



PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 32, Out/86, p. 1-4

IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Babesia bigemina* E *Babesia bovis*: PRODUÇÃO DE ANTÍGENO COM CEPAS ISOLADAS NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO TESTE

Cláudio Roberto Madruga¹
Raul Henrique Kessler²
Elane Fabrício de Jesus³
Alciovane João do Sete⁴

A babesiose bovina no Brasil ocorre de forma enzoótica em quase todo o território, sendo o carrapato *Boophilus microplus* o único vetor conhecido. Mesmo nestas áreas em que a situação é reconhecida como de estabilidade enzoótica, são observadas manifestações clínicas da doença, causando a morte ou retardamento no desenvolvimento do animal. Esta situação é mais grave nas áreas ditas marginais ou de instabilidade enzoótica onde as condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento do carrapato. Exemplos desta situação podem ser verificados durante o inverno, no extremo sul, e possivelmente, no Nordeste, após longos períodos de estiagem.

Assim, como outras doenças transmitidas por vetor, a babesiose é um paradoxo para o criador. O controle eficiente do vetor é economicamente desejável, mas, alcançando-se isto, a taxa de transmissão da *Babesia* pode ser reduzida abaixo no nível requerido para se manter a imunidade do rebanho. A reversão à susceptibilidade acontece de maneira imperceptível, porque o criador não tem a oportunidade de controlar o processo, até que a doença se manifeste, quando é impossível a prevenção. A disponibilidade de técnicas sorológicas de diagnóstico é indispensável para o reconhecimento da situação epidemiológica da população, possibilitando assim o uso de medidas preventivas.

¹Méd.-Vet., M.Sc., Pesquisador da EMBRAPA-CNPGC

²Méd.-Vet., Ph.D., Pesquisador da EMBRAPA-CNPGC

³Méd.-Vet., Bolsista do CNPq

⁴Laboratorista, EMBRAPA-CNPGC

Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos testes sorológicos, mas a imunofluorescência indireta (IFI) apresenta uma série de vantagens. É executada com relativa facilidade e permite uma análise qualitativa e quantitativa dos soros com alto grau de especificidade e sensibilidade.

A origem do material para a produção do antígeno para a IFI foram as cepas de *B. bovis* GC 4974-83 e de *B. bigemina* GC 5118-83, isoladas no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

A produção de antígeno de *B. bigemina* processou-se da seguinte forma: dois bezerros (n^{os} 6428 e 6415) da raça Nelore (*Bos indicus*), criados livres de infecção por hemoparasitos, foram esplenectomizados e mantidos em baias individuais. O bezerro 6428 foi inoculado por via endovenosa (e.v.), com 110 ml de um estabilizado com 7,3% de eritrócitos parasitados por *B. bigemina*. Em virtude de o bezerro ter sido inoculado 67 dias após a esplenectomia, foram aplicadas injeções intramusculares (i.m.) de 10 mg de dexametazona¹, nos três dias que antecederam a inoculação, para diminuir a reação imunológica. No sétimo dia pós-inoculação (PI), quando a parasitemia era de 0,9% e o hematócrito de 19% foram colhidos 250 ml de sangue deste bezerro em solução de citrato de sódio a 2,08% na proporção 9:1. O sangue foi centrifugado a 1090 x g por 10 minutos a 4°C, sendo removido o plasma e os leucócitos. Após serem lavados por três vezes com uma solução tampão fosfato pH 7,2 por centrifugação na mesma rotação, tempo e temperatura, os eritrócitos foram recolocados em suspensão em soro glicosado a 5% e inoculados (e.v.) no bezerro 6415. A inoculação foi efetuada 17 dias após esplenectomia. As lâminas de antígeno foram preparadas no segundo dia PI, quando a parasitemia era de 4,5% e hematócrito 32% e no terceiro dia PI quando a parasitemia e o hematócrito eram de 19%. As amostras de sangue foram colhidas e os eritrócitos lavados conforme descrito anteriormente. Após a última lavagem os eritrócitos foram recolocados em suspensão em uma solução tampão fosfato pH 7,2 a uma concentração final ajustada para 50% de hematócrito. Com esta suspensão de eritrócitos parasitados foram feitas distensões com camada fina em lâminas de microscópio novas e limpas com gaze.

Para a preparação do antígeno de *B. bovis* utilizou-se o sangue do bezerro 5785 que apresentava uma parasitemia de 8,3% e um hematócrito de 25%

¹Azium - Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A. - Divisão de Produtos Veterinários - Rio de Janeiro, RJ.

seis dias após a inoculação. Este animal era o sétimo de uma série de passagens rápidas da cepa GC 4974-83, em bezerros esplenectomizados. Os métodos de coleta, manipulação e preparação das lâminas de antígeno, foram idênticos aos utilizados para *B. bigemina*, descritos anteriormente.

A execução do teste foi de acordo com descrições anteriores, exceto o período de incubação após a aplicação do conjugado que foi de 30 minutos a 37°C. A leitura dos resultados foi em um microscópio Zeiss Universal com condensador III RS e epiluminação. Tendo como fonte luminosa uma lâmpada HBO de 50 W, ocular 10 X e objetiva de imersão 50 X em glicerina tamponada, colocada diretamente sobre a preparação.

A avaliação preliminar do teste de IFI foi conduzida da seguinte maneira: para se determinar o grau de sensibilidade e especificidade do teste foram realizadas provas com 123 soros comprovadamente negativos, oriundos de animais criados em área livre de carrapatos, e com 123 soros positivos obtidos de animais criados em área enzoótica que apresentaram *Babesia* ou foram inoculados experimentalmente. Para se determinar a persistência dos anticorpos foram inoculados experimentalmente cinco bezerros com cepas puras de *B. bovis* e quatro com *B. bigemina*.

O antígeno de *B. bigemina*, para a prova de IFI, preparado a partir do material colhido no segundo dia PI foi superior ao obtido no terceiro dia PI, quanto a nitidez da morfologia do hemoprotozoário e fluorescência não específica. Embora as duas preparações de antígeno tenham demonstrado o mesmo grau de sensibilidade e especificidade, a análise visual dos soros, com relação as reações fraco positivas, foram dificultadas com o antígeno preparado três dias PI. Este problema pode ser mais acentuado, a ponto de comprometer a qualidade do antígeno, à medida que aumenta o grau de hemólise.

A preparação de antígeno de *B. bovis* não apresentou o mesmo nível de dificuldade, pois a hemólise parece não influir de forma tão crítica quanto em *B. bigemina*, embora tenha sido necessário um maior número de passagens para ser obtida uma percentagem de parasitos compatível com a preparação do antígeno antes da formação de anticorpos específicos contra o hemoparasito pelo animal inoculado.

A IFI pode ser um teste sorológico de ligação primária, isto é, mensura diretamente a interação entre antígeno-anticorpo, é um dos testes de maior sensibilidade. No diagnóstico de anticorpos contra *B. bovis* apresentou es-

pecificidade de 96,8% e sensibilidade de 97,9%, e para *B. bigemina* tanto a especificidade como a sensibilidade foram de 100%. Nos cinco animais infectados experimentalmente com *B. bigemina* e quatro com *B. bovis* o teste de IFI detectou anticorpos por períodos longos, 335 dias PI para o primeiro hemoparasito e 276 dias PI para o segundo, embora estes pudessem ser maiores, pois os soros foram coletados somente até os dias PI mencionados.

Falta uma análise das possíveis reações cruzadas decorrentes dos antígenos comuns do gênero *Babesia*, presente na *B. bovis* e *B. bigemina*, embora exista uma série de referências demonstrando que os antígenos permitem uma diferenciação entre as espécies, particularmente quando a prova é padronizada criteriosamente. Entretanto, os dados constatados conferem, a princípio, às técnicas de IFI desenvolvidas no CNPGC o mesmo padrão de qualidade referido na literatura mundial. Estes testes sorológicos portanto, possuem um grande valor para os estudos epidemiológicos e imunológicos pois os anticorpos detectados têm alta relação com a proteção contra a babesiose.

Tiragem: 700 exemplares