes, como o exame de cultura de fezes a fim de se melhorar a sensibilidade e a especificidade diagnóstica, não sendo possível afirmar a ocorrência de paratuberculose neste rebanho.

## 6 REFERÊNCIAS

CHIODINI, R.J. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.12, n.2, p.313-343, 1996.

COLLINS, M. Diagnosis of paratuberculosis. ***Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice***, v. 12, n. 2, p.357-371, 1996.

COLLINS, M.T. Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v.9, n.6, p.1367-1371, 2002.

FERREIRA, R.; FONSECA, L.S.; RISTOW, P.C.L.B.; LILENBAUM, W. Paratuberculose bovina: uma mini-revisão. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.11, n.36, p.40-53, 2005.

NORBY, B.; FOSGATE, G.T.; ROUSSEL, A.J.; MANNING, E.J.B.; COLLINS, M.T. Isolation of atypical mycobacteria from the environment in cattle herds with high and low seroprevalence to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Abstracts of the eight international colloquium on paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, p.112, 2005.

SENASA. **Manual de procedimiento técnico diagnóstico de paratuberculosis**. Laboratorio de Referencia de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en paratuberculosis para América del Sur, América Central, México y Caribe. v. 1.0. 2000. 47p.

WORTHINGTON, R.W. Mycobacterium PPD sensitins and the non-specific reactor problem. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.34, n.2, p.345-438, 1967.