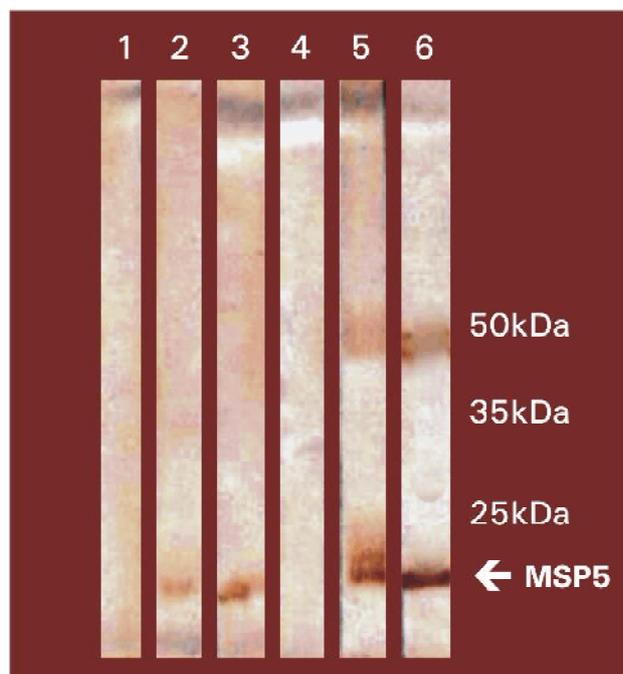


**ELISA com MSP5
Recombinante Truncada
para Detecção de
Anticorpos contra
Anaplasma marginale em
Bovinos**



ISSN 1517-3747

Setembro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 163

ELISA com MSP5 Recombinante Truncada para Detecção de Anticorpos contra *Anaplasma marginale* em Bovinos

*Flávio Ribeiro de Araújo
Elaine Silva de Pádua Melo
Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Cleber Oliveira Soares
Gracia Maria Soares Rosinha
Carina Elisei*

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Foto da capa: *Flávio Ribeiro de Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2006): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte.

ELISA com MSP5 recombinante truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos / Flávio Ribeiro de Araújo... [et al.]. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2006.

25 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 163).

Autores: Flávio Ribeiro de Araújo, Elaine Silva de Pádua Melo, Carlos Alberto do Nascimento Ramos, Cleber Oliveira Soares, Gracia Maria Soares Rosinha. Carina Elisei

1. Imunologia. 2. Bovinos 3. Anaplasmoses. 4. ELISA. 5. MSP5. I. Araújo, Flávio Ribeiro de. II. Melo, Elaine Silva de Pádua. III. Ramos, Carlos Alberto do Nascimento. IV. Soares, Cleber Oliveira. V. Rosinha, Gracia Maria Soares. VI. Elisei, Carina. VII. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VIII. Título. IX. Série.

CDD 636.0896079 (21.ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2006

Autores

Flávio Ribeiro de Araújo

Médico-Veterinário, Ph.D. em Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, flabio@cnpqgc.embrapa.br

Elaine Silva de Pádua Melo

Bióloga, Bolsista de Mestrado da Fundect-CNPq

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Médico-Veterinário, bolsista de Mestrado Fundect-CNPq

Cleber Oliveira Soares

Médico-Veterinário, Ph.D. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Bolsista do CNPq, cleber@cnpqgc.embrapa.br

Gracia Maria Soares Rosinha

Engenheira-Agrônoma, Ph.D. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, rosinha@cnpqgc.embrapa.br

Carina Elisei

Bióloga, Ph.D., Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional, Fundect-CNPq, elisei@cnpqg.embrapa.br

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	10
Material e métodos	12
Clonagem e expressão de MSP5 truncada	12
Solubilização da MSP5 truncada	12
Purificação e avaliação da antigenicidade de MSP5 truncada	13
Padronização e avaliação do ELISA com MSP5 truncada	13
Análise estatística	14
Resultados e discussão	15
Agradecimentos	21
Referências bibliográficas	21

ELISA com MSP5 Recombinante Truncada para Detecção de Anticorpos contra *Anaplasma marginale* em Bovinos

Flávio Ribeiro de Araújo

Elaine Silva Pádua Melo

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Cleber Oliveira Soares

Grácia Maria Soares Rosinha

Carina Elisei

Resumo

Os objetivos buscados pelos autores neste estudo foram produzir e solubilizar a proteína MSP5 recombinante truncada de *Anaplasma marginale* e avaliar seu desempenho em um ensaio de imunoadsorção enzimática indireto para detecção de anticorpos contra a riquetsia. O gene *msp5*, exceto a região N-terminal hidrofóbica, foi amplificado por reação em cadeia da polimerase, clonado em plasmídeo *pTrcHis-TOPO* e expresso em *Escherichia coli*. A solubilização da proteína recombinante foi avaliada em diferentes pHs e concentrações de uréia. A sensibilidade e a especificidade do ensaio foram avaliados testando-se 66 soros de animais infectados experimentalmente com *A. marginale* e 96 soros negativos, com o estado de infecção desses animais confirmado por reação em cadeia da polimerase. Um total de 1.666 amostras de soros bovinos, provenientes do Brasil - Rio Grande do Sul (73), Mato Grosso do Sul (91), Pernambuco (86), Bahia (314) e Minas Gerais (267), assim como do Uruguai (32) e Costa Rica (803) foram testadas nos ELISAs com MSP5 truncada e com MSP1a recombinantes, e a concordância entre os dois testes foi avaliada. O ELISA indireto com MSP5 truncada foi capaz de detectar animais infectados com 96,97% de sensibilidade e 100% de especificidade. Nos animais infectados experimentalmente, o ELISA detectou anticorpos do 12º dia após a inoculação (DPI) até o último dia de

observação (37^o DPI). Os ELISAs para MSP5 e MSP1a apresentaram concordância de 95,67%, com índice *kappa* de 0,81. Os resultados discordantes apresentaram uma diferença significativa ($P < 0,001$). Anticorpos contra *A. marginale* foram detectados em animais de todas as regiões estudadas. O ELISA com MSP5 recombinante truncada apresentou bom desempenho na detecção de anticorpos contra *A. marginale*, com alta sensibilidade e especificidade, representando uma importante ferramenta para o diagnóstico da anaplasmoze bovina em estudos epidemiológicos.

Termos para indexação: anaplasmoze, ELISA, MSP5, proteína recombinante

ELISA with Truncated Recombinant MSP5 for Detection of Antibodies to *Anaplasma marginale* in Cattle

Abstract

The objectives of this work were the production and solubilization of recombinant truncated MSP5 of Anaplasma marginale and the evaluation of its performance in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies against the rickettsia in cattle. The fragment of msp5 gene, except the hydrophobic N-terminal region, was amplified by PCR, cloned in pTrcHis-TOPO plasmid and expressed in Escherichia coli. Solubilization of the recombinant protein was evaluated in different pHs and concentrations of urea. The sensibility and specificity of the assay were evaluated with 66 sera from cattle experimentally-infected and 96 sera from cattle free of A. marginale defined by polymerase chain reaction for msp5 gene. Serum samples from 1,666 cattle from Brazil: states of Rio Grande do Sul (73), Mato Grosso do Sul (91), Pernambuco (86), Bahia (314) and Minas Gerais (267); Uruguay (32) and Costa Rica (803) were tested by ELISAs with recombinant truncated MSP5 and with recombinant MSP1a, and the agreement between both ELISAs was calculated. ELISA with recombinant truncated MSP5 protein detected infected animals with sensibility of 96.97% and specificity of 100%. In cattle experimentally-infected, the ELISA detected antibodies from the 12th day post-infection (DPI) to the end of the experiment, at the 37th DPI. The agreement between the ELISAs with truncated MSP5 and MSP1a antigens was

*95.67%, with a kappa index of 0.81. Disagreement results showed a significant difference ($p < 0.001$). Antibodies for *A. marginale* were detected in animals of the all the region analyzed. The ELISA with recombinant truncated MSP5 showed a good performance in ELISA for detection of antibodies against *A. marginale*, with high sensitivity and specificity, representing an important tool for the diagnosis of anaplasmosis bovine in epidemiological studies.*

Index terms: *anaplasmosis, ELISA, MSP5, recombinant protein*

Introdução

Anaplasma marginale é uma bactéria intra-eritrocítica obrigatória que causa anaplasmosis em bovinos e outros ruminantes (PALMER, 1989). É classificada na ordem Rickettsiales, que foi recentemente reorganizada em duas famílias, Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, baseada na análise genética de 16S rRNA, *groEL* e genes que codificam para proteínas de superfície (DUMLER et al., 2001). A anaplasmosis é uma doença economicamente importante em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo, por determinar perdas econômicas por causa da mortalidade, redução no peso e produção de leite, além dos custos com tratamentos (KOCAN et al., 2003).

Muitas técnicas sorológicas têm sido descritas para o diagnóstico de infecções por *A. marginale*, incluindo teste de aglutinação em cartão (AMERALT; ROBY, 1968), imunofluorescência, fixação de complemento (GONZALEZ et al., 1978), radioimunoensaio (SCHUNTNER; LEATCH, 1988) e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (THOEN et al., 1980). Dentre estes, o ELISA é o teste mais aplicado (THOEN et al., 1980; WINKLER et al., 1987; DUZGUN et al., 1988; NIELSEN et al., 1996). No entanto, existem problemas de especificidade nesses ELISAs que utilizam, como antígeno, corpúsculos iniciais parcialmente purificados de eritrócitos infectados, que podem reagir inespecificamente com anticorpos anti-eritrócitos presentes no soro dos animais testados (DUZGUN et al., 1988).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, que possibilitou a produção de grandes quantidades de proteínas heterólogas em culturas bacterianas, as pesquisas sobre o desenvolvimento de testes sorológicos foram focadas nas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* (TORIONE DE ECHAIDE et al., 1998). Seis proteínas principais de superfície (*major surface proteins*-MSPs: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) foram inicialmente identificadas em *A. marginale* derivada de eritrócitos bovinos e de tecidos de carrapatos (BARBET et al., 1987; OBERLE et al., 1988; BOWIE et al., 2002). Essas proteínas são expostas na superfície da riquetsia, são facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro e desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasito (ARULKANTHAN et al., 1999).

A proteína MSP5 tem mostrado maior potencial para ser utilizada como antígeno em diagnóstico sorológico, por suas características de conservação entre diferentes espécies e isolados de *Anaplasma* sp. (VISSER et al., 1992; NDÜNG'U et al., 1995). No entanto, diferentes técnicas utilizadas para sua produção e purificação têm influenciado negativamente a exequibilidade dos ensaios. Como exemplos, no ELISA competitivo, ocorrem problemas de especificidade, provavelmente relacionados com a reação de anticorpos antiproteína de ligação à maltose (MBP), a qual está fusionada à MSP5 (TORIONE DE ECHAIDE et al., 1998). Já no ELISA indireto com MSP5, padronizado por Silva et al. (2006), a expressão de todo o gene, incluindo a região hidrofóbica N-terminal, inviabilizou a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em resina de agarose-níquel, dificultando a execução do teste.

Outro problema relacionado com os testes que empregam proteínas recombinantes produzidas em *Escherichia coli* consiste na eficiente solubilização delas, já que, em muitos casos, são formados corpúsculos de inclusão altamente insolúveis na bactéria e os métodos de solubilização rotineiramente empregam agentes altamente desnaturantes, que alteram a conformação da proteína, e, conseqüentemente, sua antigenicidade (PATRA et al., 2000).

Os objetivos deste estudo foram produzir a MSP5 recombinante truncada, excetuando o domínio hidrofóbico N-terminal da proteína, solubilizar a proteína e avaliar seu desempenho como antígeno em um ELISA indireto para o diagnóstico de *A. marginale* em bovinos.

Material e métodos

Clonagem e expressão de MSP5 truncada

A extração de DNA de *A. marginale* foi realizada a partir de sangue infectado com isolado Pernambuco - Zona da Mata (PE-ZM), utilizando o *kit* Easy DNA (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A amplificação do fragmento gênico de *msp5* foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores *msp5* F: 5' CGCAGATCTAGCAAATCGGCGAGAGGTTTACCACTTC 3' e *msp5* R: 5' GCGCTGCAG-TGGCGCAAATGCCCGACATACC 3', que amplificam todo o gene, exceto a região N-terminal hidrofóbica, determinado pelo programa Protean (DNASStar). Dessa forma, foi amplificado um fragmento de 543 pb (nucleotídeos 91 a 633). O produto da reação de amplificação foi utilizado para ligação ao plasmídeo *pTrcHis-TOPO* (Invitrogen), conforme metodologia descrita pelo fabricante. O plasmídeo resultante *pTrcHis-TOPO/msp5* foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen), quimicamente competentes, que posteriormente foram semeadas em meio Luria-Bertani (LB) ágar com 100 µg/mL de ampicilina, as quais foram incubadas por 12 horas a 37°C. Para verificar a presença e orientação dos insertos foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores *msp5 forward* e *pTrcHis reverse* (vetor). A indução da expressão do gene *msp5* foi realizada com 1 mM de isopropil-tio-b-D-galactopiranosídeo (IPTG) por seis horas a 37°C sob agitação (250 rpm).

Solubilização da MSP5 truncada

Após indução, 400 mL da cultura foram centrifugados a 12.000 x g a 4°C por dez minutos e o sedimento suspenso e homogeneizado em 20 mL de tampão (tris-HCL 50 mM, EDTA 5 mM (pH 8,5), 2% de triton X-100 e 0,16 mg/mL de lisozima) e incubado por uma hora em temperatura ambien-

te. A solução foi sonicada oito vezes, por 30 segundos (*output* 40) (Branson Sonifier 250) em gelo e centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sedimento foi suspenso em tris-base 100 mM, em diferentes concentrações de uréia e pHs. O sedimento foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 x g por dez minutos a 4°C para obtenção das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi diluída lentamente em 10 mL de tris-base 50 mM, uréia 2 M e o pH de toda a solução ajustado para 8.

Purificação e avaliação da antigenicidade de MSP5 truncada

A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de agarose-níquel (ProBond, Invitrogen), em condições nativas, adicionando-se às soluções 2 M de uréia. A proteína foi concentrada em filtro Centricon YM-10 (Millipore) e sua concentração avaliada pelo método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante. A antigenicidade de MSP5 truncada recombinante foi verificada por *Western blot*, com os anticorpos monoclonais ANAF16C1 anti-MSP5 (1:500) e anti 6x-histidina (1:3.000) (Amersham Pharmacia).

Padronização e avaliação do ELISA com MSP5 truncada

Para a padronização do ELISA com MSP5, diluições ótimas do antígeno, soros, conjugado e tampões utilizados no ensaio, assim como o tempo de parada da reação enzimática, foram avaliados com seis amostras de soros de bovinos negativos e seis positivos para *A. marginale* por PCR.

O ELISA foi realizado em microplacas (Costar 3590, Corning) sensibilizadas com 13 ng/poço de MSP5 recombinante truncada, diluída em PBST 0,1% e incubadas a 4°C por 12 horas. As placas foram bloqueadas com PBST contendo 5% de soro equino livre de imunoglobulinas (100 µL/poço) por uma hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, os soros testes, controles positivos e negativos, diluídos 1:600 em PBST (100 µL/poço), foram adicionados e as placas incubadas por uma hora a 37°C. Após mais cinco lavagens, foi adicionado o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Sigma), diluído 1:10.000 em PBST (100 µL/poço), seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Após cinco lavagens, o cromógeno/substrato

ortofenilenodiamina (OPD; Sigma)/H₂O₂ (50 µL/poço) foi adicionado. A reação enzimática foi parada após cinco minutos pela adição H₂SO₄ 2,5 N (100 µL/poço) e os resultados obtidos em espectrofotômetro para microplacas (EL-800, Bio-Tek), com comprimento de onda de 490 nm.

O cálculo da linha de corte (*cut-off*) foi determinado para cada placa de acordo com Frey et al. (1998), utilizando 12 controles negativos e estabelecendo o nível de confiança de 99,0%.

Foi realizada a determinação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão do ELISA com MSP5. Para a avaliação desses parâmetros foram testadas 162 amostras de soros, sendo 96 negativos e 66 de animais infectados experimentalmente com isolado PE-ZM de *A. marginale* obtidos do banco de soros da Área de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte. O estado de infecção desses animais foi confirmado por PCR para o gene *msp5*. Dos animais infectados experimentalmente, seis foram acompanhados a partir de uma semana antes da inoculação até 37 dias após.

Um total de 1.666 amostras de soros foi testados no ELISA com MSP5 e no ELISA com MSP1a recombinante descrito por Araújo et al. (2005), para avaliar a concordância entre os testes. Os soros testados foram provenientes de regiões distintas do Brasil - Rio Grande do Sul (73), Mato Grosso do Sul (91), Pernambuco (86), Bahia (314) e Minas Gerais (267), além do Uruguai (32) e da Costa Rica (803). Esses soros estavam estocados a -20°C, no banco de soros da Embrapa Gado de Corte e foram escolhidos baseados na disponibilidade deles.

Análise estatística

A avaliação da concordância entre os ELISAs com MSP5 e MSP1a foi determinada pelo índice *kappa* de acordo com Kramer e Feinstein (1981). Para avaliar a significância dos resultados discordantes entre os ELISAs foi aplicado o teste de qui-quadrado com nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

A amplificação do fragmento gênico que codifica para a porção hidrofílica de *msp5*, como esperado, resultou em um produto com cerca de 543 pb (Fig. 1). Os *amplicons* clonados em *pTrcHis-TOPO* geraram os plasmídeos recombinantes *pTrcHis-TOPO/MSP5*, confirmados por PCR de colônia. A expressão do fragmento do gene *msp5* atingiu produção máxima após seis horas de indução com IPTG e resultou em uma proteína truncada de aproximadamente 16 kDa, que corresponde à massa molecular esperada da porção hidrofílica de MSP5 (~ 13 kDa) e a do peptídeo N-terminal codificado pelo vetor *pTrcHis-TOPO* (3 kDa), que corresponde à cauda de seis histidinas (Fig. 2).

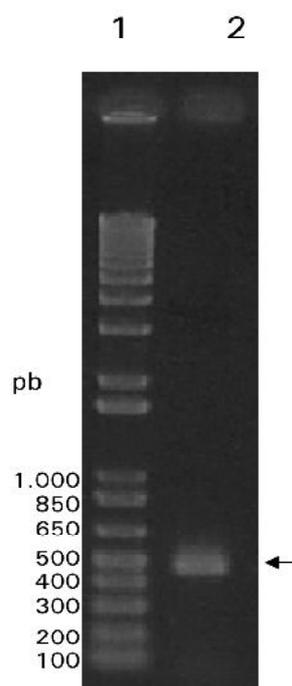


Fig. 1. Amplificação do gene *msp5* de isolado brasileiro (Pernambuco - Zona da Mata) de *Anaplasma marginale* por PCR. Linha 1: Marcador de pares de base 1Kb Plus (Invitrogen); linha 2: Fragmento do gene *msp5* amplificado.

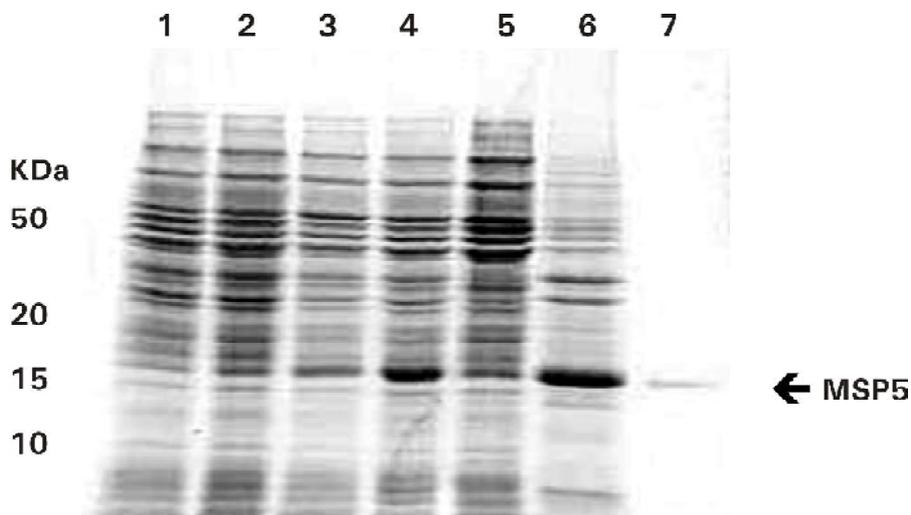


Fig. 2. Expressão de *msp5* de isolado brasileiro (Pernambuco - Zona da Mata) de *Anaplasma marginale*. Linha 1: *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp5* sem indução com IPTG; linha 2: indução por 2 h com IPTG; linha 3: indução por 4 h com IPTG; linha 4: indução por 6 horas com IPTG; linha 5: fração insolúvel; linha 6: fração solúvel; linha 7: MSP5 recombinante purificada (16kDa).

A proteína, presente em corpúsculos de inclusão insolúveis, foi solubilizada eficientemente quando se empregaram 2M de uréia, em pH 12,5. A solubilização possibilitou a purificação por cromatografia de afinidade e a obtenção de uma proteína pura. Silva et al. (2006), em estudo semelhante, empregando o mesmo sistema de expressão, não obtiveram o mesmo êxito na purificação por cromatografia de afinidade ao utilizar proteína MSP5 integral, o que só foi possível por eletroeluição, que é um método de baixo rendimento e, portanto, pouco vantajoso para a produção de proteína em larga escala. Desta forma, a maior capacidade de solubilização e purificação pode ser atribuída à utilização da proteína MSP5 truncada e fusionada à seqüência N-terminal de seis histidinas.

Trabalhos anteriores demonstraram que MSP5 é uma proteína codificada por uma única cópia de gene, altamente conservada entre diferentes isolados de *A. marginale*, bem como *A. centrale*, *A. ovis* e *A.*

phagocytophilum, no que diz respeito ao epitopo definido pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 (VISSER et al., 1992; MOLAD et al., 2004; DREHER et al., 2005). Isto foi confirmado neste estudo, no qual a proteína MSP5 truncada foi reconhecida especificamente por esse anticorpo e pelo anticorpo monoclonal anti-histidina (Fig. 3), mesmo após tratamento com uréia. Visser et al. (1992) e Munodzana et al. (1998) relatam uma perda parcial da capacidade de ligação do anticorpo monoclonal ANAF16C1 quando há alterações na estrutura secundária da MSP5, caracterizando o epitopo reconhecido como conformacional. A proteína manteve sua atividade antigênica após o procedimento de solubilização, evidenciando que não houve alterações apreciáveis de sua conformação, o que foi fundamental para a realização do ensaio sorológico.

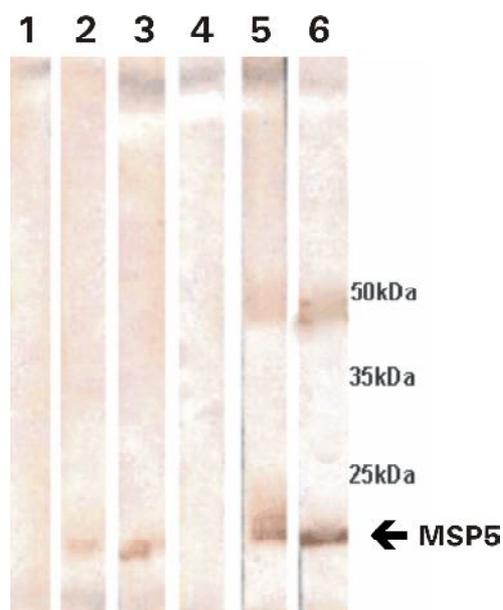


Fig. 3. *Western Blot* com anticorpo monoclonal anti-MSP5 ANAF16C1 (Linhas 1-3) e com anti-histidina (Linhas 4-6). Linhas 1 e 4: *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp5* sem indução com IPTG; linhas 2 e 5: *E. coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp5* após 6 horas de indução com IPTG; linhas 3 e 6: MSP5 recombinante truncada purificada (16kDa).

Os resultados do ELISA com MSP5 truncada estão demonstrados na Tabela 1 e serviram como base para o cálculo dos parâmetros (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão) para avaliar o desempenho do ensaio (Tabela 2). O ELISA indireto com MSP5 recombinante truncada foi capaz de detectar bovinos experimentalmente infectados com *A. marginale* com uma sensibilidade de 96,97%. A sensibilidade desse ELISA foi superior ao encontrado nos ELISAs indiretos com antígeno bruto de Nielsen et al. (1996) (87,3%), Montenegro-James et al. (1991) (93%) e no ELISA competitivo desenvolvido por Torione de Echaide et al. (1998) (96%). No entanto, foi inferior ao ELISA indireto com antígeno bruto reportado por Madruga et al. (2000) (100%). As explicações para esse resultado podem ser: a) maior diversidade de epitópos presente no antígeno com corpúsculo inicial e b) o teste padrão utilizado por Madruga et al. (2000) para determinar o estado de infecção dos animais que foi a imunofluorescência indireta, com sensibilidade e especificidade inferiores à PCR. Com base nessas observações, verifica-se que um teste de diagnóstico em desenvolvimento deve sempre ser comparado a outro de maior sensibilidade e especificidade.

Tabela 1. Resultados do ELISA com MSP5 recombinante truncada com soros de bovinos livres de infecção e infectados experimentalmente por *Anaplasma marginale*.

ELISA MSP5	Estado de infecção dos bovinos (PCR)		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	64	0	64
Negativo	2	96	98
Total	66	96	162

Tabela 2. Desempenho do ELISA com MSP5 recombinante truncada na detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale*.

Parâmetros	%
Sensibilidade	96,97
Especificidade	100
Valor Preditivo Positivo	100
Valor Preditivo Negativo	97,96
Precisão	98,76

A especificidade do ELISA com MSP5 foi superior ao ELISA competitivo de Torione de Echaide et al. (1998) (95%). Resultado este que pode ser por causa da utilização de proteína de ligação à maltose (*maltose binding protein* - MBP) fusionada à MSP5 como antígeno no ELISA competitivo. A MBP pode induzir reações falso-positivas decorrentes de interações inespecíficas entre anticorpos anti-MBP e MBP-MSP5, bloqueando a ligação do anticorpo monoclonal ANAF16C1, mesmo depois de realizar uma pré-adsorção do soro à MBP (TORIONE DE ECHAIDE et al., 1998). A especificidade desse ELISA também foi superior aos ELISAs com corpúsculo inicial desenvolvido por Montenegro-James et al. (1991) (96%), Nielsen et al. (1996) (99,6%) e Madruga et al. (2000) (96%). Nesses ensaios, provavelmente, ocorreu contaminação dos antígenos com proteínas de eritrócitos, as quais podem reagir inespecificamente com anticorpos presentes no soro, resultando assim em reações falso-positivas, que interferem diretamente na especificidade do teste (BARRY et al., 1986).

Com relação ao acompanhamento dos animais experimentalmente infectados, o ELISA com MSP5 truncada recombinante detectou anticorpos específicos a partir do 12^o dia após inoculação até o 37^o dia, quando foi realizada a última análise (Fig. 4), enquanto a PCR começou a detectar riquetsemia a partir do 9^o dia, uma diferença pouco importante, ao considerar que a PCR é sabidamente uma técnica de alta sensibilidade (CORONA et al., 2000).

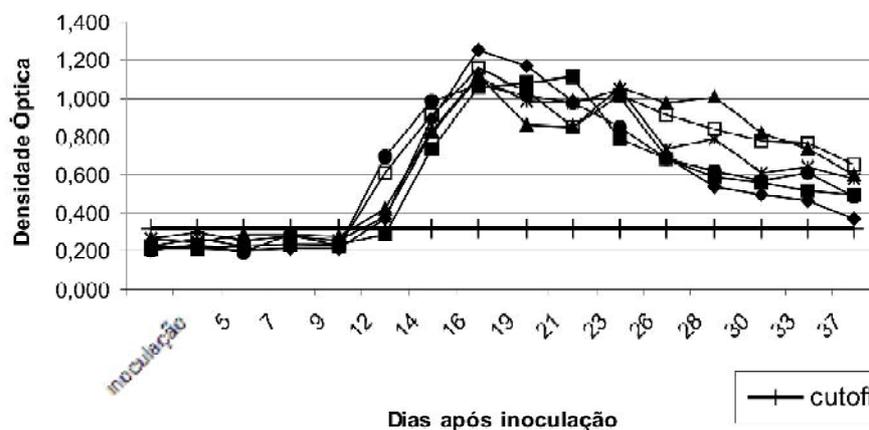


Fig. 4. Avaliação da resposta de anticorpos contra MSP5 recombinante truncada desenvolvida por seis bovinos infectados experimentalmente com *Anaplasma marginale*.

Os ELISAs com MSP5 e MSP1a detectaram 166 animais infectados e 1.428 não infectados, o que correspondeu à alta concordância de 95,67% definidos pelo índice k de 0,81 (Tabela 3) (ANSARI-LARI, 2005). Os ELISAs foram capazes de detectar bovinos infectados em todas as regiões brasileiras estudadas (Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais), assim como do Uruguai e da Costa Rica. A concordância entre os ELISAs e o reconhecimento dessas proteínas pelo soro de bovinos de diferentes regiões deveu-se, provavelmente, ao uso de proteínas com epitopos conservados, pois as proteínas MSP1a e MSP5 utilizadas neste estudo são baseadas no fragmento do gene *msp1a* e *msp5*, respectivamente, que codificam para o domínio hidrofílico da região C-terminal de MSP1a e N-terminal de MSP5, que são conservados. Esse resultado também ressalta o bom desempenho do ELISA com MSP5, uma vez que apresentou alta concordância com um ensaio de 99% de sensibilidade e 100% de especificidade (ARAÚJO et al., 2005).

Em relação aos resultados discordantes entre os ELISAs com MSP1a e MSP5 recombinantes, encontrou-se um número significativamente maior ($p < 0,001$) de soros negativos no ELISA com MSP5 truncada e positivos no

ELISA com MSP1a, evidenciando que, como soros de animais naturalmente infectados, ocorre uma maior sensibilidade nesse último teste. No entanto, é provável que essa diferença de sensibilidade não reflita em alterações na interpretação da situação epidemiológica.

Tabela 3. Concordância entre os resultados dos ELISAs com MSP5 e MSP1a recombinantes na detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* utilizando soros provenientes de regiões distintas do Brasil (Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais), do Uruguai e da Costa Rica.

ELISA	MSP 1			Índice k	
	Positivo	Negativo	Total		
MSP5	Positivo	166	29	195	0,81
	Negativo	43	1.428	1.471	
	Total	209	1.457	1.666	

O ELISA com MSP5 recombinante truncada apresentou bom desempenho na detecção de anticorpos contra *A. marginale*, com alta sensibilidade e especificidade, representando uma importante ferramenta para o diagnóstico da anaplasmoze bovina em estudos epidemiológicos.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu suporte da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (Finep).

Referências bibliográficas

AMERAULT, T. E.; ROBY, T. O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 153, n. 12, p. 1828-1834, 1968.

ANSARI-LARI, M. Comparison between two tests results, k statistic instead of simple overall agreement. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 133, n. 4, p. 369-370. 2005.

ARAÚJO, F. R.; MELO, V. S. P.; RAMOS, C. A. N.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, G. S.; TORRES, R. A. A. Jr.; FRAGOSO, S. P.; ARAUCO, P. R. C.; BACANELLI, G.; OLIVEIRA, M. B.; SANTOS, L. R. Development of enzyme-linked immunoadsorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005.

ARULKANTHAN, A.; BROWN, W. C.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 4, p. 3481-3287, 1999.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; McGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 55, n. 10, p. 2428-2435, 1987.

BARRY, D. N.; PARKER, R. J.; DE VOS, A. J.; DUNSTER, P.; RODWELL, B. J. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 63, n. 3, p. 76-79, 1986.

BOWIE, M. V.; FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene**, Amsterdam, v. 282, n. 1-2, p. 95-102, 2002.

CORONA, B.; MAZORRA, L. M.; BLANDINO, T.; MARTÍNEZ, S. Detección de *Anaplasma marginale* mediante amplificación del gen *msp5*. **Revista de Salud Animal**, La Habana, v. 22, n. 3, p. 168-173, 2000.

DREHER, U. M.; FUENTE, J.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; PUSTERLA, N.; KOCAN, K. M.; WOLDEHIWET, Z.; BRAUN, U.; REGULA, G. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 12, n. 10, p. 1177-1183, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUZGUN, A.; SCHUNTNER, C. A.; WRIGHT, I. G.; LEATCH, G.; WALTISBUHL, D. J. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 1-7, 1988.

FREY, A.; DI CANZI, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 221, p. 35-41, 1998.

GONZALES, E. F.; LONG, R. F.; TODOROVIC, R. A. Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 39, n. 9, p. 1538-1541, 1978.

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

KRAMER, M. S.; FEINSTEIN, A. R. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, Saint Louis, v. 29, n. 1, p. 111-123, 1981.

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. R.; KESSLER, R. H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2000.

MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; MICHAELI, S.; SHKAP, V. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 55-64, 2004.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M. A.; BENITEZ, M. T.; LEON, E.; BAEK, B. K.; GUILLEN, A. T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 77, n. 2, p. 93-101, 1991.

MUNODZANA, D.; McELWAIN, T. F.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 66, n. 6, p. 2619-2624, 1998.

NDÜNG'U, L. W.; AGUIRRE, C.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 3, p. 675-679, 1995.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; GALL, D.; TORIONE DE ECHAIDE, S.; WAGNER, G.; DAJER, A. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 3-4, p. 133-142, 1996.

OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.

PALMER, G. H. *Anaplasma* vaccines. In: WRIGHT, I. G. **Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 1-29.

PATRA, A. K.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHIJA, R.; KRISHNAN, A.; GARG, L. C.; PANDA, A. K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v. 18, n. 2, p. 182-192, 2000.

SCHUNTNER, C. A.; LEATCH, G. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 4, p.504-507, 1988.

SILVA, V. M. G.; ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R. M.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, M. A. O.; FRAGOSO, S. P.; SANTOS, L. R.; RAMOS, C. A. N.; BACANELLI, G.; TORRES JÚNIOR, R. A. A. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 511-516, 2006.

THOEN, C. O.; BLACKBURN, B.; MILLS, K.; LOMME, J.; HOPKINS, M. P. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, n. 5, p. 499-502, 1980.

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; McELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

VISSER, E. S.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES JUNIOR, D. P. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.

WINKLER, G. C.; BROWN, G. M.; LUTZ, H. Detection of antibodies on *Anaplasma marginale* by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with sodium dodecyl sulfate-disrupted antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 25, n. 4, p. 633-636, 1987.

Embrapa

Gado de Corte

Patrocínio:



**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**