



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - MA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte - CNPGC
Rodovia BR 262, km 4
Vila Popular
Caixa Postal 154
79100 Campo Grande, MS.

PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 31, Out/86, p.1-4

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E ANÁLISE PRELIMINAR DO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DE ANTICORPOS CONTRA *Anaplasma marginale*

Cláudio Roberto Madruga¹
Raul Henrique Kessler²
Ana Maria Sastre Sacco³
Elane Fabrício de Jesus⁴
Cláudio Tadashi Miguita⁵

A anaplasmosose bovina ocorre endemicamente em quase todo o território nacional, causando importantes problemas sanitários não somente em áreas de estabilidade enzoótica, mas também em áreas de instabilidade enzoótica, como no Estado do Rio Grande do Sul.

Para reduzir o efeito da doença sobre a produtividade dos rebanhos é fundamental desenvolver um sistema eficiente e econômico de controle da anaplasmosose. Os testes sorológicos se apresentam como uma das formas de se atingir este objetivo, pois estes possibilitam as investigações epidemiológicas e a conseqüente determinação da importância sanitária e econômica desta doença nas diversas regiões ecológicas do país.

No Brasil a utilização das provas sorológicas para o diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale* é limitada, pois não há produção de antígenos.

Por estas razões foi desenvolvida a prova de imunofluorescência indireta (IFI) como método de diagnóstico.

Os testes de IFI vêm sendo realizados desde 1966, e demonstraram ter maior sensibilidade que os demais testes sorológicos utilizados para o diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. Apesar disso, até o

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

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

³Méd.-Vet., M.Sc., Pesquisador da EMBRAPA-UAPNPSA, à disposição do CNPGC

⁴Bolsista do PIEP

⁵Auxiliar de Laboratório, EMBRAPA-CNPGC

presente, esta prova não foi totalmente aceita, devido aos problemas de especificidade, isto é, de falsos positivos que se apresentam em algumas ocasiões. Isto é devido à fluorescência não específica decorrente da ação de anticorpos antieritrofilicos, auto-anticorpos dirigidos às membranas das células infectadas ou alteradas, precipitados do soro ou do fluorocromo do conjugado e, ocasionalmente, há presença de isoanticorpos específicos contra antígenos dos eritrócitos. Muitas tentativas de aperfeiçoamento do teste vêm sendo realizadas, inclusive com a utilização de microfluorímetro, que mensura a intensidade da fluorescência.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica modificada de produção de antígeno e testar diferentes técnicas de montagem do teste.

Para a produção do antígeno foram utilizados bezerros da raça Nelore (*Bos indicus*) com idades variando entre 6 e 8 meses. Todos os animais foram inoculados previamente com 10 mg/dia de dexametazona. As passagens das hemáceas parasitadas aos bezerros susceptíveis foram realizadas após a separação do plasma e três lavagens em solução tampão fosfato com pH 7,2. No primeiro animal foram inoculados por via endovenosa (e.v.) 200 ml de hemáceas lavadas (HL) com 100% de parasitemia. Quatorze dias pós-inoculação (PI), quando a percentagem de hemáceas parasitadas atingiu 20,1% e o hematócrito 23%, foram inoculados 400 ml de HL no bezerro nº 02. Este animal apresentou parasitemia de 13% e hematócrito de 23% no 6º dia PI, sendo produzido antígeno e passagem de 350 ml de HL para o bezerro nº 03. Foi colhido sangue desse animal para a produção de antígeno no 2º dia PI, quando a parasitemia era de 8,8% e, no 3º dia, com parasitemia de 12,7%. No 6º dia PI, quando a parasitemia decresceu de 30,9 para 18,8%, foram transferidos 300 ml de HL para o bezerro nº 04, que desenvolveu a parasitemia de forma muito lenta, não permitindo a preparação de antígeno antes que surdissem anticorpos contra *A. marginale*. Deste animal foram passados 300 ml de HL para o bezerro nº 05, que no 2º dia PI apresentou parasitemia de 6,9%, tendo sido coletado também sangue para a preparação do antígeno.

O sangue foi colhido em solução de citrato de sódio a 3,8% e imediatamente lavado em solução tampão fosfato (STF) fria com pH 7,2 por três vezes. Após as lavagens, as hemáceas foram resuspensas no mesmo tampão, de maneira a ser obtido um hematócrito entre 30 e 35%. Ao volume final foi

acrescentado 1% de soro de feto bovino. Com esse material foram preparados esfregaços que foram secos sob ventilação. As lâminas de antígeno foram envoltas em fita adesiva e armazenadas em congelado sob temperatura de -70°C .

Para a montagem da prova as lâminas de antígeno foram retiradas do congelador e imediatamente colocadas em estufa a 37°C durante 10 minutos. Após esse período a fita adesiva foi retirada e, utilizando-se esmalte opaco, foram feitos círculos de aproximadamente 5 mm de diâmetro em toda a extensão da lâmina. Na primeira fileira do sentido transversal da lâmina foram colocados os controles positivo forte, fraco positivo e negativo. Os soros foram testados a partir da diluição inicial 1:80. As lâminas foram colocadas em incubação a 37°C em câmaras úmidas durante 30 minutos. Após esse período, foram lavadas por 3 vezes durante 10 minutos na STF fria e colocadas para secar sob ventilação. O conjugado antiimunoglobulina bovina na diluição de trabalho (1:40) foi aplicado em todos os círculos com soro e as lâminas voltaram à incubação em câmara úmida por 30 minutos a 37°C . Após esse tempo foram lavadas 2 vezes com STF por 10 minutos, e uma vez por 5 minutos, com água destilada tamponada. Após a secagem das lâminas foi colocada sobre os círculos de esmalte glicerina tamponada a 50%. A leitura foi realizada em microscópio Zeiss Universal com condensador III RS, epiluminação tendo como fonte luminosa uma lâmpada de mercúrio HBO 50W, e objetiva de imersão 50 com cobertura 0,95 e ocular 10x. Os testes críticos iniciais da prova foram realizados com soros de bovinos criados abaixo do paralelo 32°S considerados negativos para determinar a especificidade e com soros de animais de áreas enzoóticas que apresentavam parasitemia 15 dias antes da colheita do soro.

A análise visual de todos os antígenos evidenciou grau mínimo de fluorescência não específica. Dois fatores contribuíram para isto: a colheita do sangue parasitado antes do surgimento de anticorpos no bovino inoculado, evitando desta maneira formação de complexos antígeno-anticorpo; e a lavagem imediata deste material. Nesta mesma análise visual foi constatado que os antígenos produzidos 2 dias PI, além de apresentarem fluorescência não específica ainda menor, tiveram maior homogeneidade por serem compostos essencialmente por corpúsculos iniciais, enquanto que os antígenos de 3 dias PI e, principalmente, aqueles de 6 dias PI possuíam alguns corpús-

culos maiores, denominados corpúsculos de inclusão, que fluoreciam mais que outros corpúsculos de inclusão e iniciais.

Até o presente momento, foram realizados testes críticos com o antígeno produzido 6 dias PI. A prova de IFI apresentou alto grau de especificidade e sensibilidade, 95,3% e 97,9% respectivamente. Estes índices poderão ser ainda maiores com os antígenos preparados 2 dias PI.

Portanto, considerando os fatores acima mencionados como críticos na produção do antígeno e com padronização criteriosa do teste, a IFI pode ser utilizada como importante ferramenta para estudos epidemiológicos e imunológicos.