



DETECÇÃO DE AFLATOXINA B₁ NO ORGANISMO DE FRANGOS DE CORTE ATRAVÉS DO EMPREGO DE ENSAIO IMUNO-ENZIMÁTICO UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS (ELISA)

DETECTION OF AFLATOXIN B₁ IN THE ORGANISM OF BROILER CHICKENS THROUGH THE EMPLOYMENT OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY USING MONOCLONAL ANTIBODIES (ELISA)

CARLOS TADEU PIPPI SALLE^{1,2}, OBIRATÁ RODRIGUES², ÁLVARO BAVARESCO², GUSTAVO LORENZINI², HAMILTON LUIZ DE SOUZA MORAES^{1,2}, ARI BERNARDES DA SILVA^{1,2}, FELIPE DE OLIVEIRA SALLE³, VLADIMIR PINHEIRO DO NASCIMENTO^{1,2} & LUIZ CESAR BELLO FALLAVENA^{2,4}

RESUMO

As aflatoxinas prejudicam os parâmetros de produção, causam imunodepressão humoral e celular e afetam o mecanismo de coagulação. No sul do Brasil, a aflatoxicose representou de 15 a 29% dos casos examinados em laboratório de 1985 a 1991, sendo uma das principais enfermidades diagnosticadas no período em questão. Frangos de corte com 42 dias de idade, fêmeas, com peso médio de 1.800 g foram inoculados diretamente no ingluvío com 360 mg de aflatoxina B₁ através de dose única. Aos 30 minutos, 1, 2, 5, 8, 12 e 24 horas após a inoculação, cinco animais tratados e quatro controles foram sacrificados e coletados 40g de fígado, de cada um, para serem processados individualmente. Usou-se o "kit" comercial Veratox da Neogen Co. que emprega o ensaio imuno-enzimático utilizando anticorpos monoclonais (ELISA). Nos fígados, houve diferenças significativas (P<0,05) entre as médias dos inoculados e controles em todos os intervalos p.i. Nas primeiras duas horas p.i. 46,6% da toxina foi detectada neste órgão. O método pode ser útil para o diagnóstico da aflatoxicose das aves de maneira simples, rápida e econômica, eliminando, assim, os inconvenientes relativos à amostragem e disponibilidade do alimento quando se buscam aflatoxinas em rações e matérias-primas.

Descritores: Aflatoxina B₁, Frangos de corte, ELISA.

ABSTRACT

Aflatoxins are detrimental to production parameters, causing humoral and cellular immunodepression and affecting clotting mechanism. In southern Brazil, aflatoxicosis represented 15 to 29% of all clinical cases analysed by the laboratory during the 1985- 91 period, being one of the most important disease diagnosed during that period. Broiler chickens with 42 days old, females, with medium weight of 1.800g were inoculated directly in the ingluvium with 360mg of aflatoxina B₁ through only one dose. After 30 minutes, 1, 2, 5, 8, 12 and 24 hours the inoculation, five treated animals and four controls were killed and collected 40g of liver, from each one, to be processed individually. The commercial kit Veratox of Neogen Co. was used, which uses the enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies (ELISA). In the livers, there were significant differences (P <0.05) among the averages of the treated and controls in all the intervals p.i. In the first two hours p.i. 46.6% of the toxin were detected in this organ. The method can be useful for the diagnosis of aflatoxicosis in the birds in a simple, fast and economic way, eliminating, like this, the relative inconveniences to the sampling and readiness of the food when aflatoxins are searched in feedstuffs and raw materials.

Key words: Aflatoxin B₁, Broiler chickens, ELISA.

Received: October 2001

Accepted: April 2002

¹Departamento de Medicina Animal da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ²Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da FAVET - UFRGS [www.ufrgs.br/ppgcv/cdpa]. ³Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). ⁴Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

CORRESPONDÊNCIA: C.T.P. Salle [e-mail: ctps@ufrgs.br ; FAX: +55 51 33167305]. Caixa Postal 15094; Av. Bento Gonçalves, 9090; C.E.P. 91540-000, Porto Alegre, RS - Brasil.

INTRODUÇÃO

Está bem documentado que as aflatoxinas prejudicam os parâmetros de produção, causam imunodepressão humoral e celular e afetam o mecanismo de coagulação [7,8]. No sul do Brasil, a aflatoxicose representou de 15 a 29% dos casos examinados em laboratório de 1985 a 1991, sendo uma das principais enfermidades diagnosticadas no período em questão [9].

Uma publicação norte-americana de 1988, relatou que as micotoxinas, em especial as aflatoxinas e a zearalenona, presentes no alimento de 5 milhões de frangos, causaram prejuízo de US\$ 32,43 nos machos e de US\$ 9,2 nas fêmeas. Estes valores referem-se a grupos de 1.000 aves [5].

A distribuição tissular da aflatoxina B₁ 14C em frangos de corte foi determinada por cromatografia em camada delgada, que evidenciou a retenção da décima parte da dose administrada em aves, sendo suas porcentagens assim distribuídas: sangue 11%, fígado 9,8%, coração 4,3%, moela 12,5%, músculos peitorais 31,7% e coxas 30,6% [4].

Dentre as técnicas de diagnóstico utilizadas para determinar a presença de aflatoxinas, a de ELISA apresenta vantagens.

Um estudo sobre ensaio-imunoenzimático para a determinação de aflatoxina B₁, em comparação com os demais métodos convencionais, destacou as seguintes vantagens em favor do método ELISA: especificidade, sensibilidade, facilidade de execução e economia [6]. Estas características permitem analisar um grande número de amostras em um curto período de tempo.

No Japão o uso desta técnica para detectar aflatoxinas em grãos importados teve uma boa correlação com a cromatografia de alta resolução (HPLC) [3].

O uso de ensaio imuno-enzimático utilizando anticorpos monoclonais têm sido uma rotina no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA)-UFRGS. São usados "kits" importados produzidos pela Neogen Co., dos Estados Unidos da América, que têm a capacidade de fornecer resultados quali e quantitativos rápidos e confiáveis, quando se examinam rações e matérias-primas para consumo dos

animais. Porém o diagnóstico da aflatoxicose enfrenta uma dificuldade muito grande se o alimento suspeito não está disponível para a análise ou nos casos em que a amostragem do mesmo é mal feita. Assim sendo, a presença de aflatoxinas no organismo é suficiente para o diagnóstico final da enfermidade.

O trabalho tem por objetivo a detecção de aflatoxinas, pelo método de ELISA, no organismo de frangos de corte após a ingestão provocada de uma única dose de aflatoxina B₁.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aves

Foram utilizados 63 frangos de corte comerciais, fêmeas, com 42 dias de idade e com peso médio de 1.800g. Os animais foram mantidos no CDPA durante a fase experimental. No período de 24 horas anterior ao início do experimento e até seu final, não receberam alimento, mas foi servida água *ad libitum*. Ressalte-se que estes animais eram provenientes de um lote comercial e estavam consumindo ração com nível de 18 ppb de aflatoxinas.

Aflatoxina

Foi administrada, via inoculação direta no ingluvívio, 360 mg de aflatoxina B₁ pura¹ diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) para o grupo tratado, visando uma dosagem de 200 ppb em relação ao peso corporal e a mesma quantidade de DMSO para o grupo controle.

ELISA

Após a ingestão da toxina, 5 animais tratados e 4 controles foram sacrificados em intervalos de 30 min., 1, 2, 5, 8, 12 e 24 horas. Nestas ocasiões, se coletaram 40g de fígado de cada uma das aves e as amostras foram processadas individualmente, mantendo-se a relação de 1:5 entre o peso da amostra e metanol a 70% de acordo com o recomendado pela Neogen Co. para análise de aflatoxina em rações e matérias-primas. Os resultados estão expressados como a média das repetições dos tratados e dos controles.

Análise estatística

As diferenças entre as médias dos tratamentos e dos seus respectivos controles foram submetidos ao teste t-Student [2].

RESULTADOS

Nos fígados houve diferença significativa entre a quantidade de aflatoxina presente em todos os animais tratados em relação aos respectivos controles. Todos os animais experimentais pertenciam a uma granja avícola comercial de frangos de corte. A ração ingerida pelas aves continha 18ppb de aflatoxina. Por esta razão, considerou-se a diferença entre os níveis de aflatoxina presentes nos inoculados e controles como a quantidade de toxina detectada pelo método em questão, como produto da inoculação experimental. O diferencial entre tratados e controles aos 30 minutos p.i. foi de 40,94 ppb. Com 1 e 2 horas p.i. a diferença foi de 33,7ppb e de 18,66 ppb, respectivamente. A partir daí, houve uma queda acentuada nas quantidades de aflatoxina, tanto nos tratados quanto nos controles e as diferenças oscilaram entre 2 a 4 ppb. (Tabela 1).

A Figura 1 retrata a presença de aflatoxinas no fígado. Considerou-se a diferença entre tratados e controles como decorrência da intoxicação aguda de 200 ppb da toxina. Assim sendo, nas primeiras duas

horas p.i. quase 46,6% da toxina total foi detectada naquele órgão.

DISCUSSÃO

O presente trabalho utilizou uma metodologia muito simples, baseada na recomendação dos fabricantes dos kits comerciais para ser usada em rações e matérias-primas. Por esta razão, fica difícil comparar os resultados aqui obtidos com os de outros pesquisadores, que utilizaram radio-imunoensaio ou cromatografia e complicadas e trabalhosas técnicas de extração da toxina.

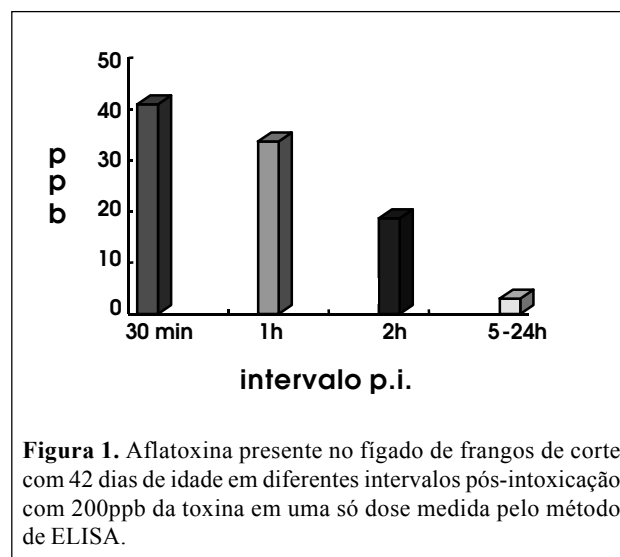


Tabela 1. Níveis de aflatoxina presentes no fígado de frangos de corte com 42 dias de idade, após ingestão de uma dose única de 200 ppb da toxina.

Tempo pós-inoculação	Tratados (ppb)	Controles (ppb)	Diferença (T-C)
30 minutos	47,66 ± 14,65 *	6,72 ± 6,29	40,94
1 hora	51,24 ± 19,41 *	17,55 ± 11,74	33,69
2 horas	25,58 ± 9,86 *	6,92 ± 8,01	18,66
5 horas	3,62 ± 3,20 *	< 1,00	
8 horas	4,82 ± 1,65 *	< 1,00	
12 horas	3,22 ± 1,56 *	< 1,00	
24 horas	3,76 ± 1,96 *	< 1,00	

Média ± desvio padrão

* = diferença significativa (P < 0,05) do respectivo controle.

Os resultados deste experimento deixam claro que é possível fazer o diagnóstico rotineiro, rápido e econômico da aflatoxicose, pois é bem conhecido dos médicos veterinários a dificuldade para caracterizar esta enfermidade através da análise do alimento. Muitas vezes as amostragens não são corretas ou a ração suspeita já foi consumida. Mais ainda, este método evidencia que houve uma efetiva ingestão de aflatoxinas pelas aves. Estes resultados estimularão a realização de programas de controle de micotoxinas e orientará a monitorização que medirá a eficácia das medidas propostas.

Este método pode ser muito útil em futuros projetos de pesquisa delineados para dimensionar o problema da aflatoxicose crônica nos plantéis avícolas, avaliar a eficácia de tratamentos contra a aflatoxicose e orientar estes tratamentos para que sejam economicamente viáveis, principalmente nas grandes empresas avícolas.

CONCLUSÃO

É possível a detecção de aflatoxinas no fígado de frangos, usando-se “kits” comerciais que empregam anticorpos monoclonais medidos pelo ensaio-imunoenzimático.

AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio recebido.

NOTA INFORMATIVA

¹Sigma-Aldrich, Rua Sabará, 566/53, C.E.P. 01239-010, São Paulo/SP-Brasil

REFERÊNCIAS

- 1 **Alvarez M.T., Castañeda C., Escobar A. & Fragoso T. 1991.** Detección de aflatoxina en la orina en enfermedades hepáticas en la infancia. *Genetic Engineering News*. 45: 205-209.
- 2 **Daniel W.W. 1977.** Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. México: Editorial Limusa, 485p.
- 3 **Hirano K., Adchi Y., Hara M., Ishibashi S., Sueyoshi M., Ueno I., Egawa K. & Kumazawa N.H. 1991.** Detection of aflatoxin B₁ in imported kernel used as feed by enzyme-linked-immuno-sorbent assay. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 53: 767-768.
- 4 **Mabee M.S. & Chipley J.R. 1973.** Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B₁- 14C in broiler chickens. *Applied Microbiology*. 25: 763-769.
- 5 **Muirhead S. 1989.** Studies show cost of mycotoxin contamination to poultry firms. *Feedstuffs*. 61(48): 10.
- 6 **Pestksa J.J. 1988.** Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 71:1075-1081.
- 7 **Salle C.T.P. 1979.** Influência de diferentes niveles de aflatoxina B₁ en el comportamiento de pollos White Leghorn y su respuesta inmune frente al virus de la Enfermedad de Newcastle. 95p. Cidade do México, México. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 8 **Salle C.T.P. 1986.** As aflatoxinas como fatores imunodepressores. *Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*. 9: 73-82.
- 9 **Salle C.T.P. & Wendelstein A.C. 1992.** Situação da aflatoxicose no Sul do Brasil. In: *Anais do III Ciclo de Conferências da Associação dos Médicos Veterinários Especialistas em Avicultura* - A.V.E. (Porto Alegre, Brasil). Novembro de 1992. Não paginado.

