

USO DA TÉCNICA DO ELISA INDIRETO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Mycobacterium paratuberculosis* EM VACAS EM LACTAÇÃO

CLÉVERSON SANTOS ACYPRESTE,¹ RAQUEL SOARES JULIANO,² FRED EMIL BRAUTINGAN RIVEIRA,³
LUIZ ANTÔNIO FRANCO DA SILVA,⁴ MARIA CLORINDA SOARES FIORAVANTI⁴ E
FRANCISCO DE CARVALHO DIAS FILHO⁴

1. Médico Veterinário – Delegacia Federal de Agricultura em Goiás / MAPA/SSA/DFA-GO, Goiânia, GO, CEP 74.610.100 –
e-mail cleversantos@agricultura.gov.br

2. Médica Veterinária – Doutoranda em Medicina Veterinária – Sanidade Animal EV/UFG

3. Professor da Faculdade de Medicina Veterinária – UFMS

4. Professores da Escola de Medicina Veterinária – UFG

RESUMO

A paratuberculose é uma doença entérica crônica dos ruminantes que vem sendo estudada como enfermidade emergente no rebanho bovino brasileiro. O presente estudo tem o objetivo de detectar anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação, provenientes de dezessete propriedades rurais na bacia leiteira de Goiânia, mediante o uso do ELISA indireto. Para isso empregaram-se 166 amostras de soro sanguíneo retirada-

das aleatoriamente de um universo de 493 soros, cujos exames foram realizados no laboratório de diagnóstico da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Encontraram-se 22 (13,45%) animais soro-negativos, 44 (26,51%) suspeitos e 100 (60,24%) positivos. Todas as propriedades amostradas apresentaram animais soro-reagentes.

PALAVRAS-CHAVE: Elisa indireto, paratuberculose.

ABSTRACT

ELISA INDIRECT TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN ANTI- *Mycobacterium paratuberculosis* IN COWS IN GOIÁS, BRAZIL

The aim of this study was evaluate antibodies prevalence to Johne's disease in nursing cows from 17 farms in micro region of Goiânia, Goiás, Brazil, using indirect ELISA. 166 samples of a total of 493 serums and they were obtained with the purpose to investigate the prevalence of

bovine brucellosis in Goiânia. The tests were made in Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil, and had shown 22 (13,45%) negative animals, 44 (26,51%) suspects, and 100 (60,24%) positive ones. These positive animals were found in 100% of farms that were visited in this study.

KEY WORDS: Johne's disease, paratuberculosis.

INTRODUÇÃO

A paratuberculose ou enfermidade de Johne's é uma enteropatia dos ruminantes que se apresenta de forma granulomatosa, crônica e incurável

(KLAWONN et al., 2000; PAOLICCHI et al., 2000). Trata-se de doença causada pelo *Mycobacterium avium*, subespécie *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*), que infecta os animais de forma latente (DARGTZ et al., 2001). Nos bovinos, a

enfermidade caracteriza-se, clinicamente, por emagrecimento progressivo acompanhado ou não por crises diarréicas intermitentes, resultando, na maioria das vezes, na morte do animal (AMADO et al., 1995). Apresenta maior frequência em bovinos de dois a cinco anos de idade e, muitas vezes, se manifesta após o parto, fator considerado como desencadeante do processo (RAMOS et al., 1986; STABEL, 1998).

A transmissão ocorre por via oro-fecal, e o *M. paratuberculosis* é um parasita obrigatório, mas de elevada resistência ambiental (LARANJA DA FONSECA et al., 2000). A infecção acomete os bezerros, que são suscetíveis logo após o nascimento. Acredita-se que a ingestão adequada de colostro pode diminuir o risco de infecção, apesar de o leite de vacas infectadas ser uma possível fonte de contaminação (JOHNSON-IFCARULUNDU et al., 1997; STEP et al., 2000).

Tem sido relatada uma possível associação do *M. paratuberculosis* com a doença de Crohn, enfermidade dos humanos que cursa com uma ileocolite granulomatosa crônica, caracterizada por diarreia, febre e dor abdominal intermitente. O processo de transmissão poderia estar associado ao consumo de leite cru ou não devidamente pasteurizado (PAOLICCHI et al., 2000).

No Brasil, os primeiros relatos de diagnóstico da paratuberculose em bovinos foram feitos em animais importados, porém os casos autóctones só foram verificados em 1985 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1988).

O impacto da paratuberculose é difícil de ser quantificado, mas alguns efeitos adversos da infecção são citados, como menor aproveitamento dos alimentos; redução na quantidade de leite produzida; redução nos teores de proteína do leite; descarte prematuro de animais, maior incidência de mastite e redução na fertilidade. Na mensuração das perdas econômicas, é preciso considerar a prevalência da enfermidade no rebanho e a presença ou não de casos clínicos da enfermidade. Nos Estados Unidos, estes cálculos são realizados por rebanho, variando em função da prevalência, podendo-se verificar uma perda de 40 a 227 dólares por vaca (HUTCHINSON, 1996; JOHNSON-IFEARULUND & KANEENE, 1997; LAMMERS, 1998).

No diagnóstico clínico da enfermidade, é importante considerar o histórico dos animais e fazer a associação de três ou mais métodos de diagnóstico, incluindo-se entre esses a fixação de complemento, ELISA, imunodifusão em gel de ágar, ensaio com gama interferon e/ou cultivo bacteriológico convencional. Dos métodos sorológicos, o ELISA e a imunodifusão em gel de ágar são considerados os mais sensíveis no diagnóstico da enfermidade subclínica (HUCHZERMEYER et al., 1994; COLLINS, 1996; STABEL, 1998).

O presente estudo tem o objetivo de verificar a ocorrência de anticorpos contra a paratuberculose em vacas em lactação na microrregião de Goiânia, utilizando-se a prova do ELISA indireto.

MATERIALE MÉTODOS

Foram examinadas amostras de soro sanguíneo colhidas de 166 vacas em lactação na microrregião de Goiânia, no período de janeiro a julho de 1998. As 166 amostras examinadas foram colhidas, aleatoriamente, de um universo de 493 soros sanguíneos, que foram utilizados, paralelamente, em um estudo de prevalência de brucelose bovina na região. O sorteio aleatório permitiu incluir nesse trabalho dezessete amostras de um universo de 23 propriedades que haviam sido visitadas por ocasião da colheita do material para o diagnóstico da brucelose.

Utilizaram-se na colheita das amostras tubos “vacutâiner” por punção na veia coccígea. Em seguida, o material foi transportado ao laboratório e centrifugado, e o soro foi congelado a -20°C em tubos Eppendorf. O teste do ELISA indireto⁵ para a detecção dos anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* foi realizado no laboratório de diagnósticos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Para isso, os soros foram previamente diluídos a 1:25 e incubados a temperatura ambiente, por 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro⁶ regulado com comprimento de onda de 490 nm, sendo selecionado o recipiente A-1 da placa como o branco controle. Nos recipientes A2 e A3 seguiram-se os controles forte-positivo e fraco-positivo. Para a interpretação dos resultados, seguiu-se a orientação

do BRATESTX LABORATORIES (1995), e o valor do ponto de corte foi determinado para cada placa.

Os dados amostrais, como sugere COSTA (1998), foram avaliados pela estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dezessete (100%) propriedades avaliadas apresentaram animais soro-reagentes, sendo que, das 166 amostras dos bovinos, 100 (60,24%) foram positivas (Tabela 1). Este percentual é maior

que o descrito por SANT'NA & VEIGA (1977), que relataram uma prevalência de 4,2% no Brasil.

Na avaliação dos resultados por propriedades, observou-se que os valores foram superiores aos relatados por LARANJA DA FONSECA et al. (1999), que estudaram vinte propriedades produtoras de leite A e B do estado de São Paulo e verificaram em 95% delas pelo menos um animal positivo. Do total de animais testados, 37,9% foram positivos, diferindo dos resultados obtidos neste estudo (60,24%) realizado em propriedade rurais do estado de Goiás.

TABELA 1. Propriedades da microrregião de Goiânia e bovinos testados para presença de anticorpos anti- *Micobacterium paratuberculosis* pelo ELISA indireto.

Propriedade	Número de animais soro-reagentes	Número de animais suspeitos	Número de animais soro-negativos	Total de animais amostrados por propriedade
1	12	4	1	17
2	4	6	-	10
3	8	-	-	8
4	1	-	1	2
5	7	5	-	12
6	7	2	-	9
7	6	2	-	8
8	4	-	1	5
9	15	2	4	21
10	2	1	1	4
11	9	3	-	12
12	4	2	3	9
13	1	6	3	10
14	5	3	1	9
15	1	6	6	13
16	8	2	-	10
17	6	-	1	7
Total	100 (60,24%)	44 (26,51%)	22 (13,25%)	166 (100%)

Os percentuais de propriedades que apresentaram animais reagentes neste estudo também encontram-se bem acima dos descritos por JOHN SHON-IFEARULUND & KANEENE (1997), LAMMERS (1998), STEP (2000) e APHIS (2002), para as principais bacias leiteiras dos Estados Unidos, onde os valores observados variam de 1,6% a 45%. Já neste estudo, nas dezessete (100%) propriedades encontrou-se no mínimo um animal positivo.

A elevada ocorrência de soropositivos observada neste estudo poderia estar relacionada, segundo STEP et al. (2000) e RIET-CORRÊA et al. (2001), à suspeita de que a doença seja mais comum em solos ácidos, do que em solos alcalinos, característica muito comum nos solos de regiões de cerrado (PEREIRA, 1992).

O teste de ELISA indireto utilizado para o diagnóstico de paratuberculose nos Estados Unidos

mostrou sensibilidade de 40% a 50% e especificidade de 98% a 99%, e a *performance* melhorou nos casos em que a prevalência era mais elevada (STEP, 2000; COLLINS, 2001a,b,c). STEP (2000) e COLLINS (2001a, b, c) fazem a associação do ELISA à cultura e ao isolamento bacteriológico a partir de amostras fecais para o diagnóstico conclusivo da presença da enfermidade. Portanto, o ELISA aqui utilizado isoladamente serviu com um indicativo da presença de anticorpos anti-*M. paratuberculosis* na região estudada.

CONCLUSÕES

A ocorrência de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* detectados pelo ELISA indireto na microrregião de Goiânia apresentou-se elevada quando comparada a resultados de estudos de outras regiões. Outras avaliações devem ser efetuadas na região utilizando-se associações de técnicas de diagnóstico, para melhor caracterizar a presença de infecções pelo *M. paratuberculosis*.

NOTAS

5. *Kit* ELISA p/ diagnóstico de Paratuberculose – Bratex Laboratories – Campo Grande, MS
6. Espectrofotômetro Microplate – Biodek Instruments

REFERÊNCIAS

AMADO, A.; MARIANO, I.; ALBUQUERQUE, T.; CHAMBEL, L.; ALEGRE, L. Paratuberculose em bovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 40, n. 513, p. 4-9, 1995.

APHIS. USDA. Johne's Information Center. Disponível em: <<http://.aphis.usda.gov/johnes>> Acesso em: 20 jan. 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, Brasília, DF, número especial, 1988.

BRATESTEX LABORATORIES. **ELISA teste**. Campo Grande, MS: Brastese Laboratories, 1995. 9p.

COLLINS, M. T. Diagnosis of paratuberculosis. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**. v. 12, n. 2, p. 357-371, 1996.

COLLINS, M. Johne's testing: what's available? **The National Dairy Farm Magazine – Hoards Dairyman**, p. 221, 2001a.

COLLINS, M. What Johne's test results mean. **The National Dairy Farm Magazine – Hoards Dairyman**, p. 225, 2001b.

COLLINS, M. What's ahead in Johne's testing. **The National Dairy Farm Magazine – Hoards Dairyman**, p. 295, 2001c.

COSTA, S.F. **Introdução ilustrada à estatística**. 3 ed. São Paulo: Harbra, 1998. 313p.

DARGATZ, D.A.; BYRUM, A.; HENNEGER, G.; BARBER, L.K.; KOPRAL, C.A.; WAGNER, B.A.; WELLS, S.J. Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* among cow-calf herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 4, p. 497-501, 2001.

HUCHZERMEYER, H.F.A.K.; BRUCKERNER, G.K.; BASTIANELLO, S.S. Paratuberculosis. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, R.C.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of Livestock**, Oxford Universit Press, v. 2, p.1445-1457, 1994.

HUTCHINSON, L.J. Economic impact of paratuberculosis: Johne's disease. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**. v. 12, n. 2, p. 373-381, 1996.

JOHNSHON-IFEARULUND, Y.J.; KANEENE, J.B. Epidemiology and economic impact of

- subclinical Johne's disease: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 67, n. 6, p. 437-447, 1997.
- KLAWONN, W.; CUBLER, K.; DRÄGER, K.G.; HEIKE GYRA; HEIKE KÖHLER; ZIMMER, K. HEB, R.G. Johne's disease: importance of laboratory diagnosis and vaccination for herd sanitation. In: WOLD BUIATRIA CONGRESS, 21., Punta del Este, Uruguai. **Anais...** Punta del Este, 2000. p. 11461-11467. (CD-ROM).
- LAMMERS, S. Johne's disease is still a big problem. **The National Dairy Farm Magazine – Hoards Dairyman**, p. 85, 1998.
- LARANJADA FONSECA, L.F.; OLIVAL, A.A.; PEREIRA, C.C.; SANTOS, M.V. Doença de Johne: uma doença emergente em rebanhos leiteiros brasileiros. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 3, n. 2, p. 30-39, 2000.
- LARANJADA FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V.; PEREIRA, C.C.; OLIVAL, A.A.; HEINEMANN, M.B.; RICHTZENHAIN, L.J. Identificação da presença de anticorpos contra *M. paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 66, p. 122, 1999.
- PAOLICCHI, F.; ZUMARRAGA, M.; GIOFFRE, A.; ZAMORANO, P.; MORSELLA, C.; VERNA, A.; CATALDI, A.; ALITO, A.; ROMANO, M.I. Utilización de diferentes métodos de diagnóstico de paratuberculosis en bovinos de rodeo lechero. In: WOLD BUIATRIA CONGRESS, 21., Punta del Este, Uruguai. **Anais...** Punta del Este, 2000. p. 7781-7788. (CD-ROM).
- PEREIRA, C.A. **Plantas tóxicas e intoxicações na veterinária**. 1992. 279p.
- RAMOS, E.T.; POESTER, F.P.; CORRÊA, B.L.; OLIVEIRA, S.J.; RODRIGUES, N.C.; CANABARRO, C.E. Paratuberculose em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 6, n. 34, p. 28-32, 1986.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; DEL CARMEN MÉNDEZ, M.; LEMOS, R.A.A. **Doenças dos ruminantes e eqüinos**. v. 1. São Paulo: Varela, 2001. p. 329-334.
- SANT'NA, D.C.; L.S. VEIGA. Brucelose bovina em Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 6, n. 1-4, p. 15-20, 1977.
- STABEL, J.R. Johne's: a hidden threat. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 283-288, 1998.
- STEP. D.L.; STRETER, R.N.; KIRKPATRIK, J.G. Johnes's disease update. **The Bovine Practitioner**, v. 34, n. 1, p. 6-12, 2000.