

NOTA PRÉVIA

Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*)

Comparison of a commercial enzyme immune assay (ELISA) and serum neutralization techniques for the detection of antibodies against BHV-1 in buffaloes (*Bubalus bubalis*) sera

Adriana CORTEZ¹; Marcos Bryan HEINEMANN¹;
Amauri Alcindo ALFIERI²; Kerly Cristina MÉDICI²; Alice Fernandes ALFIERI²;
Daniela Bergamin OLIVEIRA²; Adriana Dresden MEYER³; Rodrigo Martins SOARES¹;
Sidnei Mioshi SAKAMOTO²; Renato AMARAL⁴; Pietro Sampaio BARUSELLI²;
Takako FUJII⁵; Leonardo José RICHTZENHAIN¹

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Leonardo José Richtzenhaim
Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da USP
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de
Paiva, 87
Cidade Universitária Armando
de Salles Oliveira
05508-000 – São Paulo – SP
e-mail: leonardo@usp.br

1- Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde
Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP – SP
2- Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva da
Universidade Estadual de
Londrina (UEL) - PR
3- ICB, USP - SP
4- Médico Veterinário Autônomo
5- Instituto Biológico São Paulo - SP

RESUMO

O desempenho de um ELISA comercial (Bovine Rhinotracheitis virus antibody test Kit, Herdcheck®, IDEXX Laboratories Inc., USA) para a identificação de anticorpos anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), em soro bovino, foi avaliado em 133 amostras de soro de búfalos (*Bubalus bubalis*), sem histórico de vacinação para IBR, da Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. Tomando-se a técnica de soroneutralização como referência, o ELISA indireto apresentou sensibilidade e especificidade relativa de 97,14 e 46,03%, respectivamente. A concordância estimada pelo índice *kappa*, entre os dois métodos, foi de 0,44 IC (0,29-0,59), utilizando um intervalo de confiança de 95%.

UNITERMOS: Rinotraquite infecciosa bovina; ELISA; Búfalos, *Bubalus bubalis*.

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), causada pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), tem acarretado grandes prejuízos econômicos nos rebanhos bovinos, principalmente em decorrência de infecções respiratórias e de alterações reprodutivas^{1,2}.

Devido a sua grande especificidade e sensibilidade, a técnica de soroneutralização tem sido utilizada como referência no sorodiagnóstico do BHV-1; entretanto, esta prova possui uma série de desvantagens relacionadas ao uso do cultivo celular, como, por exemplo, a infra-estrutura e o pessoal especializado necessário a sua realização, o tempo gasto para o seu processamento e a existência de amostras de soro tóxicas que impossibilitam a interpretação dos resultados³.

O teste de ELISA indireto tem sido aplicado na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em bovinos, pois, além de apresentar uma elevada concordância (*kappa* = 0,94) com a soroneutralização, é uma prova rápida, de fácil execução e que pode ser automatizada, simplificando os inquéritos epidemiológicos^{4,5}.

Em búfalos, a literatura tem mencionado o uso do ELISA indireto empregando conjugado dirigido para a IgG bovina^{6,7} na pesquisa de anticorpos contra o BHV-1, porém, nestes trabalhos

não foi verificada a concordância entre as provas de ELISA indireto e a soroneutralização.

Molnár et al.⁸ testaram um ELISA indireto comercial na detecção de anticorpos anti-BHV-1 concebido, originalmente, para bovinos (Svanovir®, IBR EIA Kit, Uppsala, Suécia) nos soros de bubalinos. Estes autores avaliaram 10 amostras de soro de búfalos para as provas de soroneutralização e para o ELISA indireto e obtiveram uma concordância de 100% entre as duas provas.

O objetivo do presente trabalho foi analisar o desempenho de um kit comercial de ELISA (Rhinotracheitis virus antibody test kit, HerdCheck®, IDEXX Laboratories Inc., USA), desenvolvido para detectar anticorpos bovinos contra o BHV-1, na detecção de anticorpos contra o mesmo vírus em amostras de soros de búfalos (*Bubalus bubalis*). O teste ELISA para a detecção de anticorpos contra BHV-1 em búfalos foi executado e interpretado conforme recomendado pelo fabricante.

Para tanto, foram utilizadas 133 amostras de soros de búfalos fêmeas da raça Murrah e suas cruzas, em idade de reprodução (3 a 16 anos), não vacinadas contra IBR, pertencentes a 11 rebanhos da região do Vale do Ribeira, SP.

A microtécnica de soroneutralização foi realizada com células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) empregando 100 TCID 50% do protótipo viral Los Angeles do BHV-1. A incubação do vírus/soro foi completada em 1 hora a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, segundo a metodologia descrita por Britsch⁹. A leitura final foi efetuada em 72 horas. O ponto final da reação foi determinado pela maior diluição do soro capaz de inibir 100% do efeito citopático induzido pelo BHV-1 nas células MDBK. O animal foi considerado positivo quando o título do soro foi maior ou igual a 8.

A concordância entre as duas técnicas foi calculada através do índice *kappa*¹⁰.

Na Tab. 1, estão expostos os resultados do sorodiagnóstico de IBR obtidos pelas técnicas de soroneutralização e ELISA indireto nas amostras de soro de búfalo.

Tomando-se a soroneutralização como referência, o ELISA indireto apresentou sensibilidade relativa de 97,14% (68/70 x 100) e especificidade relativa de 46,06% (29/63 x 100). A baixa especificidade do ELISA em relação à soroneutralização poderia ser atribuída ao fato de que esta última detecta apenas anticorpos relacionados ao fenômeno de neutralização. Em contrapartida, a técnica de ELISA indireto detecta qualquer anticorpo direcionado contra proteínas estruturais e não-estruturais do BHV-1. A capacidade de o ELISA indireto gerar sinal a partir de quantidades muito pequenas de anticorpos também poderia explicar a sua aparente perda de especificidade em relação à soroneutralização. Outras causas da perda de especificidade poderiam estar associadas a eventual ocorrência de interações não-imunológicas (ruídos decorrentes da adsorção de IgG de búfalo ou de conjugado anti-IgG bovina a microplaca) ou de reações cruzadas com anticorpos produzidos após a infecção dos búfalos com outro vírus antigenicamente relacionado ao BHV-1.

O índice *kappa* encontrado, com um intervalo de confiança de 95%, entre as provas de ELISA indireto e a soroneutralização

Tabela 1

Sorodiagnóstico de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em búfalos (*Bubalus bubalis*), pelas técnicas de Soroneutralização e ELISA indireto. São Paulo, 2001.

ELISA (HerdCheck®)	Soroneutralização		
	Reagente	Não Reagente	Total
Reagente	68	34	102
Não Reagente	2	29	31
Total	70	63	133

foi de 0,44, o que indica um grau regular de concordância entre as duas técnicas¹¹, apesar de Krakker e Goel¹² terem demonstrado que as subclasses de IgG (1 e 2) de búfalo (*Bubalus bubalis*) e de bovino compartilham propriedades físico-químicas e biológicas, além de serem relacionadas antigenicamente.

Estes resultados diferem fortemente dos obtidos por Médici⁵, que acharam um *kappa* de 0,94 quando o mesmo sistema de ELISA indireto (HerdCheck®) foi comparado com a soroneutralização na pesquisa de anticorpos contra o BHV-1 em bovinos.

Ao pesquisar anticorpos anti-BHV-1 em búfalos, empregando um kit de ELISA indireto para detecção de anticorpos em bovinos, Molnár et al.⁸ encontraram uma concordância de 100% entre os testes de ELISA e soroneutralização. A patente divergência desses resultados em relação àqueles obtidos no presente trabalho poderia ser justificada pelo fato de que estes autores testaram somente 10 amostras de soro e por terem utilizado um kit comercial diferente.

Os dados obtidos com 133 soros bubalinos indicam que o Kit HerdCheck®, IDEXX Laboratories Inc., USA, originalmente desenvolvido para bovinos, não deve ser aplicado para a pesquisa de anticorpos contra o BHV-1 em búfalos.

SUMMARY

The performance of a commercial ELISA (Bovine Rhinotracheitis virus antibody test Kit, Herdcheck®, IDEXX Laboratories Inc., USA) designed to detect the presence of antibody to the Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) in bovine serum, was evaluated in samples of buffaloes (*Bubalus bubalis*) serum. Sera of 133 buffaloes without IBR vaccination were performed both by ELISA and standard serum neutralization technique. Sensitivity and specificity of ELISA were 97.14% and 46.03%, respectively. The estimated concordance between two serologic diagnostic methods by *kappa* index was 0.44 IC (0.29-0.59) using 95% confidence level.

UNITERMS: Infections bovine rhinotracheites; ELISA; Buffaloes, *Bubalus bubalis*.

REFERÊNCIAS

- MILLER, J. M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 95-98, 1991.
- HEDGER, R. S.; HAMBLIN, C. Neutralizing antibodies to bovid herpesvirus 1 (Infectious bovine rhinotracheitis/Infectious pustular vulvo-vaginitis) in african wildlife with special reference to the cape buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal Comparative Pathology**, v. 88, n. 2, p. 211-218, 1978.
- WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs**. Boston: Kluwer Academic, 1989. 345 p.
- PERRIM, B.; PERRIM, M.; MOUSSA, A. Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for a detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. **Veterinary Record**, v. 25, n. 138, p. 520, 1996.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Ensaio Imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 343-346, 2000.

- 6- RENUKARADHYA, G. J.; RAJASEKHAR, M.; RAGHAVAN, R. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in southern India. **Revue Scientific et Technologic**, v. 15, n. 3, p. 1021-1028, 1996.
- 7- SURESH, K. B.; SUDHARSHANA, K. J.; RAJASEKHAR, M. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in India. **Indian Veterinary Journal**, v. 76, n. 1, p. 5-9, 1999.
- 8- MOLNÁR, E.; SERRA, M. T. A.; GUEDES, V. T. M.; MOLNÁR, L. Prevalência da infecção pelo vírus da rinotraqueíte bovina (IBR) em bubalinos criados no Estado do Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Microbiologia. 1999. p. 145.
- 9- BITSCH, V. The modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. **Acta Veterinaria Scandinava**, v. 19, n. 4, p. 497-505, 1978.
- 10- GART, J. J.; BUCK, A. A. Comparison of a screening test and a reference test in a epidemiology studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 83, p. 593-602, 1966.
- 11- PEREIRA, M. G. **Epidemiologia teórica e prática**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1995. 583 p.
- 12- KRAKKER, N. K.; GOEL, M. C. Purification and characterization of IgG1 and IgG2 from buffalo (*Bubalus bubalis*) serum and colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 37, n. 1, p. 61-71, 1993.

Recebido para publicação: 13/03/2001
Aprovado para publicação: 16/08/2001