

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE *BRUCELLA OVIS*

COMPARISON OF ANTIGENS USED FOR THE DIAGNOSIS OF *BRUCELLA OVIS*

Priscilla Karina Vitor Koerich¹; Adil Knackfuss Vaz²

The same antigen had higher protein concentration than the standard and the other antigens.

RESUMO

O diagnóstico sorológico por imunodifusão radial da brucelose ovina causada por *Brucella ovis* é uma importante arma contra esta enfermidade, podendo também ser utilizada para a brucelose canina por *Brucella canis*, uma vez que há reação cruzada entre as duas bactérias. Contudo, ao utilizar-se antígenos de diferentes origens no diagnóstico, podem ocorrer diferenças quanto à reação produzida, mesmo utilizando-se a mesma cepa bacteriana e técnica de produção semelhante. Foram analisados antígenos produzidos por dois laboratórios (antígeno I, IIa e IIb) e um antígeno padrão, a fim de verificar se há diferenças entre padrões de bandas em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) destes produtos. A composição antigênica e a identificação de um antígeno padrão foram comparadas com antígenos comerciais pela técnica de PAGE e imunodifusão radial, onde foram encontradas 2 linhas de precipitação no antígeno IIa e uma linha de precipitação nos demais antígenos estudados. A concentração proteica dos diferentes antígenos foi obtida através do SENSIPROT.

PALAVRAS CHAVE: *Brucella ovis*, diagnóstico, comparação de antígenos

SUMMARY

Radial Immunodiffusion (RID) is the most widely used diagnostic method for sheep brucellosis due to *Brucella ovis*. It is also used for the diagnosis of canine brucellosis caused by *Brucella canis*. Antigens used for RID are not standardized and it is possible that reagents from different sources may produce discrepancies, even if the same bacterial strain is used to produce the antigens. Antigens produced by two laboratories (antigens I, IIa and IIb) were compared to an antigen produced following the techniques recommended by FAO/WHO, and considered as standard for the purposes of this study. Antigens were compared by PAGE analysis and RID, and protein concentration determined by the SENSIPROT technique. It was found that one antigen produced two precipitation lines in RID. The same product showed a different pattern of bands in PAGE, with an extra band of protein at 200 KDa.

KEY WORDS: *Brucella ovis*, diagnosis, antigen composition.

INTRODUÇÃO

O gênero *Brucella* inclui patógenos intracelulares Gram negativos de animais e humanos. Dentre as espécies encontradas na natureza, *Brucella canis* e *Brucella ovis* são muito patogênicas para seus hospedeiros na sua forma natural. *B. canis* infecta cães e *B. ovis* infecta ovinos, produzindo epididimo-orquites e abortos, ocasionando uma diminuição nos índices reprodutivos (CORBEL & BRINLEY-MORGAN 1984).

Exceto pelo lipopolissacarídeo (LPS), a resposta imune contra antígenos de *Brucella ovis* têm sido pouco estudada, e conseqüentemente há poucas informações da relação entre a estrutura celular e a resposta imune para este patógeno (RIEZU-BOJ et al. 1990).

Como em outras infecções por brucelas, a *Brucella ovis* é rapidamente fagocitada e desenvolve estratégias adaptativas através das quais resiste à degradação intracelular pelos macrófagos. A patogenicidade intracelular provavelmente proporciona um mecanismo para a bactéria evadir o controle imunológico. Quando a bactéria migra para o trato reprodutivo, ela entra na fase proliferativa. Uma vez que isso ocorre, os antígenos citossólicos são processados pelos macrófagos circulantes (CHIN & PANG-TURNER, 1990).

As brucelas são capazes de sobreviver durante um longo período dentro dos monócitos, o que a faz aparecer em células fagocitárias modificadas, que expressam o antígeno de brucela na sua superfície. Estas células poderiam multiplicar-se, perpetuando o estado de resistência. A imunização contra a brucelose requer uma alteração efetiva dos fatores celulares e humorais (CARRILO, 1972).

Os antígenos para *Brucella ovis* atualmente produzidos apresentam variabilidade entre partidas. Isto gera dificuldades para a padronização do diagnóstico e inibe a produção comercial desses antígenos. Devido a isso, foi feita uma comparação entre a composição antigênica e identificação proteica dos antígenos I, IIa e IIb, e antígeno

¹ Aluna de Medicina Veterinária do CAV/UDESC, bolsista PIBIC/CNPq

² Professor de Imunologia Veterinária, CAV/UDESC, Caixa Postal 281 88502 -970 Lages, SC. E-mail a2akv@cav.udesc.br

padrão, através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI 1970); assim como imunodifusão radial (COGGINS & PATTEN 1970) e determinação da concentração protéica (WESTGARD & GROTH, 1981; MC ELDERY et al., 1982; DILENA et al., 1983).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do antígeno padrão:

Foram utilizadas bactérias liofilizadas da cepa REO (GENETZKY 1970) de *Brucella ovis* cultivadas em ágar sangue, a uma temperatura de 37° C por 72 horas. Após esse período, o cultivo foi analisado quanto à sua pureza, e repicado em 20 placas de ágar sangue, nas condições já citadas anteriormente. As bactérias foram colhidas por lavagem com solução tampão de fosfato pH 7,2 (PBS).

Imediatamente após a coleta, foi feita a centrifugação dessa suspensão celular a 1000 g. durante 15 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 5 ml de PBS estéril. O processo de centrifugação foi repetido mais uma vez.

O sobrenadante foi eliminado e a massa celular foi ressuspenso em 10 ml de PBS estéril. A suspensão resultante foi agitada e aquecida em banho-maria a 80° C, durante 2 horas, agitando-se em intervalos aproximados de 15 minutos. Após resfriamento, a suspensão celular foi centrifugada a 1000 g durante 10 minutos para eliminar as macropartículas e restos celulares. O líquido sobrenadante que constitui o antígeno foi recolhido e congelado durante uma noite à temperatura de -20°C, e o sedimento foi descartado. O antígeno foi descongelado e centrifugado a 1000 g. durante 10 minutos para eliminar os lipídios. O sedimento foi eliminado e o sobrenadante congelado novamente. O sobrenadante foi dialisado a uma temperatura de 4° C, durante 3 dias contra PBS, sendo a solução trocada diariamente.

Análise dos antígenos:

Os antígenos I, IIa e IIb foram obtidos junto aos laboratórios produtores. Foi feita a imunodifusão radial com ágar Noble (Difco, USA) a 1% em tampão borato (COGGINS & PATTEN, 1970) utilizando-se cada antígeno contra um soro hiperimune produzido em dois coelhos contra a amostra REO.

As análises de bandas protéicas foram realizadas em SDS-PAGE (8% de acrilamida), coradas por "Coomassie Blue" (LAEMMLI 1970), com todas as amostras de antígenos, a fim de determinar a composição antigênica e comparar as proteínas em cada antígeno.

A análise das bandas produzidas foi feita através do "software" ImageJ (National Institutes of Health, USA).

A concentração proteica de todas as amostras foi obtida através do SENSIPROT (WESTGARD & GROTH, 1981; MC ELDERY et al., 1982; DILENA et al., 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos antígenos através de imunodifusão radial, com os três antígenos: I, IIa e IIb, e do antígeno padrão, mostrou que o antígeno IIa produziu duas linhas de precipitação, mostrando possuir dois componentes antigênicos (Figura I). Isto pode gerar dificuldades na interpretação dos resultados para diagnóstico, pois não se sabe se os componentes que reagiram, são idênticos aos que reagem em ovinos infectados. Os demais antígenos produziram uma única linha de precipitação.

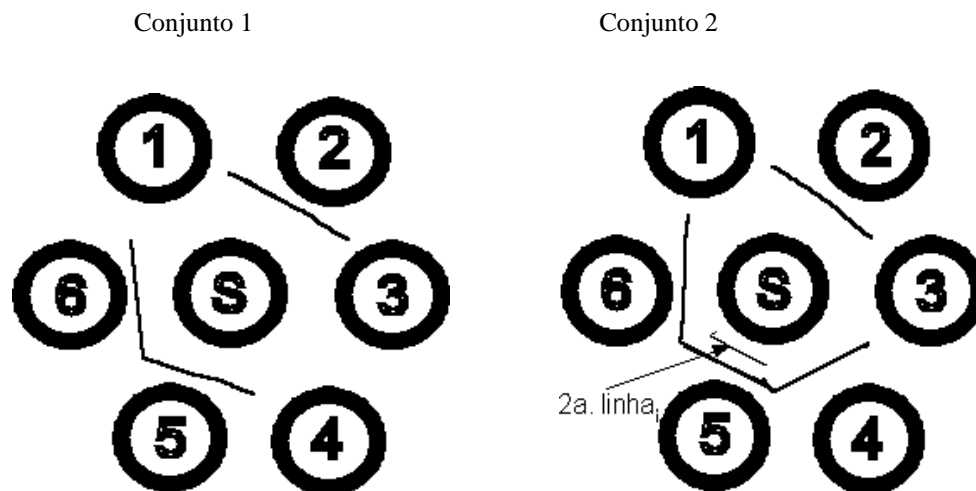


Figura 1. Imunodifusão radial usando soro hiperimmune contra *B. ovis* e os antígenos em estudo

Conjunto 1 - (1), (3) e (4) vazios; (2) Antígeno padrão; (5) Antígeno IIb; (6) Antígeno I
Conjunto 2 - (1), (3) vazios; (2) Antígeno I; (4) Antígeno padrão; (5) Antígeno IIa; (6) Antígeno IIb
S - Soro hiperimmune de coelho contra a amostra REO de *B. ovis*

Na análise do SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), foi observado que o antígeno padrão contém as mesmas bandas protéicas que o antígeno I e IIb. No entanto, o

antígeno IIa apresentou composição protéica diferente, conforme a Figura 2.

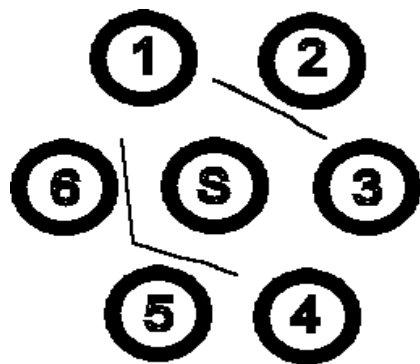


Figura 2. Bandas protéicas em SDS-PAGE utilizando os diferentes antígenos de *B. Ovis* (gel de acrilamida a 8% p/v, corado por Coomassie Blue)

- (a) Marcadores de peso molecular; (b) antígeno IIa; (c) coluna vazia; (d) antígeno IIb; (e) antígeno padrão; (f) antígeno I; (g) antígeno Iib

É possível verificar uma correlação de bandas entre os antígenos I, IIb e padrão. As bandas observadas ocorreram a aproximadamente 200KDa, 116.25KDa, 97.4KDa, 66.2KDa e 31KDa, respectivamente. O antígeno IIa apresentou uma banda concentrada em 200KDa. Segundo RIEZU-BOJ *et al.* (1989), através da técnica de SDS-PAGE e fazendo uma análise da composição antigênica de *B. ovis* corada pelo “Coomassie Blue”, foram observadas bandas protéicas a aproximadamente 67KDa, 28.5KDa, 22.5KDa e 19.5Kda. Estes resultados diferem

dos obtidos no presente trabalho, confirmando as diferenças entre os antígenos produzidos através da mesma técnica (Figura 3).

Através do SENSIPROT as concentrações proteicas determinadas foram: antígeno IIa 24,2 mg/dl; antígeno IIb 62,6 mg/dl; padrão 23,6 mg/dl; e antígeno I 37,5 mg/dl. O antígeno IIb apresenta uma concentração proteica superior aos demais antígenos, os quais possuem concentrações similares entre si. Não é possível,

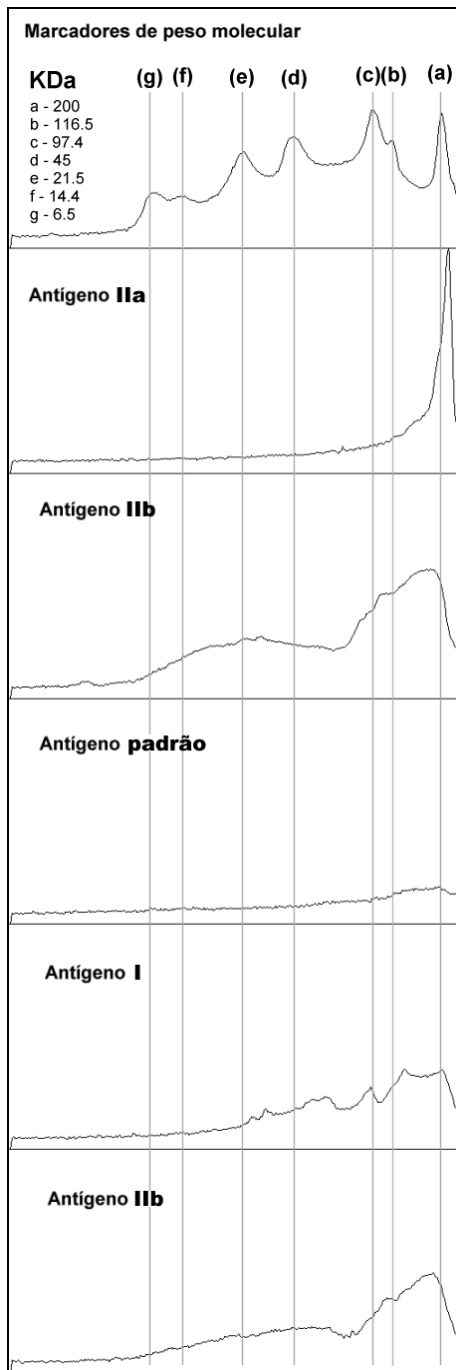


Figura 3. Análise do PAGE dos diferentes antígenos utilizados

portanto, atribuir a linha extra observada com o antígeno IIa a uma diferença quantitativa das proteínas presentes no mesmo. A linha extra pode ter sido causada por uma diferença no método de extração dos componentes de *Brucella ovis* que participam do antígeno, ou ainda à

presença de um contaminante, o qual poderia ser um contaminante bacteriano ou ser derivado de componentes do meio de cultivo.

CONCLUSÃO

Como todos esses antígenos são ou foram utilizados para o diagnóstico de *Brucella ovis*, é necessário verificar em soros hiperimunes de coelhos, e soros de carneiros infectados naturalmente, se os anticorpos produzidos reagem igualmente com as diferentes bandas proteicas identificadas. Caso isso não ocorra, podem haver resultados discrepantes se o diagnóstico sorológico de *Brucella ovis* for feito com antígenos diferentes, com a possível presença de bandas de precipitação extras dificultando a interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARRILLO, C.G. Conceptos sobre control de la Brucelosis; **Gaceta Veterinaria** p. 266, 1972
- CHIN, J. C., PANG-TURNER, B. **Journal of Clinical Microbiology**, Immunology Section v. 28 n. 1, p. 22647-2656, 1990.
- COGGINS, L., PATTEN, V. Immunodiffusion test for Equine Infectious Anemia. Reprinted from PROCEEDINGS OF 74TH ANNUAL MEETING U.S. ANIMAL HEALTH ASSOC., p. 568-571, 1979.
- CORBEL, M.J. & BRINLEY-MORGAN, W.J. Genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). In N. R. Krieg e J. G. Holt (ed.), **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, v. 1, p. 377-387. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- DILENA B.A, PENBERTHY L.A, FRASER CG. Six methods for determining urinary protein compared. **CLINICAL CHEMISTRY** v. 29 n. 3, p. 553-7, 1983.
- GENETZKY, R. M. Epididymitis in Rams. **COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTICING VETERINARIAN** v. 17 n. 3, p. 447-451, 1970
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4; **NATURE** n. 227, p. 680-685, 1970.
- McELDERRY L.A, TARBITT I.F, CASSELLS - SMITH A.J. Six methods for urinary protein compared. **CLINICAL CHEMISTRY** V. 28 n. 2, p. 356-360, 1982.
- RIEZU-BOJ, J. I.; MORIYÓN, I.; BLASCO, J. M.; GAMAZO, C. DIAZ, R. Antibody response to *Brucella*

ovis outer membrane proteins in ovine brucellosis.
INFECTION AND IMMUNITY v. 58 n. 2, p. 489-494,
1990.

WESTGARD J.O, GROTH T. Design and evaluation of
statistical control procedures: applications of a computer
"quality control simulator" program. CLINICAL
CHEMISTRY v. 27 n. 9, p. 1536-1545, 1981.