

Metodologia do Teste de Imunofluorescência Indireta para o Diagnóstico da Tripanosomose Equina.

A tripanosomose causada pelo *Trypanosoma evansi* tem uma distribuição geográfica extremamente ampla. Ela ocorre no norte da África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul. O *T. evansi* causa a tripanosomose equina também conhecida no nordeste da Argentina e Pantanal como "mal de cadeiras". O *T. evansi* infecta uma ampla variedade de mamíferos e no Pantanal ele tem sido encontrado em cavalos, quatis (*Nasua nasua*), cães, capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (Nunes & Oshiro 1990, Silva et al. 1995b) e pequenos roedores (*Oryzomys* sp.) (Nunes et al. 1995). No Pantanal tripanosomose equina causa centenas de mortes todo ano. Estudos realizados por Davila et al (2003) registraram surtos com alta mortalidade em eqüinos. Silva et al. (1995a) relataram mortalidade de 50.5% em um rebanho de 95 animais e 75% em um rebanho de 40 eqüinos. Os sintomas clínicos observados em cavalos são anemia, edema dos membros e abdômen, febre, letargia, fraqueza, perda do apetite, andar cambaleante (Silva et al., 1995b; 1995c). Outra enfermidade igualmente importante para os eqüinos do Pantanal e com sintomatologia idêntica é a anemia infecciosa equina (AIE). A AIE, conhecida mundialmente como febre-do-pântano, é causada por um retrovírus pertencente à subfamília dos lentivírus, o qual infecta membros da família Equidae. O diagnóstico diferencial é laboratorial. Vários métodos parasitológicos têm sido empregados no diagnóstico da tripanosomose equina, porém todos requerem a visualização do parasita. O método parasitológico mais empregado é o do microhematócrito ou método de Woo (1969). O método de Woo requer a visualização do parasita vivo. Usualmente esta situação é difícil devido às distâncias das fazendas até os laboratórios de diagnóstico. A viabilidade do parasita, quando as amostras sanguíneas são acondicionadas em gelo, é de aproximadamente 6 horas. A utilização de testes sorológicos pode facilitar o diagnóstico, pois o seu princípio está baseado na pesquisa de anticorpos e não na presença do parasita. Dentre os testes mais utilizados no diagnóstico sorológico da tripanosomose equina, o teste da imunofluorescência indireta (TIFI), destaca-se pela simplicidade e acurácia. Esta publicação tem como objetivo descrever a metodologia do TIFI utilizada no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pantanal.

Corumbá, MS
Dezembro, 2003

Autores

Roberto Aguilar M. S. Silva,
MSc. Pesquisador, Embrapa
Pantanal
Rua 21 de Setembro, 1880
CEP 79320-900
rsilva@cpap.embrapa.br

Valdete Sanchez
BSc., Assistente de Operações
Embrapa Pantanal
valdete@cpap.embrapa.br

Alberto M. R. D'ávila,
PhD, FIOCRUZ
Av. Brasil 4365
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
CEP 21045-900
davila@ioc.fiocruz.br

Metodologia da Imunofluorescência indireta

Materiais:

Lâminas para imunofluorescência
Laminulas 24x50
Glicerina tamponada
Imunoglobulina IgG conjugada com isotiocianato de fluoresceína
Microplacas (96 poços)
Pipeta multicanal
Pipeta automática (0,5 µl - 100 µl)
Corante Azul de Evans (10mg%)
Solução tampão PBS 0,15M.

Preparação do antígeno:

Origem dos parasitas

Infectar 1 ou mais ratos (os mais usados são os de linhagem Wistar) e esperar que apresentem alta parasitemia. Coletar o sangue com anticoagulante preferencialmente com heparina, tomando cuidado de colocar os tubos com o sangue coletado num recipiente com gelo, diminuindo assim o metabolismo dos parasitas e prolongando o seu tempo de vida fora do hospedeiro.

Após passar o sangue contendo parasitas pela coluna de DEAE celulose: Segurar uma seringa de 20 ou 50 ml (dependendo do volume de sangue a ser passado) num pequeno suporte. Colocar no fundo desta, lâ de vidro ou papel filtro. Segurar a extremidade inferior da seringa com uma mangueira pequena e fechar a extremidade desta. Montar a coluna colocando aproximadamente 20 g de DEAE celulose quando tiver um volume de sangue coletado de dois ratos. Coloca-se a resina depois de lavada 3 vezes com PSG pH 8.0 na coluna. Compactar a resina colocada na seringa passando 3 vezes o seu volume de PSG (por exemplo se a resina estiver preenchendo 10 ml da seringa serão passados 30 ml de PSG). Deve-se tomar cuidado de não deixar passar o nível do PSG abaixo da resina durante a compactação, pois causaria pequenas rachaduras nela. Depois de compactada passar pela coluna a mistura de PSG com o sangue infectado na concentração de 1:1, monitorando sempre o nível desta mistura com o nível da resina evitando possíveis rachaduras na coluna. Monitorar a passagem dos parasitas pela coluna, a qual ocorrerá logo após da passagem de um pouco de PSG. Lavar 3 vezes com PBS 0,15M, centrifugando a 3000 RPM durante 15m a 4° C. Ressuspender os parasitas em PSG 0,15M ajustando até atingir a quantidade aproximada de 40 parasitas por campo num aumento de 400x. Colocar apenas uma camada fina do antígeno preparado em cada poço das lâminas para imunofluorescência a serem usadas.

Diluição dos soros:

A princípio para uma triagem preliminar os soros a serem testados não deverão ser diluídos. Conforme encontrados positivos é recomendável que sejam testados novamente em diluições seriadas de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280.

Montagem da Imunofluorescência:

- Diluir o azul de Evans 10 mg% a 1:10 em PBS. Diluir o conjugado na diluição indicada pelo fabricante (ou numa diluição específica determinada previamente pelo usuário) neste azul de Evans diluído.
- Colocar 10 µl do soro a ser testado em cada poço das lâminas com antígeno. Incubar em câmara úmida a 37° C durante 30 min. Logo após lavar 2 vezes com PBS 0,15 M deixando as lâminas no porta lâminas com PBS 0,15M durante 2 min. de cada vez.
- Colocar 10 µl do conjugado diluído como descrito em (a) em cada poço da lâmina incubada com o soro. Incubar em câmara úmida a 37° C durante 30 min. Logo após lavar 2 vezes com PBS 0,15 M como descrito em (b).
- Fazer a leitura num microscópio para imunofluorescência no aumento de 400x.

e) Como sugestão o teste pode ser considerado positivo quando mais da metade do campo em observação apresentar tripanosomas fluorescentes. Para isto tem que ser considerada a padronização prévia do conjugado na procura da melhor fluorescência para leitura.

Conclusões

O método de TIFI têm limitações na sua utilização como diagnóstico da tripanosomose causada pelo *T. evansi* pelo seguinte motivo: após o tratamento os anticorpos permanecem por mais de um ano, o que dificulta saber se trata-se de uma nova infecção ou são anticorpos residuais de uma infecção passada e já curada. Porém ele é excelente para estudos epidemiológicos.

Recomendações

Nas infecções com *Trypanosoma evansi* deve-se diagnosticar os animais com infecções agudas e tratá-los individualmente, portanto o TIFI serve apenas para estudos epidemiológicos. As infecções agudas devem ser diagnosticadas através do teste do micro hematócrito.

Referências Bibliográficas

- DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S.; JANSEN, A. M. **Dynamics of *Trypanosoma evansi* outbreaks in the Pantanal, Brazil.** Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/W5781E/w5781e06.htm>. Acesso em: 27/10/2003.
- NUNES, V. L. B.; OSHIRO E. T. *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.84, p.692, 1990.
- NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. da; NUNES, A. B. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose tegumentar (LT) e Mal de Cadeiras no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - Estudo de reservatórios, 1992-1994. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v.3:, p.29-35, 1995.
- SILVA, R. A. M. S.; BARROS, A. T. M.; HERRERA, H. M. Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil: a preliminary approach on risk factors. **Revue D'Élevage et de Médecine Veterinaire Pays Tropicaux**, Paris, v.48, p.315-319, 1995a.

SILVA, R. A. M. S.; AROSEMENA, N. A. E.;
HERRERA, H. M.; SAHIB, C. A.; FERREIRA, M. S. J.
Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma*
evansi in horses of Pantanal Mato-Grossense, Brazil.
Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.60, p.167-
171, 1995b.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge for the
detection of trypanosomes in blood. **Canadian**
Journal Zoology, Ottawa, v.47, p.921-923, 1969.

Circular Técnica, 39

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pantanal
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-2332430
Fax: 67-2331011
Email: sac@cpap.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2003): formato digital

Comitê de Publicações

Presidente: Aiesca Oliveira Pellegrin
Secretário-Executivo: Marco Aurélio Rotta
Membros: Balbina Maria Araújo Soriano
Evaldo Luis Cardoso da Silva
José Robson Bezerra Sereno
Regina Célia Rachel dos Santos

Expediente

Supervisor editorial: Marco Aurélio Rotta
Revisão de texto: Mirane dos Santos
Tratamento das ilustrações: Regina Célia R. Santos
Editoração eletrônica: Regina Célia R. Santos
Elcio Lopes Sarath