

Intradermo-reação cervical para diagnóstico de infecções por *Eurytrema* sp em bovinos*

Cervical, intradermal reaction for diagnosis of *Eurytrema* sp infection in cattle

CORRESPONDENCE TO:
Pacífico Antônio Diniz Belém
Departamento de Veterinária
Universidade Federal de Viçosa -
UFV
Rua PH. Hoff's, s/nº - Campus
Universitário
36570-000 - Viçosa - MG - Brasil

Pacífico Antônio Diniz BELÉM; Maria Terezinha Serrão PERAÇOLI; Mauro Rodrigues de OLIVEIRA;
Carlos Roberto PADOVANI

RESUMO

Foram realizadas intradermo-reações (IDR) cervicais em 101 bovinos, machos e fêmeas, que receberam, simultaneamente e ao acaso, em sete áreas adjacentes, 0,1ml de salina e igual volume de um extrato antigênico de *Eurytrema* sp, nas seguintes concentrações de proteína: 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml e 1mg/ml. Feitas todas as injeções intradérmicas e, ao final de 30min, com auxílio de uma régua milimetrada, de cada pápula produzida foram medidos os dois diâmetros maiores, extraídas as médias (diâmetros inicial, D_i e final, D_f) e calculada a diferença $D_f - D_i$. No dia seguinte acompanhava-se o abate de cada animal a fim de se verificar, por meio de exames macroscópicos dos respectivos pâncreas, se eram ou não parasitados por *Eurytrema* sp. Concluiu-se, então, que o extrato salino bruto do trematódeo, utilizado como antígeno, deverá conter, no momento de sua utilização, concentração de proteínas equivalente a 250µg/ml e, respectivamente, serem consideradas positivas e negativas as IDR que apresentarem $D_f - D_i > 2,5\text{mm}$ e $D_f - D_i < 2,5\text{mm}$.

UNITERMOS: *Eurytrema*; Infecções; Bovinos.

INTRODUÇÃO

A euritrematose, em geral, é subclínica e os casos, muitas vezes, são comprovados somente após a morte dos animais. O diagnóstico coproparasitológico baseia-se no princípio da sedimentação, mas as técnicas são trabalhosas e sujeitas a resultados falsos negativos (Belém et al. ¹, 1992).

Codo ² (1952) elaborou um antígeno com espécimes de *E. coelomaticum* dessecados e o utilizou para IDR em bovinos. Injetou "aproximadamente" 0,2ml na prega anocaudal, mas não definiu o que considerava "reação".

Kim; Park ³ (1974) extraíram uma fração protéica de *Eurytrema* sp e a utilizaram para IDR. Coelhos e caprinos foram previamente sensibilizados e, a seguir, foi estabelecida a concentração de proteína do antígeno a ser experimentada em bovinos. Nestes injetaram 0,2ml do antígeno na prega anocaudal e avaliaram o aumento relativo das pápulas após 15 a 20min. Os bovinos infectados e os não infectados apresentaram, respectivamente, aumento das pápulas de 2 a 11mm e de 1 a 3mm. Assim, verificaram 75 (87,2%) positivos, 4 (4,7%) negativos e 7 (8,1%) suspeitos entre os parasitados e 70 (98,67%) negativos e 1 (1,4%) suspeito no grupo dos não infectados.

Correa et al. ³ (1984) prepararam uma suspensão de *E. pancreaticum* a 1:10 em salina e, a partir daí, um extrato antigênico com o qual realizaram IDR cervicais em bovinos. Em um rebanho que consideraram indene não observaram qualquer reação quando o antígeno foi inoculado na dose de 0,1ml, em três grupos de 25 animais, empregando-se, respectivamente, diluição e tempos de leitura após a inoculação de 1:2000 / 2 a 3h, 8h e 24h; 1:1000 / 1 a 2h e 1:500 / 30 min, a 1h. Em um rebanho com casos comprovados de parasitismo, foram testadas doses de 0,05ml e 0,1ml do antígeno diluído a 1:2000, em dois grupos de 50 animais, com as leituras sendo feitas 2 a 3h, 8h e 24h pós-inoculação (hpi). Consideraram como positivas as IDR em que as pápulas exibiam diâmetros iguais ou superiores a 1cm e negativas as demais. Ocorreram, respectivamente, 32 (64%) e 38 (76%) IDR positivas. Posteriormente, reduziram o tempo de leitura, passando a usar 0,1ml do antígeno e confrontaram os resultados da IDR com aqueles da pesquisa do parasita no pâncreas. Em dois ensaios fizeram leituras 2 a 3hpi em um grupo de 34 animais e 30min a 1h em outro de 15, obtendo, respectivamente, 25 (73,5%) e 11

*Parte da tese Belém, P.A.D. Aspectos ligados ao diagnóstico da infecção por *Eurytrema* em bovinos. Botucatu, 1991. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu

(73,3%) reações positivas. Confirmaram que todos estavam parasitados, mas, em 7 (28%) dentre os negativos do primeiro grupo e em 1 (6,7%) do segundo, no exame "post mortem" não foram confirmados os resultados da IDR. Finalmente, trabalharam com um grupo de 12 animais e o antígeno diluído a 1:500, lendo 30min a 1hpi. Observaram que 9 (75%) reagiram e todos estavam infectados, mas, entre os não parasitados, um reagiu. Diante disso, concluíram que o antígeno deveria ser diluído a 1:500, ou menos, e a leitura ser feita 30min pi.

A presente pesquisa objetivou avaliar a IDR cervical para diagnóstico de infecções por *Eurytrema* sp em bovinos.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção do antígeno

Para a preparação do antígeno, 30g de espécimes de *Eurytrema* sp foram suspensos em 270ml de solução salina a 0,85% tamponada, triturados em homogeneizador Virtis a 20.000 rpm durante 15min e o homogenato centrifugado e filtrado, segundo descrito por Correa et al. ³ (1984). Do antígeno assim preparado, colheu-se uma alíquota para dosagem de proteína (Lowry et al. ⁷, 1951), e o restante foi dividido em frascos e estocado a -20°C. Posteriormente o antígeno, contendo 1mg de proteína/ml, foi diluído para a obtenção final de concentrações equivalentes a 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml e 500µg/ml para, juntamente com salina (controle), ser injetado nos animais.

Animais de experimentação

Foram utilizados 101 bovinos, de ambos os sexos e de diferentes raças e idades, abatidos em Viçosa-MG entre 28/03/89 e 26/10/89. Todos receberam simultaneamente, por via intradérmica na região cervical lateral, injeções de 0,1ml de salina e de igual volume do antígeno nas concentrações de proteína acima referidas. Após o abate de cada animal pesquisou-se a presença ou não de *Eurytrema* sp nos pâncreas.

Procedimento da IDR

Procedia-se à tricotomia de sete áreas adjacentes medindo 5cm x 5cm e, aleatoriamente, cada uma era escolhida para receber a injeção de salina ou de uma das diluições do antígeno. Logo após serem feitas as injeções intradérmicas, os dois diâmetros maiores das pápulas produzidas eram medidos com régua milimetrada e extraía-se a média (diâmetro médio inicial, D_i). Decorridos 30min, repetia-se o processo para determinar o diâmetro médio final (D_f) e calculava-se a diferença entre os diâmetros médio final e inicial ($D_f - D_i$).

Interpretação dos resultados da IDR

O critério de interpretação dos resultados da IDR foi

definido avaliando-se a tendência dos dados relativos à $D_f - D_i$ para a injeção de salina em todos os animais. Reuniram-se, em uma tabela de dupla entrada, as proporções de resultados corretos e incorretos à IDR. Resultados corretos e incorretos seriam, pois, aqueles em que os achados à IDR fossem, respectivamente, confirmados ou não após exames macroscópicos dos pâncreas, para cada concentração de proteína do antígeno experimentada e, a seguir, foram feitas comparações entre elas empregando-se o teste de Goodman ^{4,5} para contrastes entre e dentro de proporções multinomiais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se o D_i das pápulas produzidas pela injeção intradérmica de salina em todos os animais, verificou-se que, se fosse adotado o critério de Correa et al. ³ (1984), 43 (71,7%) dos animais parasitados e 30 (73,2%) dos não parasitados já seriam considerados positivos, mesmo sem receberem injeções do antígeno. Correa et al. ³ (1984) interpretaram as IDR empiricamente e não constituíram um grupo controle que permitisse uma avaliação da interferência do volume injetado no diâmetro das pápulas. No caso de Kim; Park ⁶ (1974), o critério de leitura não poderia ser também aproveitado, pois eles injetaram volume diferente daquele aqui empregado, efetuaram a IDR na prega anocaudal, deixaram de considerar a injeção intradérmica de salina como grupo controle e, por fim, extrapolaram diversos resultados obtidos em coelhos e caprinos sensibilizados para bovinos. Ressalte-se ainda o fato de que os bovinos parasitados, à exceção de um que apresentou IDR classificada como suspeita, reagiram todos negativamente.

Não seria esperado ocorrerem casos de reação falso positiva em animais outrora infectados mas que não exibissem parasitas por ocasião do teste, já que, provavelmente, eram criados em condições de campo e numa área endêmica? Analogamente, já estariam todos os animais infectados por *Eurytrema* sp sensibilizados, pressupondo-se que a infecção tenha ocorrido em diferentes momentos?

Diante do exposto, escolheu-se, a exemplo do que fizeram Kim; Park ⁶ (1974), o aumento relativo das pápulas como variável para estudar as IDR, pois entendeu-se que seu emprego permitiria uma simplificação, já que se $D_f - D_i > 0$ haveria aumento, se $D_f - D_i < 0$, diminuição e se $D_f - D_i = 0$, a pápula teria permanecido inalterada.

Como critério de leitura das IDR em estudo entendeu-se ser lógico considerar negativas aquelas cujas pápulas apresentassem $D_f - D_i < 0$, a exemplo do que fizeram Kim; Park ⁶ (1974). Porém, conforme mostrado na Tab. 2, mesmo quando se injeta salina podem ocorrer casos de ligeiro aumento das pápulas ($D_f - D_i > 0$), e estas, obviamente, são também reações negativas. Mas até quanto se pode verificar um

Tabela 1

Distribuição de freqüências das diferenças entre os diâmetros médios final e inicial das pápulas produzidas pela injeção intradérmica cervical de 0,1ml de salina em bovinos abatidos no município de Viçosa, entre 28/03/89 e 26/10/89, independentemente de estarem ou não parasitados por *Eurytrema* sp.

Classes (mm)	Ponto Médio de Classe	Freqüência Observada	Freqüência Relativa (%)
-3,5 – -2,8	-3,15	5	4,95
-2,8 – -2,1	-2,45	4	3,96
-2,1 – -1,4	-1,75	10	9,90
-1,4 – -0,7	-1,05	12	11,88
-0,7 – 0,0	-0,35	11	10,89
0,0 – 0,7	0,35	36 ⁽¹⁾	35,64
0,7 – 1,4	1,05	10	9,90
1,4 – 2,1	1,75	13	12,88
TOTAL	–	101	100

⁽¹⁾ Destes, $D_f - D_i = 0$ corresponde a 16 animais

$\bar{X} = -0,135\text{mm}$ e $s = 1,312\text{mm}$

Tabela 2

Distribuição das proporções de resultados corretos e incorretos à intradermo-reação cervical em 101 bovinos abatidos no município de Viçosa, entre 28/03/89 e 26/10/89, segundo cada uma das concentrações de proteína do antígeno de *Eurytrema* sp avaliada.

Concentrações de proteína do antígeno ($\mu\text{g/ml}$)	Resultados ⁽¹⁾	
	Corretos	Incorretos
25	0,475a ⁽²⁾ A ⁽³⁾	0,525a A
50	0,535a A	0,465a A
100	0,505a A	0,495a A
250	0,614a B	0,386a A
500	0,614a B	0,386a A
1000	0,614a B	0,396a A

⁽¹⁾ Como incorretos, incluem-se aqui os resultados falsos positivos e falsos negativos e, como corretos, os demais.

⁽²⁾ Em cada coluna (resultados corretos e incorretos), proporções seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre si quanto à concentração de proteína do antígeno.

⁽³⁾ Em cada linha (concentrações de proteína do antígeno) proporções colocadas sobre uma mesma letra maiúscula não diferem quanto ao tipo de resultado.

aumento relativo das pápulas sem que isto possa ser atribuído a uma reação ao antígeno injetado? Embora não seja fácil responder a esta questão, verifica-se, pela tendência dos dados referentes à injeção intradérmica de salina (Tab. 1), ser muito difícil ocorrerem valores de $D_i - D_0 > 2\text{mm}$. Por conseguinte, seriam remotas as possibilidades de ocorrerem casos falsos positivos à IDR se fosse estabelecido um valor acima de 2mm de $D_i - D_0$ como limite superior, para se considerar negativas as IDR. Então, seguindo-se este raciocínio,

decidiu-se por considerar negativas as IDR com $D_i - D_0 < 2,5\text{mm}$ e positivas as demais.

À luz do critério discutido, os resultados (Tab. 2) mostram que há predominância da proporção de resultados corretos quando a concentração de proteína no antígeno é de 250µg/ml ou mais. Na medida em que todas estas concentrações melhoraram indistintamente a proporção de resultados corretos, verifica-se que não há vantagem em se utilizar concentrações de proteína no antígeno superiores a 250µg/ml.

SUMMARY

Cervical, intradermal reactions (IDR) were performed in 101, male and female, adult cattle slaughtered in the Viçosa abattoir. Each animal received simultaneously and randomly 0,1ml of salina and salina extract of *Eurytrema* sp antigen in the following protein concentrations: 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml and 1 mg/ml. Immediately after the injections, as well as 30 minutes later, the millimetered wheals were measured by means of a millimetered ruler in order to get the mean diameter in both times (D_0 , initial mean diameter; D_i , final mean diameter). Then, $D_i - D_0$ was calculated, and in the next day each pancreas was macroscopically examined in order to investigate the parasitic condition. The following conclusions were reached: 1) all IDR showing wheal increase of 2.5mm might be considered positive, whereas the other ones (with $D_i - D_0 < 2.5\text{mm}$) might be regarded as negative; 2) *Eurytrema* sp antigen, at the moment of its use, ought to have a concentration of 250µg/ml of protein/ml.

UNITERMS: *Eurytrema*; Infections; Cattles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BELÉM, P.A.D.; OLIVEIRA, M.R.; PADOVANI, C.R. Avaliação da técnica de Dennis, Stone & Swanson para diagnóstico coproparasitológico de infecção natural de *Eurytrema* sp em bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, p.303-7, 1992.
- 2 - CODO, V. Teste cutâneo para diagnóstico da eurytrematose em bovinos. **Revista Ceres**, v.9, p.132-8, 1952.
- 3 - CORREA, W.M.; CORREA, C.N.M.; FERREIRA, A.C.; PAES, A.C. *Eurytrema pancreaticum*: clínica e diagnóstico em bovinos. **Hora Veterinária**, v.4, p.31-4, 1984.
- 4 - GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistic**, v.35, p.716-25, 1964.
- 5 - GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**, v.7, p.247-54, 1965.
- 6 - KIM, H.S.; PARK, M.S. Studies on the intradermal reaction in bovine eurytremiasis. **Korean Journal of Veterinary Research**, v.14, p.59-71, 1974.
- 7 - LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-75, 1951.

Recebido para publicação: 07/01/94

Aprovado para publicação: 19/06/95