

Nº 50, Junho/1999, p. 1-3

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PROVA DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA PARA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS:
RESULTADOS PRELIMINARES**

Claudio Roberto Madruga¹
Flávio R. Araújo²
Terezinha M. da Cruz³
Maria Aparecida M. Schenk⁴

Até recentemente, no Brasil, descrições da presença de *Trypanosoma vivax* se restringiam à região Norte, sendo o primeiro relato em búfalos em 1972 no Estado do Pará. Somente em 1995, *T. vivax* foi identificado na região pantaneira de Poconé, no Estado de Mato Grosso, e em Mato Grosso do Sul. Esse dado sugere que este hemoprotozoário está se expandindo no território nacional e tem potencial para atingir outras áreas, por causa do modo de transmissão. *T. vivax* tem sido reportado como responsável por grandes perdas econômicas à bovinocultura em áreas tropicais, refletidas por perdas na produção de carne e leite, infertilidade, retardamento no crescimento e mortalidade dos animais. A infecção por esse hemoparasito é caracterizada por emagrecimento progressivo, anemia, edema de barbela, febre, anorexia, oftalmite, diarreia e abortos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um teste de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA), a partir de um isolado de *T. vivax* da região do Pantanal, para detecção de anticorpos contra esse hemoparasito em bovinos, e disponibilizar uma técnica de diagnóstico sorológico para os serviços de vigilância sanitária, após a avaliação da sua sensibilidade e especificidade. O antígeno para o ELISA foi preparado a partir do sangue de uma vaca mestiça de Nelore da região de Poconé, Mato Grosso, parasitada com *T. vivax*, e com sintomas clínicos de tripanossomose. A produção de antígeno para o teste

¹ Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº 0587, Embrapa Gado de Corte, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS, Brasil.

² Departamento de Medicina Veterinária, UNIDERP.

³ Bolsista CNPq.

⁴ Méda.-Veta., M.Sc., CRMV-MS nº 0157, Embrapa Gado de Corte.

de imunoadsorção enzimática foi realizada a partir de sangue com 40 hemoparasitos por campo. O sangue parasitado foi centrifugado a 3.000 rpm durante cinco minutos, e o plasma e a interface de leucócitos foram recolhidos para uma centrifugação a 10.000 rpm durante 30 minutos. Ao sedimento obtido foi adicionado tampão de lise (tris 100 mM, EDTA 10mM, TLCK 0,2 mM, PMSF 2 mM, NP-40 1,0%) e esse material foi homogeneizado em Ten-Broeck. Esse processo foi repetido três vezes, seguido por um congelamento por doze horas a -70°C . Após, foi descongelado em banho-maria e homogeneizado em Ten-Broeck, e submetido à disrupção ultra-sônica por 4,5 minutos. Finalmente, foi efetuada uma centrifugação por 14.000 rpm por 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -70°C . A execução da prova de ELISA foi realizada após várias alternativas de padronização terem sido estudadas. Placas de poliestireno, de 96 poços, com fundo chato e alta capacidade de adsorção de antígeno (Costar-3590), foram sensibilizadas com 100 μL de antígeno diluído em salina fosfatada tamponada com Tween 20% a 0,1% (Na_2HPO_4 0,01M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0,01M; NaCl 0,01M) (PBST), por quatro horas, a 4°C , e congeladas por doze horas a -70°C . Após o descongelamento, foram feitas cinco lavagens com PBST e adicionados 100 μL por poço dos soros-teste e dos controles, diluídos a 1:500 em PBST. As placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos em câmara úmida e, em seguida, lavadas como descrito anteriormente. Posteriormente, foram colocados 50 μL da anti-IgG bovina, produzida em coelho, conjugada com fosfatase alcalina (Sigma), diluída em PBST a 1:24.000, e as microplacas foram incubadas por 30 minutos, a 37°C . Após dez lavagens com PBST, foram adicionados 50 μL do substrato p-nitrofenil fosfato (0,5 mg/mL), diluído em tampão do substrato (dietanolamina 0,1M; MgCl_2 0,05M; NaCl 0,1M). A reação foi interrompida a quinze minutos depois pela adição de NaOH , 0,2 M. Os resultados foram obtidos por espectrofotometria, em leitora de microplacas, com filtro de 450 nm. O valor discriminante entre positivo e negativo foi determinado como sendo a média das densidades ópticas de 61 soros de bovinos provenientes de região considerada livre de *T. vivax* (Bagé, RS), mais três desvios-padrão. A sensibilidade foi determinada com dezessete soros de bovinos infectados naturalmente com *T. vivax*, provenientes das regiões de Bodoquena, MS, e Poconé, MT, e três animais inoculados experimentalmente via subcutânea com 2×10^4 tripomastigotas. Todos os bovinos infectados apresentaram parasitemia pela técnica do micro-hematócrito. A especificidade foi avaliada com 97 soros de bovinos procedentes de

Bagé, RS, região em que não houve relatos da presença de *T. vivax*, e de 20 animais esplenectomizados e mantidos no isolamento da Embrapa Gado Corte, em ambiente livre de insetos vetores de *T. vivax*. A dinâmica da produção de anticorpos contra *T. vivax* em bovinos experimentalmente infectados foi estudada com seis bezerros Nelore, de sete meses de idade, intactos, inoculados experimentalmente com 10^7 tripomastigotas de *T. vivax*, por via endovenosa. As reações cruzadas foram analisadas com soros de bezerros infectados experimentalmente com *T. evansi*, *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*. A sensibilidade determinada com soros comprovadamente positivos para *T. vivax* e especificidade com soros negativos à *Babesia* e *Anaplasma* foram de 100%. No estudo de dinâmica de produção de anticorpos, todos os bezerros apresentaram parasitemia entre o 3º e o 4º DPI e as soroconversões ocorreram entre o 6º e 8º DPI. Todos os animais permaneceram soropositivos até o último dia de análise, exceto o bezerro 6, que tornou-se soronegativo no 38º DPI. Os bezerros 4 e 5 apresentaram parasitemia até próximo do último dia de análise (36º e 30º DPI, respectivamente), enquanto que nos outros quatro animais, só foram observados parasitos nas distensões sangüíneas no máximo 23 dias PI. As percentagens de reações cruzadas são apresentadas na Tabela 1. Os dados obtidos até o momento revelaram que o ELISA desenvolvido apresentou uma alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos contra *T. vivax* em bovinos. As principais conclusões do trabalho até o momento são as seguintes: o teste possui alta sensibilidade e especificidade, não apresenta reações cruzadas com *A. marginale* e *B. bigemina* e as reações cruzadas com *T. evansi* e *B. bovis* foram de percentuais baixos. O desempenho deste teste recomenda a sua utilização em estudos epidemiológicos.

TABELA 1. Análise de reações cruzadas de bovinos inoculados experimentalmente com *Trypanosoma evansi*, *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* perante o antígeno de *T. vivax* no ELISA.

| Agente | Nº de soros analisados | Nº de reações cruzadas (%) | |
|---------------------|------------------------|----------------------------|--------|
| <i>T. evansi</i> | 102 | 5 | (4,90) |
| <i>B. bovis</i> | 20 | 1 | (5,00) |
| <i>B. bigemina</i> | 20 | 0 | (0,00) |
| <i>A. marginale</i> | 20 | 0 | (0,00) |